



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

SCIENZE E TECNOLOGIE FARMACEUTICHE

Ciclo XXV

**NANOPARTICELLE PER LA TERAPIA DEI TUMORI.
PREPARAZIONE, CARATTERIZZAZIONE, E TOSSICITÀ**

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza

CHIM/09

Presentata da:	Carla Vinci
Coordinatore Dottorato	Prof. Elias Maccioni
Tutor/Relatore	Dr.ssa Biancamaria Baroli

Esame finale anno accademico 2011 – 2012

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro di tesi è stato possibile anche grazie a numerose persone che hanno offerto il loro preziosissimo aiuto, e che sono elencate, in ordine sparso, qui di seguito.

Si ringrazia il gruppo di ricerca del Prof. Francesco Branda, e in particolare la Dr.ssa Brigida Silvestri, dell'Università di Napoli, per aver sintetizzato le nanoparticelle di silice, e per le analisi al DLS relative alle proteine-corona condotte nei laboratori dei suoi collaboratori. Un ringraziamento va anche alla Dr.ssa Maria Francesca Casula (Dipartimento di Chimica, UniCa), per la caratterizzazione al TEM di NP-Si, NP-GS, e NP-Si)GS; al Prof. Alessandro Riva, Dr. Francesco Loy, ed alla Dr.ssa Paola Solinas (Dipartimento di Scienze Biomediche, UniCa), per la caratterizzazione al TEM e al SEM di NP-Si, NP-GS, e NP-Si)GS; al Prof. Prasad Shastri e il Dr. Ralph Thomann (Università di Friburgo, DE), per la caratterizzazione al TEM e al SEM di NP-GS, NP-Si)GS, e NP-Si)Au. Si ringraziano anche il Prof. Arturo M. Lopez-Quintela (Università di Santiago de Compostela, ES) per averci gentilmente fornito le nanoparticelle d'oro, e per i preziosi consigli sui calcoli matematici che ci hanno permesso di calcolare il numero di nanoparticelle presenti nelle nostre dispersioni, ed il Prof. Carlos Vazques Vazques e la Dr.ssa Marianna Manca per le analisi al DLS (Università di Santiago de Compostela, ES) relative alle NP-Si, NP-GS, NP-Si)GS, e NP-Au. La Dr.ssa Manca ha anche preparato le nanoparticelle lipidiche. Un ringraziamento particolare va alla Dr.ssa Valentina Onnis, per aver sintetizzato le molecole citotossiche e loro derivati coniugabili utilizzate nei nostri saggi di tossicità. Per le importanti analisi all'NMR è doveroso ringraziare Prof. Mariano Casu (Dipartimento di Chimica, UniCa), ed il Dr. Luca Uccheddu. Vorrei inoltre ringraziare il Dott. Vincenzo Infante per il programma di calcolo che mi ha permesso di risolvere l'equazione di tipo Logistic ed il Dott. Gianfranco Mocci per l'assistenza con le analisi all'ICP-OES e tanti altri interventi sullo spettrofotometro. Non posso dimenticare tutti i tirocinanti e studenti in visita che hanno apportato un piccolo contributo, ma che nell'insieme è diventato molto più grande di quanto potessi immaginare. Un grazie veramente sentito è dedicato a: Carla Atzori, Martina Caboni, Alessandro Campus, Silvia Curreli, Lauren L. Garcia-Spite, James L. Hedrick, Valeria Pinna, Federica Piu, Chiara Porru, Raffaella Sannais, Serena Tangianu, Flavio Vigna, Mahlet Wol-

deyes, Minmin Yen, e Stephanie M. Yoon. Inoltre, è bene ricordare che tutto ciò non sarebbe stato possibile senza l'aiuto e la solerzia di tutti gli amministrativi, rappresentanti, tecnici, venditori, ed enti finanziatori. Un caloroso ringraziamento, per l'importante supporto fornito durante gli ultimi giorni della stesura di questa tesi è riservato ad Antonella Cossu, Silvia Mura, e Sofia Marotto.

Infine, ma senz'altro non per ordine di importanza, un sentito ringraziamento è rivolto al mio supervisore, la Dr.ssa Biancamaria Baroli, che mi ha permesso di svolgere un corso di Dottorato di Ricerca presso il suo laboratorio, e, contemporaneamente, mi ha dato la possibilità di portare avanti un interessante progetto di ricerca finanziato dalla Regione Sardegna. I ringraziamenti sono per tutto il sapere che mi ha trasmesso, per avermi permesso di imparare tanto ed in breve tempo, per la sua pazienza, e per avermi fatto vivere un'esperienza altamente formativa sotto il profilo professionale, ma anche personale.

FINANZIAMENTI

Questo studio è stato finanziato dalla Regione Autonoma della Sardegna mediante una borsa di ricerca (progetto n. CRP1-568) co-finanziata con fondi a valere sul PO Sardegna FSE 2007-2013 sulla L.R.7/2007 “Promozione della ricerca scientifica e dell’innovazione tecnologica in Sardegna”.

Inoltre, la maggior parte della strumentazione utilizzata è stata acquisita con i seguenti finanziamenti: Excellence in Research and Teaching Activities (2009, Università di Cagliari), Finanziamento per lo start-up dei giovani ricercatori (2009-2010, Università di Cagliari), LR 7/07 - Progetti di Ricerca Fondamentale o di Base, (2010-2012, progetto n. CRP3_11, Regione Autonoma della Sardegna).



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA

INDICE

1	INTRODUZIONE E MOTIVAZIONE DELLA TESI	1
1.1	Nanotecnologie: definizione e origini	1
1.2	Tumori	2
1.2.1	Origine dei tumori e loro classificazione	2
1.2.2	Crescita e invasione tumorale	4
1.2.3	Metastasi	7
1.2.4	Terapia dei tumori: tradizione ed innovazione	8
1.3	Bibliografia	11
2	COLTURA DI CHERATINOCITI UMANI	14
2.1	Introduzione	14
2.2	Materiali	15
2.2.1	Prodotti per la coltivazione delle cellule	15
2.2.2	Protezione e sicurezza	16
2.2.3	Materiale consumabile in plastica	16
2.2.4	Materiale consumabile in vetro	17
2.2.5	Strumenti	17
2.2.6	Analisi dei dati	17
2.3	Metodi	17
2.3.1	Sterilizzazione e pulizia del materiale e della strumentazione	17
2.3.2	Preparazione del neutralizzatore della tripsina	18
2.3.3	Aliquotazione dei reagenti per la coltura cellulare	18
2.3.4	Preparazione del terreno supplementato	19
2.3.5	Scongelamento e semina di una crio-vial di cellule	20
2.3.6	Coltura e rinnovamento del terreno	23
2.3.7	Subcultura	23
2.3.8	Congelamento	25
2.4	Presentazione e discussione dei risultati	26
2.4.1	Morfologia dei cheratinociti	26
2.4.2	Coltivazione cellulare e dati di crescita derivanti	28

2.4.3	Influenza del mezzo di congelamento sulla vitalità cellulare post-scongelo	31
2.5	Conclusioni	33
2.6	Bibliografia e note	34
3	COLTURA DI MELANOCITI UMANI	38
3.1	Introduzione	38
3.2	Materiali	39
3.2.1	Prodotti per la coltivazione delle cellule	39
3.2.2	Protezione e sicurezza	40
3.2.3	Materiale consumabile e strumentazione	40
3.2.4	Analisi dei dati	40
3.3	Metodi	40
3.3.1	Aliquotazione dei reagenti per la coltura cellulare	41
3.3.2	Preparazione del terreno supplementato	41
3.3.3	Scongelo e semina di una crio-vial di cellule	41
3.3.4	Coltura e rinnovamento del terreno	42
3.3.5	Subcultura	43
3.3.6	Congelamento	44
3.4	Presentazione e discussione dei risultati	44
3.4.1	Morfologia dei melanociti	44
3.4.2	Coltivazione cellulare e dati di crescita derivanti	46
3.4.3	Influenza del mezzo di congelamento sulla vitalità cellulare post-scongelo	47
3.5	Conclusioni	49
3.6	Bibliografia	49
4	COLTURA DI CELLULE DI MELANOMA UMANO	52
4.1	Introduzione	52
4.2	Materiali	53
4.2.1	Prodotti per la coltivazione delle cellule	53
4.2.2	Protezione e sicurezza	54
4.2.3	Marcatori fluorescenti	54
4.2.4	Materiale consumabile e strumentazione	54
4.2.5	Analisi dei dati	54
4.3	Metodi	55
4.3.1	Aliquotazione dei reagenti per la coltura cellulare	55
4.3.2	Preparazione di una soluzione salina tamponata in tampone fosfato (PBS)	55
4.3.3	Preparazione di una soluzione 1% (p/v) di BSA in PBS	56
4.3.4	Preparazione di una soluzione 0,1% (v/v) di triton X-100 in PBS	56
4.3.5	Preparazione del terreno supplementato	56
4.3.6	Scongelo e semina di una crio-vial di cellule	56
4.3.7	Semina in piastre da 24 pozzetti	57
4.3.8	Semina in vetrini da 4 o da 8 camere	58
4.3.9	Coltura e rinnovamento del terreno	58

4.3.10	Subcultura	59
4.3.11	Congelamento	61
4.3.12	Colorazione delle cellule con marcatori fluorescenti	62
4.4	Presentazione e discussione dei risultati	64
4.4.1	Morfologia delle cellule di melanoma umano	64
4.4.2	Coltivazione cellulare e dati di crescita derivanti	66
4.4.3	Influenza del mezzo di congelamento sulla vitalità cellulare post-scongelamento	69
4.5	Conclusioni	75
4.6	Bibliografia e note	75
5	NANOPARTICELLE INORGANICHE	79
5.1	Introduzione	79
5.2	Materiali	79
5.2.1	Reagenti utilizzati per la sintesi	79
5.2.2	Protezione e sicurezza	80
5.2.3	Materiale consumabile utilizzato per la sintesi	80
5.2.4	Materiale consumabile utilizzato per la caratterizzazione	80
5.2.5	Strumenti	81
5.2.6	Analisi dei dati	81
5.3	Metodi	82
5.3.1	Utilizzo e sintesi delle NP	82
5.3.1.1	<i>Utilizzo delle NP-Au</i>	82
5.3.1.2	<i>Utilizzo delle NP-Si)RHOD e NP-Si)RHOD/Hep</i>	82
5.3.1.3	<i>Utilizzo delle NP-Si</i>	82
5.3.1.4	<i>Sintesi delle NP-GS</i>	83
5.3.1.5	<i>Preparazione delle NP-Si)GS</i>	84
5.3.1.6	<i>Sintesi delle NP-Si)Au</i>	84
5.3.1.7	<i>Preparazione delle DNPC</i>	85
5.3.2	Calcolo del numero di NP per unità di volume	87
5.3.3	Caratterizzazione chimico-fisica	88
5.3.3.1	<i>Spettroscopia UV-visibile</i>	88
5.3.3.2	<i>Analisi all'ICP-OES</i>	88
5.3.3.3	<i>Analisi all'NMR</i>	89
5.3.3.4	<i>Analisi al TEM</i>	89
5.3.3.5	<i>Analisi al SEM</i>	90
5.3.3.6	<i>Analisi al DLS</i>	90
5.3.3.7	<i>Dimensionamento da microscopia</i>	91
5.3.4	Verifica della stabilità delle NP nei terreni di coltura	92
5.4	Presentazione e discussione dei risultati	93
5.4.1	Sintesi d NP-GS	93
5.4.2	Preparazione delle NP-Si)GS	100
5.4.3	Sintesi delle NP-Si)Au	102
5.4.4	Preparazione delle DNPC	103

5.4.5	Analisi al TEM	109
5.4.5.1	<i>Caratterizzazione delle NP-Si</i>	109
5.4.5.2	<i>Caratterizzazione delle NP-GS</i>	112
5.4.5.3	<i>Caratterizzazione delle NP-Si)GS</i>	115
5.4.5.4	<i>Caratterizzazione delle NP-Si)Au</i>	119
5.4.6	Analisi al SEM	122
5.4.6.1	<i>Caratterizzazione delle NP-Si</i>	122
5.4.6.2	<i>Caratterizzazione delle NP-GS</i>	125
5.4.6.3	<i>Caratterizzazione delle NP-Si)GS</i>	126
5.4.6.4	<i>Caratterizzazione delle NP-Si)Au</i>	130
5.4.7	Analisi al DLS	132
5.4.8	Stabilità delle NP nei terreni di coltura	138
5.5	Conclusioni	138
5.6	Bibliografia e note	139
6	TEST DI TOSSICITÀ	140
6.1	Introduzione	140
6.2	Materiali	141
6.2.1	Prodotti per la coltura delle cellule	141
6.2.2	Reagenti per il test di tossicità	141
6.2.3	Nanoparticelle testate	141
6.2.4	Protezione	142
6.2.5	Prodotti per la pulizia e la disinfezione degli spazi appositi	142
6.2.6	Materiale consumabile in plastica	142
6.2.7	Materiale consumabile in vetro	142
6.2.8	Strumenti	142
6.2.9	Analisi dei dati	142
6.3	Metodi	143
6.3.1	Sintesi delle NP	143
6.3.2	Sterilizzazione e pulizia del materiale e della strumentazione	143
6.3.3	Aliquotazione dei reagenti	143
6.3.4	Preparazione del terreno supplementato con aggiunta di pen/strep	144
6.3.5	Scongelamento, semina, coltura e subcultura di un fenotipo cellulare	144
6.3.6	Curva di calibrazione per la quantificazione della vitalità cellulare	144
6.3.7	Minima dose efficace	148
6.3.8	Test di tossicità a tempo - cellule e NP	151
6.3.9	Test di tossicità a tempo – mezzo disperdente della formulazione nanoparticellare	155
6.3.10	Test di tossicità a tempo - terreni	155
6.3.11	Test di tossicità a tempo - terreni e NP	156
6.4	Presentazione e discussione dei risultati	158
6.4.1	CTB e Curve di calibrazione	158
6.4.1.1	<i>Curve di calibrazione: HEKa</i>	158
6.4.1.2	<i>Curve di calibrazione: HEMa-LP</i>	161

6.4.1.3	<i>Curve di calibrazione: Colo-38</i>	164
6.4.2	Esperimenti di minima dose efficace	167
6.4.2.1	<i>Nanoparticelle inorganiche</i>	169
6.4.2.2	<i>Nanoparticelle lipidiche</i>	170
6.4.2.3	<i>Nanoparticelle inorganiche rodamate</i>	172
6.4.2.4	<i>Sostanza C</i>	174
6.4.3	Test di tossicità a tempo - cellule e nanoparticelle	175
6.4.3.1	<i>NP-Si</i>	175
6.4.3.2	<i>NP-GS</i>	181
6.4.3.3	<i>NP-Si)GS</i>	188
6.4.3.4	<i>NP-Si)RHOD</i>	196
6.4.3.5	<i>NP-Si)RHOD/Hep</i>	198
6.4.3.6	<i>DNPC</i>	189
6.4.3.7	<i>NC-Pacli</i>	189
6.4.3.8	<i>Test di tossicità a tempo – terreni e nanoparticelle</i>	202
6.5	Bibliografia e note	204
7	CONCLUSIONI	206
8	APPENDICE	208

INTRODUZIONE E MOTIVAZIONE DELLA TESI

1.1. Nanotecnologie: definizione e origini

Nel 1959 il fisico premio Nobel Richard P. Feynman fondò le basi delle nanotecnologie, invitando gli scienziati, durante un suo famoso discorso, ad esplorare un nuovo campo della fisica, in cui venissero usati degli strumenti per costruire strumenti sempre più piccoli, fino ad arrivare alle dimensioni atomiche. Queste macchine, strumenti e robot nanometrici sarebbero poi serviti a sviluppare quell'insieme di strumentazioni microscopiche che costituiscono, appunto, il mondo delle nanotecnologie [1].

Secondo una definizione data dalla *Royal Society and Royal Academy of Engineering* nel 2004, col prefisso “nano-” si intende indicare tutte quei materiali con dimensioni ≤ 100 nm, sebbene non sempre questo parametro venga rispettato [2]. Questi materiali comprendono nanotubi (specialmente quelli in carbonio, che presentano delle caratteristiche peculiari [3]), nanowire (al contrario delle nanoparticelle, non mostrano tendenza ad aggregarsi tra loro [4]), nanoshell (nanocristalli costituiti da un *core* ricoperto da un guscio metallico [5, 1]), nanoparticelle (per citare alcuni tipi: metalliche [6-10], inorganiche/organiche [11-14, 8], con superficie funzionalizzata o non [15-17]), quantum dots [18, 19], dendrimeri [20-22] e biopolimeri [23-25]. È stato dimostrato che materiali con dimensioni nanometriche, sotto i 100 nm, possono acquistare delle nuove proprietà (elettroniche, magnetiche, meccaniche, e/o ottiche) diverse da quelle possedute dagli stessi materiali con dimensioni maggiori, e, per questo motivo, essi possono essere utilizzati in numerosi campi, dalle biotecnologie alla nanomedicina [26].

Le bio-nanotecnologie vengono considerate una branca delle nanotecnologie. Con questo termine si intende, infatti, la fabbricazione, da parte di organismi viventi, di nano-oggetti o macromolecole, utilizzabili per costruire o manipolare altri nano-oggetti. In particolare, le cellule microbiche sono state elette ad organismi-tipo per la produzione di nano-strutture (e.g., polimeri, proteine,

nanoparticelle metalliche, magnetosomi), data la loro ampia diversità fisiologica, le piccole dimensioni, la facilità con cui possono essere manipolate geneticamente e coltivate in colture. La maggior parte dei polimeri microbici, come i polisaccaridi, poliesteri e poliammidi possono essere isolati dalle cellule e utilizzati per produrre nanocomposti [27].

1.2. Tumori

1.2.1. Origine dei tumori e loro classificazione

Il termine tumore (dal latino, *tumor*) era originariamente riferito al gonfiore causato da un'inflammazione. Oggi, questa parola non viene più utilizzata in riferimento ad un'inflammazione, ma piuttosto come sinonimo di neoplasia. Il termine neoplasia significa, letteralmente, “nuova crescita”. Altre terminologie di uso comune sono di seguito citate e brevemente commentate. L'oncologia è lo studio dei tumori o neoplasie (dal greco, *oncos* = rigonfiamento). “Cancro”, invece, è un termine comune che viene usato per indicare tutti i tumori maligni. Questa parola ha un'etimologia incerta, probabilmente dal greco “*cancro*”, granchio, ad indicare la facilità di adesione del tumore a qualsiasi parte anatomica in cui si sviluppi [28].

Il cancro si origina da mutazioni di geni che regolano delle vie metaboliche essenziali per la funzionalità cellulare, portando ad una crescita non controllata dei tessuti. I tumori che ne derivano sono complesse strutture avvolte da una ricca vascolarizzazione e circondate dallo stroma tumorale, che è generalmente composto da vari tipi di cellule non maligne, come i fibroblasti e le cellule mieloidi [29]. I tumori, in realtà, non possono essere considerati semplicemente degli ammassi di cellule e matrice extracellulare, ma assomigliano a dei veri e propri organi, sebbene con struttura e funzioni peculiari. Infatti, come gli organi, i tumori sono costituiti da cellule che svolgono le funzioni fondamentali (dette, nel complesso, “parenchima” [28]), e dallo stroma, che rappresenta la struttura di sostegno dell'organo-tumore, formato da cellule stromali (e.g., fibroblasti e adipociti) e dalla matrice extracellulare, costituita, invece, da proteoglicani, acido ialuronico, e proteine fibrose [30]. La suddivisione dei tumori in benigni e maligni si basa essenzialmente sulla struttura del parenchima.

La classificazione dei tumori e la loro denominazione può dipendere dalla tipologia di cellule da cui il tumore ha origine, oppure dalle caratteristiche morfologiche e funzionali del tumore stesso. Secondo la prima classificazione, nei **tumori benigni**, in genere si aggiunge il suffisso “-oma” al tipo di cellule da cui il tumore ha origine. Per esempio, un tumore benigno che origina dai fibroblasti è detto fibroma, oppure una neoplasia con cellule simili ai condrociti è detta condroma. I tumori benigni che originano dalle cellule germinali e contengono cellule derivate dai diversi foglietti embrionali sono chiamati teratomi. Questi ultimi si presentano specialmente nelle gonadi, e

risultano costituiti da un'ampia varietà di tessuti: cute, muscolo, tessuto adiposo, strutture dentarie o qualsiasi altro tessuto dell'organismo [28, 31].

I **tumori maligni** che insorgono in un tessuto mesenchimale vengono chiamati sarcomi (dal greco, *sarcos* = carne) perché si presentano carnosi. Le neoplasie maligne delle cellule di origine epiteliale, derivate da ognuno dei tre foglietti germinativi, sono chiamate carcinomi. Normalmente viene specificato l'organo di origine (e.g., adenocarcinoma renale), anche se, spesso, un cancro è costituito da cellule indifferenziate di origine ignota e viene designato semplicemente come tumore maligno indifferenziato [28].

I tumori del sistema ematopoietico hanno una denominazione particolare, in quanto la presenza del suffisso “emia” indica la correlazione col sangue; ad esempio, il termine “leucemia” indica una proliferazione maligna dei leucociti [31].

Nella terminologia che caratterizza i tumori maligni esistono alcune imprecisioni, come, ad esempio, il termine “melanoma” anziché “melanocarcinoma” è usato per indicare un tumore maligno della cute [28, 31]. Analogamente, “epatoma” e “linfoma” indicano rispettivamente due tumori maligni del fegato e del sistema linfatico [28, 31].

Con il termine “adenoma” viene definita sia una neoplasia benigna epiteliale con aspetto ghiandolare, sia un tumore derivante da ghiandole, che però non necessariamente riproduce un aspetto ghiandolare. “Papilloma” indica, invece, una neoplasia benigna epiteliale caratterizzata da proiezioni simili ad una verruca. Ancora, se una neoplasia, benigna o maligna, presenta una proiezione macroscopicamente visibile e sporge nel lume gastrico o del colon, essa prende il nome di polipo. Il termine “polipo” è usato soprattutto per quelli benigni, mentre “carcinoma polipoides” indica quelli maligni [28]. L'aggettivo “papillare” indica una somiglianza con una struttura frondosa, “midollare” è un tumore ricco di cellule, soffice; al contrario “scirroso” o “termoplastico” implica la presenza di uno stroma fibroso [31].

Tuttavia, ciò che essenzialmente differenzia un tumore maligno da uno benigno è l'incapacità, per quest'ultimo, di invadere i tessuti circostanti e di dare metastasi, caratteristiche tipiche, invece, delle neoplasie maligne. In secondo luogo, la differenziazione (vedi oltre) delle cellule tumorali caratterizza maggiormente i tumori benigni, rispetto a quelli maligni [31].

I tumori, benigni o maligni, possono essere ben differenziati oppure no. Il termine “differenziazione” indica quanto le cellule tumorali siano simili a quelle normali, mature, del tessuto dal quale la neoplasia ha preso origine. Le neoplasie benigne, di solito, sono ben differenziate e si mostrano istologicamente e citologicamente simili ai loro tessuti di origine [28]. Talvolta, le cellule tumorali sono talmente simili a quelle normali da non essere distinguibili, se non al momento della formazione di noduli. Le neoplasie maligne, invece, variano da forme differenziate a forme scarsamente differenziate o non differenziate (anaplasie) [28].

Pertanto, i tumori maligni si differenziano, quindi, dal tessuto di origine, in particolar modo per (1) l'anaplasia e atipia cellulare, in quanto le cellule tumorali variano per dimensione, forma, e numero di nuclei (pleomorfismo); (2) la presenza, di nuclei con una elevata quantità di DNA ed una colorazione molto scura, con cromatina azzollata e disposta lungo la membrana nucleare, e con nucleoli ingrossati; (3) mitosi atipiche, e (4) cellule dalla forma bizzarra, come le cellule tumorali giganti, che possono essere mono o polinucleate, con nuclei ipercromatici e grandi rispetto alla cellula [28, 31].

Anche l'abbondanza di mitosi è sintomo di malignità, sebbene in alcuni tumori il numero di mitosi sia normale. I modelli di crescita dei tumori maligni, ma anche benigni, risultano essere spesso casuali e disorganizzati. Le cellule anaplastiche perdono la loro normale polarità ed il loro orientamento risulta essere marcatamente alterato. La malignità, inoltre, è caratterizzata soprattutto dall'invasività, sulla base della quale può essere diagnosticato il tumore. Infine, anche la presenza di metastasi identifica un tumore come maligno [28, 31].

Un'altra caratteristica che può rappresentare il campanello di allarme per formazioni neoplastiche è la "displasia". Questo termine, che letteralmente significa "crescita disordinata", indica la presenza, negli epiteli, di una serie di cambiamenti che comprendono la perdita di uniformità e dell'orientamento architettonico delle cellule. Quando la displasia è marcata ed interessa l'intero spessore dell'epitelio, ma rimane lì confinata, essa viene considerata una neoplasia preinvasiva ed è indicata come "carcinoma in situ". Quando, invece, le cellule tumorali superano il limite della membrana basale, il tumore è detto "invasivo". È opportuno precisare che non sempre la displasia progredisce in cancro: il processo displastico, infatti, è reversibile ed una cellula displastica può tornare ad essere normale [28].

1.2.2. Crescita e invasione tumorale

Quasi tutti i tumori benigni crescono formando masse che restano localizzate nella loro sede di origine, e non hanno la capacità di invadere o metastatizzare a distanza, come i tumori maligni. Poiché le neoplasie benigne si espandono lentamente, formano attorno a sé una capsula fibrosa che le separa dal tessuto di origine. Tale capsula mantiene il tumore come una massa ben delimitata, cosa che ne permette una facile enucleazione chirurgica. La crescita dei tumori maligni, al contrario, è caratterizzata da una progressiva infiltrazione, invasione e distruzione del tessuto circostante. Spesso i tumori maligni a crescita lenta sviluppano, anch'essi, una capsula fibrosa, dalla quale si dipartono gruppi di cellule che infiltrano le strutture adiacenti, come le chele di un granchio (da cui il nome di cancro) [28].

I carcinomi in situ, cioè quelli che si trovano in una fase preinvasiva, sono asintomatici, e questo rende difficile la loro curabilità, che sarebbe, in questo stadio, sicura. Il tumore maligno si ac-

crebbe caratteristicamente entro il tessuto di origine, aumentando il proprio volume ed infiltrando le strutture normali. La crescita invasiva caratteristica dei tumori maligni ne comporta, spesso, l'estensione oltre i confini dell'organo, e coinvolge i tessuti adiacenti [28].

La crescita tumorale può essere suddivisa essenzialmente in quattro fasi: (1) trasformazione delle cellule bersaglio, (2) crescita delle cellule trasformate, (3) invasione locale, e (4) metastasi [28].

Per invasione si intende un complicato processo che governa alcuni cambiamenti patologici che avvengono naturalmente nel nostro organismo, come lo sviluppo embrionale, la riparazione dei tessuti, la rimarginazione di ferite, e la risposta immunitaria. L'invasione cellulare viene definita come migrazione di cellule, all'interno di un tessuto, in risposta a dei segnali chimici (e.g., ormoni, fattori di crescita, metaboliti), stimoli fisici (e.g., rigidità dei tessuti, organizzazione cellulare), e processi fisico-chimici (e.g., attivazione/inattivazione cellulare). Alcune mutazioni nel processo di invasione possono generare delle situazioni patologiche come l'artrite, l'aterosclerosi, la sclerosi multipla, o la malattia polmonare ostruttiva cronica. Inoltre, le degenerazioni nel processo di invasione possono portare alla formazione di metastasi, responsabili del 90% delle morti per cancro [32].

Per le neoplasie maligne, in particolare, fino a pochi anni fa si era convinti che il processo di invasione e metastasi fosse determinato dalla migrazione di una singola cellula. Di recente, invece è stato appurato che l'invasione può avvenire principalmente secondo due modalità, che possono agire singolarmente o in concomitanza tra di loro. Le due vie di invasione sono la "*single cell invasion*" (invasione attraverso cellule singole) e la "*collective cell invasion*" (invasione mediante gruppi di cellule) [33]. Affinché le cellule metastatiche possano distaccarsi dal tumore primario ed arrivare ad altri organi, esse devono, innanzitutto, riuscire a distaccarsi dalle cellule tumorali vicine ed acquisire capacità migratorie ed invasive. Questi cambiamenti riflettono delle profonde modificazioni a livello di espressione genica, come la perdita di marker epiteliali e l'acquisizione di quelli mesenchimali: processo conosciuto anche come transizione epiteliale-mesenchimale (a volte indicata semplicemente con l'acronimo: EMT). Le cellule tumorali devono quindi attraversare la membrana basale, invadere i tessuti circostanti ed arrivare fino ai vasi sanguigni e/o linfatici. Dopo aver raggiunto il torrente sanguigno e/o linfatico, le cellule metastatiche devono essere in grado di sopravvivere fino all'arrivo nel sito di metastasi, per permettere l'accrescimento del tumore secondario [33].

La "*single cell invasion*" può avvenire mediante due processi: (1) "*fibroblast-like strategy*", e (2) "*leucocyte-like strategy*" [33]. A seconda del processo, il movimento può avvenire con un ritmo costante o ad intermittenza [32]. Nella "*fibroblast-like strategy*" le cellule metastatiche che si distaccano dal tumore primario mostrano numerose caratteristiche proprie della transizione epiteliale-

le-mesenchimale, come l'eliminazione dei legami intercellulari, l'acquisizione di una morfologia fusiforme, simile a quella dei fibroblasti, l'aumento dell'invasività e delle interazioni stroma-cellula, e sorprendentemente un lento ritmo di divisione. Tutte queste caratteristiche portano alla formazione di cellule "mesenchimali" dal tessuto epiteliale di origine del carcinoma [33]. Le cellule metastatiche smettono di esprimere la E-caderina, acquisendo, invece, la capacità di esprimere la β -catenina. Quest'ultima è una proteina coinvolta in due processi principali durante lo sviluppo embrionale: la transizione epiteliale-mesenchimale, e la formazione di cellule staminali. L'espressione sregolata della β -catenina può conferire queste due caratteristiche alle cellule tumorali, determinando la crescita e lo sviluppo di tumori maligni [34]. Nella "*leucocyte-like strategy*" il movimento migratorio delle cellule metastatiche è di tipo "ameboide"; in questo caso non è richiesta l'azione di proteasi, in quanto le cellule riescono ad arrivare alla matrice extracellulare attraversando dei piccoli spazi [33].

La "*collective cell invasion*" è la seconda modalità con la quale le cellule possono invadere e diffondere in altri tessuti. Questo processo differisce dal processo invasivo precedentemente descritto per il fatto che le cellule metastatiche, durante l'invasione, rimangono unite tra loro mediante giunzioni intercellulari, muovendosi in foglietti bi- o tri-dimensionali, o in cluster [32]. Pertanto, le cellule metastatiche formano un "fronte" invasivo di cellule (dette "*path-generating cells*") che spiana la strada alle cellule retrostanti [33]. La "*collective cell invasion*" può avvenire secondo due differenti modalità: (1) la "*morphogenesis strategy*", e (2) la "*border cell strategy*".

Nella prima strategia di invasione, le cellule si muovono formando delle strutture a foglietto, e, nella loro espansione, continuano a mantenere il contatto con il tumore primario. Questo processo si osserva nella morfogenesi embrionale ed i suoi meccanismi sono ancora poco conosciuti.

Nella "*border cell strategy*", invece, un gruppo di cellule si stacca dal tumore primario per formare delle colonie di cellule migranti. Durante questo processo, le cellule metastatiche continuano ad aderire l'una all'altra, lasciando degli ampi spazi nella matrice extracellulare, segno che esse sono capaci di degradarla [33]. Si è visto che, spesso, questo tipo di invasione (entrambe le strategie) è caratterizzata dalla presenza della podoplanina, una glicoproteina transmembrana che pare promuova la migrazione e l'invasività delle cellule tumorali, in un processo indipendente dalla transizione epiteliale-mesenchimale. Infatti, la proteina podoplanina viene espressa soprattutto in quelle cellule che costituiscono il "fronte" invasivo, mentre nelle cellule più interne del gruppo essa non viene espressa. Questo confermerebbe il fatto che l'adesione e la diffusione di cellule nella matrice extracellulare, in particolare l'interazione con la proteina fibronectina, viene aumentata in presenza della podoplanina [35].

Infine, si evidenzia che entrambi i processi di invasione (i.e., *single* e *collective cell invasion*) prendono parte alla crescita della neoplasia primaria e alla formazione di metastasi, alternativamente o contemporaneamente [32].

1.2.3. Metastasi

Le metastasi sono impianti di tumore lontani dal tumore primitivo [28], ovvero un trasferimento di cellule maligne da una sede ad un'altra non direttamente contigua a quella del tumore primario [31]. La presenza di metastasi è un indice inequivocabile della malignità del tumore (quasi tutti i tumori maligni danno metastasi), in quanto le neoplasie benigne non metastatizzano [28].

La disseminazione dei tumori può avvenire attraverso tre principali vie: (1) disseminazione diretta attraverso le cavità e le superfici del corpo, (2) diffusione per via linfatica, e (3) diffusione per via ematica. Nella prima via, la disseminazione riguarda tutte le neoplasie che penetrano in un naturale "campo aperto", come, ad esempio, la cavità peritoneale (quella più colpita), o qualsiasi altra cavità, come quella pleurica, pericardica, subaracnoidea e/o articolare [28]. In queste sedi, il tumore cresce in ammassi cellulari, talvolta producendo grosse quantità di liquido [31].

La diffusione attraverso i vasi linfatici è la via più comune per l'iniziale disseminazione dei carcinomi, e, a volte, anche per la disseminazione dei sarcomi. Nonostante i tumori non generino vasi linfatici funzionali, essi riescono comunque ad utilizzare, per la disseminazione, quelli presenti al bordo del tumore stesso [28]. I capillari linfatici sono facilmente raggiungibili dalle cellule tumorali, rispetto ai capillari del circolo sanguigno, in quanto non sono circondati dalle membrane basali. Queste, infatti, rivestono solamente i grandi vasi linfatici. Le cellule tumorali, una volta dentro il circolo linfatico, vengono trasportate ai linfonodi più vicini, dove inizialmente si arrestano nei seni marginali, per poi estendersi a tutto il linfonodo. Questo determina un notevole ingrossamento del linfonodo interessato [31].

La diffusione per via ematica è quella che viene osservata maggiormente nei sarcomi, ma può essere riscontrata anche nei carcinomi. Nel circolo lontano dal tumore, le arterie sono più difficilmente penetrabili delle vene, data la loro parete spessa. Con l'invasione venosa, le cellule portate dal sangue seguono la circolazione venosa che drena la sede della neoplasia [28]. Prima di dare origine alle metastasi vere e proprie, le cellule tumorali in circolo devono arrestarsi nel letto vascolare del sito metastatico. Qui esse presumibilmente aderiscono alla parete dei vasi sanguigni, alle cellule endoteliali o alle membrane basali esposte da eventuali lesioni dell'endotelio [31].

Riassumendo, i processi di invasione e metastasi sono caratterizzati dal susseguirsi di una serie di eventi, in cui le cellule maligne innanzitutto invadono la membrana basale sottostante al tumore, si muovono attraverso la matrice extracellulare, penetrano attraverso i vasi sanguigni e linfatici,

devono sopravvivere nel circolo ematico o nella linfa, fuoriuscire dal sistema circolatorio e/o linfatico, ed infine dare luogo ad una metastasi in una nuova sede anatomica [31].

Il processo di metastasi dipende dall'espressione di numerose molecole di adesione da parte delle cellule neoplastiche. La presenza di tali molecole varia a seconda del tipo di tumore, a seconda del clone da cui si è originato il tumore, dallo stadio di progressione maligna e dalla tappa specifica del processo di metastatizzazione. Le principali molecole di adesione sono le integrine, le caderine e le catenine. Le **integrine** sono recettori transmembrana, ognuno composto da due subunità α e da due subunità β . Le integrine mediano l'adesione cellula-matrice e cellula-cellula; inoltre, alterano l'espressione e l'attivazione delle metalloproteinasi di matrice (e.g., collagenasi) e possono guidare questi enzimi ai loro bersagli nella matrice extracellulare. Le **caderine** sono glicoproteine transmembrana Ca^{2+} -dipendenti, le quali mediano l'adesione cellula-cellula. La caderina-E è quella meglio nota, e viene espressa sulla superficie di tutti gli epiteli mediando l'adesione cellula-cellula attraverso interazioni reciproche denominate "a cerniera". Le **catenine** α , β , γ interagiscono con la caderina-E, creando un legame meccanico tra questa ed i filamenti di actina del citoscheletro. In particolare, l'importanza delle caderine e delle catenine è dovuta alla osservazione che l'espressione di entrambe è ridotta o annullata nella maggior parte dei carcinomi: questo permette ad ogni singola cellula maligna di abbandonare la massa tumorale e dare metastasi [31].

1.2.4. Terapia dei tumori: tradizione ed innovazione

La convenzionale terapia contro i tumori verte principalmente sull'utilizzo dell'asportazione chirurgica, della radioterapia e della chemioterapia. La chemioterapia è la modalità terapeutica più utilizzata per arrestare la crescita tumorale. I farmaci utilizzati sono essenzialmente agenti citotossici o antiproliferativi che, con diverse modalità, interferiscono con le normali funzioni del DNA, e quindi con la divisione cellulare. Le principali limitazioni di questi agenti sono la mancanza di una sufficiente selettività per le cellule tumorali, responsabile di un'elevata tossicità anche per le cellule sane, ed il fenomeno della resistenza alla maggior parte di questi farmaci, soprattutto da parte dei tumori solidi [36].

Inoltre, il microcircolo tumorale è ricco di numerose barriere fisiologiche che ostacolano l'efficacia dei farmaci antitumorali. Queste sono rappresentate da una microcircolazione sanguigna organizzata in modo irregolare, un limitato trasporto attraverso l'interstizio a causa dell'alta pressione interstiziale e l'assenza della rete linfatica. Tali anomalie portano inoltre ad ipossia (a causa del fatto che la crescita esponenziale di cellule, in concomitanza con una vascolarizzazione poco differenziata e fragile, non permettono un apporto sufficiente di ossigeno), ed acidosi nel microambiente tumorale (a causa della carenza di ossigeno, con conseguente conversione del glucosio in acido lattico), che diminuiscono l'efficacia dei farmaci antitumorali [37].

Negli studi sviluppati per la cura dei tumori ha acquistato sempre più importanza la nanomedicina, che oggi si è ramificata in centinaia di branche diverse, complessivamente note come “nanotecnologie”. Ciascuna di queste branche parte dal presupposto che la struttura di particolari materiali e dispositivi su scala molecolare, possano portare enormi benefici immediati nella ricerca, e nella pratica della medicina [1]. Lo scopo è quello di proteggere la salute umana e l’ambiente, ma allo stesso tempo di preservare anche la competitività industriale e l’innovazione. Fino ad oggi, questo è il centro degli attuali dibattiti a livello globale sulle nanotecnologie e sui suoi prodotti [38].

Le nanoparticelle hanno attirato un crescente interesse da parte di ogni ramo della medicina, per la loro capacità di fornire un trasporto ed un rilascio del farmaco in un dosaggio ottimale, spesso aumentando la sua efficacia terapeutica, diminuendo gli effetti collaterali ed aumentando la *compliance* del paziente [39]. Inoltre, tra i vantaggi è possibile includere anche la possibilità di utilizzare materiali biocompatibili (e.g., oro), e l’opportunità di variare alcune caratteristiche delle particelle, come dimensioni, forma, modificazioni della superficie, e funzionalizzazione con ligandi sito-specifici. Questo ha permesso di aumentare l’emivita delle nanoparticelle circolanti, la biodistribuzione, e l’accumulo nei tessuti, riducendo il livello di assorbimento non specifico, e ritardando il processo di opsonizzazione [39].

La dimensione delle particelle influenza la loro distribuzione nell’organismo. Si è visto, per esempio, che particelle lipidiche delle dimensioni di 200-300 nm vengono catturate dal sistema fagocitico mononucleare del fegato e della milza in numero superiore rispetto a particelle di dimensioni inferiori (i.e., 25-50 nm). Inoltre, è stato osservato che i liposomi con un diametro superiore ai 100 nm, la *clearance* aumenta con l’aumentare delle dimensioni [40]. Un altro studio, che ha valutato la biodistribuzione di nanoparticelle d’oro nei ratti, ha mostrato che il maggiore accumulo si ha nel fegato, per nanoparticelle di 1,4 e 200 nm; l’accumulo di particelle di dimensioni dai 18 ai 200 nm, invece, non è stato influenzato dalle dimensioni. Infine, l’*uptake* di particelle del diametro di 1,4-5 nm si è mostrato dimensione-dipendente, aumentando vertiginosamente con il diminuire delle dimensioni [41].

Le nanoparticelle, data la loro grande versatilità nella forma, dimensione, e composizione, possono essere sfruttate anche nella cura dei tumori, grazie alla capacità di mettere in atto un *targeting* attivo e passivo. Il primo è reso possibile grazie alla capacità delle nanoparticelle di legare, nella loro superficie, dei particolari gruppi funzionali. Questi sono in grado di riconoscere il sito in cui è in atto la patologia, curare e monitorare la risposta al trattamento farmacologico. Un endotelio altamente permeabile, ed uno scarso drenaggio linfatico, rendono possibile, invece, l’accumulo passivo delle nanoparticelle nel sito tumorale (*targeting* passivo) [37].

Tra i materiali utilizzati per la sintesi delle nanoparticelle è diffusa la silice, che è sempre più accettata nel campo della medicina per la sua varietà di applicazioni terapeutiche, diagnostiche e di *imaging*. Negli ultimi anni sono aumentati gli studi *in vivo* ed *in vitro* che hanno indagato sugli effetti tossici di nanoparticelle di silice. È emerso che l'esposizione a tali nanoparticelle promuove un aumento delle specie reattive dell'ossigeno, un aumento di rilascio delle citochine e l'apoptosi nei macrofagi e in altre cellule umane [42].

Le nanoparticelle di silice offrono, tuttavia, molti vantaggi rispetto ad altri materiali, quali elevata purezza, porosità, trasparenza ottica, ed omogeneità. Inoltre, un gran numero di studi le promuovono a piattaforme efficaci per il rilascio del farmaco, data la loro capacità di sfuggire agli endosomi e passare attraverso membrana cellulare, per rilasciare il loro carico nel citoplasma [43].

Recentemente l'eparina (H), l'eparina a basso peso molecolare (LMWH), ed alcune sue specie chimicamente modificate (MH), sono state riconosciute sia come agenti anti-angiogenesi che come vettori capaci di legare proteine ed enzimi espressi nel microambiente tumorale. Alcuni nostri collaboratori hanno coniugato l'eparina (H) a delle nanoparticelle di silice [43], e questo sistema è stato da noi testato su due diversi fenotipi cellulari (Cap. 6). In campo oncologico, si ritiene che la coniugazione dell'eparina con le nanoparticelle di silice possa migliorare il loro ruolo di nanocarrier, e facilitare sia il *targeting* che gli aspetti terapeutici [43].

Le nanoparticelle d'oro possono essere utilizzate, nella terapia antitumorale, per il trattamento ipertermico. Si è visto, infatti, che l'ipertermia induce morte apoptotica nelle cellule di diversi tessuti, e, normalmente, questo trattamento viene utilizzato in combinazione con la chemioterapia e la radioterapia. Tuttavia, se esposti al calore, i vasi sanguigni del microcircolo tumorale tendono a restringersi. Questo fenomeno, assieme alla difficoltà di raggiungere, col calore, i tumori situati in profondità, permette di ipotizzare che l'utilizzo di nanoparticelle di piccole dimensioni, come quelle d'oro, possa rappresentare una soluzione ai problemi incontrati. Le particelle metalliche, inoltre, se esposte ad un raggio laser tendono a sviluppare calore [44]. Studi *in vivo* hanno dimostrato che le particelle d'oro (nanoshell, 100 nm) raggiungono il sito tumorale a 24 h dall'iniezione endovenosa, e, in seguito ad esposizione ad un raggio laser, è stato registrato un notevole aumento della temperatura (37°C) nel tumore [44]. Altri studi [45] hanno riportato che i nanorod d'oro sono stati utilizzati per terapie fototermiche *in vivo*. In questo caso, una sola iniezione endovenosa di particelle si è mostrata in grado di distruggere il tumore.

Per tutte queste proprietà appartenenti alle nanoparticelle ed alle nanotecnologie (i.e., piccole dimensioni, possibilità di utilizzo di materiali biocompatibili per la loro sintesi, e di intraprendere terapie innovative come l'ipertermia), oltre che per la pressante richiesta di nuove terapie nel campo delle cure oncologiche, si scelto di sintetizzare, ed utilizzare, vari tipi di nanoparticelle inorganiche ed organiche, e gli effetti che la loro esposizione provoca su fenotipi cellulari sani e tumorali.

1.3. Bibliografía

- [1] Freitas, A.R.Jr. What is nanomedicine? *Nanomedicine* 1(1),2-9 (2005).
- [2] De Jong, W.H., Borm, P.J. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int. J. Nanomedicine* 3(2),133-149 (2008).
- [3] Nessim, G.D. Properties, synthesis, and growth mechanisms of carbon nanotubes with special focus on thermal chemical vapor deposition. *Nanoscale* 2(8), 1306-1323 (2010).
- [4] Nelson, S.M., Mahmoud, T., Beaux, M.2nd, Shapiro, P., McIlroy, D.N., Stenkamp, D.L. Toxic and teratogenic silica nanowires in developing vertebrate embryos. *Nanomedicine* 6(1), 93-102 (2010).
- [5] Leung, K. on Molecular Imaging and Contrast Agent Database, 2008.
- [6] Zhang, X.-D., Wu, H.-Y., Wu, D, Wang, Y.-Y., Chang, J.-H., Zhai, Z.-B., Meng, A.-M., Liu, P.-X., Zhang, L.-A., Fan, F.-Y. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. *Int. J. Nanomedicine* 5(5):771-781 (2010).
- [7] Sriram, M.I., Kanth, S.B.M., Kalishwaralal, K., Gurunathan, S. Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model. *Int. J. Nanomedicine* 5(5), 753-762 (2010).
- [8] Sekhon, B.S., Kamboj, S.R. Inorganic nanomedicine – part I. *Nanomedicine* 6(4), 516-522 (2010).
- [9] Sekhon, B.S.; Kamboj, S.R. Inorganic nanomedicine – part II. *Nanomedicine* 6(5), 612-618 (2010).
- [10] Nakamura, T., Tamura, A., Murotani, H., Oishi, M., Jinji, Y., Matsuishi, K., Nagasaki, Y. Large payloads of gold nanoparticles into the polyamine network core of stimuli-responsive PEGylated nanogels for selective and noninvasive cancer photothermal therapy. *Nanoscale* 2(5), 739-746 (2010).
- [11] Zong, J., Zhu, Y., Yang, X., Li, C. Preparation of monodispersed mesoporous silica spheres with tunable pore size and pore-size effects on adsorption of Au nanoparticles and urease. *Mater. Sci. Eng C* 31(2), 166-172 (2011).
- [12] Rosenholm, J. M., Sahlgren, C., Lindén, M. Towards multifunctional, targeted drug delivery systems using mesoporous silica nanoparticles – opportunities & challenges. *Nanoscale* 2(10) 1870-1883, (2010).
- [13] Urbán-Morlán, Z., Ganem-Rondero, A., Melgoza-Contreras, L.M., Escobar-Chávez, J.J., Nava-Arzaluz M.G., Quintanar-Guerrero, D. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing cyclosporine by the emulsification-diffusion method. *Int. J. Nanomedicine* 7(5), 611-620, (2010).
- [14] Dong, X., Mattingly, C.A., Tseng, M.T., Cho, M.J., Liu, Y., Adams, V.R., Mumper, R.J. Doxorubicin and Paclitaxel-loaded lipid-based nanoparticles overcome multi-drug resistance by inhibiting P-gp and depleting ATP. *Cancer Res* 69(9), 3918-3926 (2009).
- [15] Thanh, N.T.K., Green, L.A.W. Functionalization of nanoparticles for biomedical applications. *Nano Today* 5(3), 213-230 (2010).
- [16] Moros, M., Pelaz, B., López-Larrubia, P., García-Martin, M.L., Grazú, V., de la Fuente, J.M. Engineering biofunctional magnetic nanoparticles for biotechnological applications. *Nanoscale* 2(9), 1746-1755 (2010).
- [17] Branda, F., Silvestri, B., Luciani, G., Costantini, A., Tescione, F. Synthesis structure and stability of amino functionalized PEGylated silica nanoparticles. *Coll Surf A* 367(1-3),12-16, (2010).

- [18] Sun, D., Yang, K., Zheng, G., Li, Z., Cao, Y. Study on effect of peptide-conjugated near-infrared fluorescent quantum dots on the clone formation, proliferation, apoptosis, and tumorigenicity ability of human buccal squamous cell carcinoma cell line BcaCD885. *Int. J. Nanomedicine* 5, 401-405 (2010).
- [19] Smith, A.M., Wen, M.M., Nie, S. Imaging dynamic cellular events with quantum dots. The bright future. *Biochem (Lond)* 32(3), 12 (2010).
- [20] Shen, M., Shi, X. Dendrimer-based organic/inorganic hybrid nanoparticles in biomedical applications. *Nanoscale* 2(9), 1596-1610 (2010).
- [21] Baker, J.R.Jr. Dendrimer-based nanoparticles for cancer therapy. *Am Soc Hematol Educ Prog* 708-719 (2009).
- [22] Shi, X., Sun, K., Baker, J.R.Jr. Spontaneous formation of functionalized dendrimer-stabilized gold nanoparticles. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces* 112(22), 8251-8258 (2009).
- [23] Laurienzo, P. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: an overview. *Mar Drugs* 8(9), 2435-2465, (2010).
- [24] Jeong, B., Bae, Y.B., Lee, D.S., Kim, S.W. Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems. *Nature* 388(6645), 860-862 (1997).
- [25] Xiang, S.D., Selomulya, C., Ho, J., Apostolopoulos, V., Plebanski, M. Delivery of DNA vaccines: an overview on the use of biodegradable polymeric and magnetic nanoparticles. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2(3), 205-218 (2010).
- [26] Baroli, B., Ennas, M.G. Loffredo, F., Isola, M., Pinna, R., Lòpez-Quintela, M.A. Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin. *J Invest Dermatol* 127(7), 1701-1712 (2007).
- [27] Villaverde, A. Nanotechnology, bionanotechnology and microbial cell factories. *Microb Cell Fact* 9, 53 (2010).
- [28] Robbins, S.L., Cotran, R.S. *Le basi patologiche delle malattie. Vol. 1.* (Elsevier Masson, settima edizione, 2006), pp. 269-342.
- [29] Kessenbrock, K., Plaks, V., Werb, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141(1), 52-67 (2010).
- [30] Egeblad, M., Nakasone, E.S., Werb, Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Developmental cell* 18(6), 884-901 (2010).
- [31] Rubin, E., Gorstein, F., Rubin, R., Schwarting, R., Strayer, D. *Patologia, fondamenti clinico-patologici in medicina.* (Casa Editrice Ambrosiana, 2006), pp. 178-230.
- [32] Veiseh, O., Kievit, F., Ellenbogen, R.G., Zhang, M. Cancer cell invasion: treatment and monitoring opportunities in nanomedicine, *Adv Drug Deliv Rev* 63(8), 582-96 (2011).
- [33] Yilmaz, M., Christofori, G, Lehembre, F. Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. *Trends Mol Med* 13(12), 535-541 (2007).
- [34] Brabletz, T., Hlubek, F., Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hiendlmeyer, E., Jung, A., Kirchner, T. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and β -catenin. *Cells tissues organs* 179(1-2), 56-65 (2005).
- [35] Wicki, A., Christofori, G. The potential role of podoplanin in tumour invasion. *Br J Cancer* 96(1), 1-5 (2007).
- [36] Clementi, F., Fumagalli, G., Nicosia, F., Paoletti, R. *Farmacologia generale e molecolare.* (Utet, terza edizione, 2004), p. 411, 427.
- [37] Danquah, M.K., Zhang, X.A., Mahato, R.I. Extravasation of polymeric nanomedicines across tumor vasculature. *Adv Drug Deliv Rev* 63(8), 623-639 (2011).

- [38] Hankin S., Boraschi D., Duschi A., Lehr C.M., Licgtenbelt H. Towards nanotechnology regulation - Publish the unpublishable. *Nano Today* 6(3), 228-231 (2011).
- [39] Alexis F., Pridgen E., Molnar L.K., Farokhzad O.C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm* 5(4), 505–515 (2008).
- [40] De Jong, W.H., Borm, P.J.B. Drug and nanoparticles: application and hazards. *Int J Nanomedicine* 3(2), 133–149 (2008).
- [41] Hirn, S., Semmler-Behnke, M., Schleh, C., Wenk, A., Lipka, J., Schäffler, M., Takenaka, S., Möller, W., Schmid, G., Simon, U., Kreyling, W.G. Particel size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Eur J Pharm Biopharm* 77(3), 407-416 (2011).
- [42] Corbalan, J.J., Medina, C., Jacoby, A., Malinski, T., Radomski, M.W. Amorphous silica nanoparticles trigger nitric oxide/peroxynitrite imbalance in human endothelial cells: inflammatory and cytotoxic effects. *Int J Nanomedicine* 6, 2821–2835 (2011).
- [43] Silvestri, B., Pezzella, A., Luciani, G, Costantini, A., Tescione, F., Branda, F. Heparin conjugated silica nanoparticles synthesis. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 32(7), 2037-2041 (2012).
- [44] Jain, S., Hirst, D.G., O’Sullivan, J.M. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *British J Radiol* 85(1010) 101–113 (2012).
- [45] Alkilany, A.M., Murphy, C.J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *J Nanopart Res* 12(7), 2313-2333 (2010).

COLTURA DI CHERATINOCITI UMANI

2.1. Introduzione

I cheratinociti umani sono le cellule che si ritrovano in maggior numero nell'epidermide, ed essi sono organizzati in cinque differenti strati (dal più interno al più esterno): strato basale, strato spinoso, strato granuloso, strato lucido e strato corneo. I cheratinociti presenti nei diversi strati variano in forma e contenuto del citoplasma, fino a diventare delle cellule anucleate dette corneociti [1].

I cheratinociti utilizzati per i nostri esperimenti sono delle cellule umane, adulte (HEKa), normali che sono state coltivate in terreno privo di siero, secondo quanto consigliato dalla Life Technologies™ [2]. Anche un altro fornitore indica che i cheratinociti adulti normali vengono coltivati in un terreno privo di siero, ricostituito con estratto pituitario bovino, fattore di crescita epidermico, insulina, idrocortisone, epinefrina, e transferrina [3]. Inoltre, è possibile aggiungere al mezzo di coltura anche antibiotici (gentamicina ed anfotericina-b), l'aggiunta dei quali, tuttavia, non è necessaria per crescita delle cellule [3, 4]. Inoltre, un'altra casa produttrice consiglia la coltura in un terreno privo di siero, formulato per inibire la crescita dei fibroblasti [5, 6], che deve essere ricostituito mediante l'aggiunta di estratto pituitario bovino, fattore di crescita trasformante- α , L-glutammina, idrocortisone emisuccinato, insulina, epinefrina, ed apotransferrina [7].

La concentrazione di semina consigliata per la coltura dei cheratinociti va dalle 2.500 cellule/cm² [2, 7] alle 3.500 cellule/cm² [3], fino ad una massima concentrazione di 5.000 cellule/cm² [7].

Per la loro subcultura, alcuni fornitori reputano fondamentale l'utilizzo di tampone senza Ca²⁺ e Mg²⁺, prima dell'aggiunta della tripsina [3, 7]. Quest'ultima, inoltre, è bene che venga utilizzata a temperatura ambiente, in quanto, se troppo fredda, potrebbe risultare non attiva [3, 7].

In bibliografia sono riportati alcuni esempi che contemplano l'utilizzo dei cheratinociti per esperimenti di tossicità in vitro. In particolare, sono state usate nanoparticelle di silice su cellule

normali [8-11] o immortalizzate [11-13], e nanoparticelle d'oro [14, 15] su cellule normali. Inoltre, altri studi riportano che i cheratinociti sono stati esposti a nanomateriali, [16-18], a sostanze utilizzate per terapie tumorali [19], ed a molecole utilizzate come carrier di farmaci [20]. In alcuni casi, per la misurazione della vitalità cellulare, è stato utilizzato il Cell Titer Blue e tempi di esposizione uguali a quelli previsti nei nostri esperimenti [16, 20]. In altri lavori [18,19], il tempo di reazione con CTB non è stato specificato.

2.2. Materiali

2.2.1. Prodotti per la coltivazione delle cellule

I cheratinociti umani, adulti (HEKa, Life TechnologiesTM, sesso: donna; età: 32; passaggio P1; lot. 709919; n. cat. C0055C [21]) sono stati coltivati con i seguenti reagenti: un neutralizzatore di tripsina (TN, Life TechnologiesTM, n. cat. R002100); un siero bovino fetale (FBS, Life TechnologiesTM, n. cat. 10270); i supplementi necessari al terreno di coltura (HKGS-kit, Life TechnologiesTM, n. cat. S001K); un tampone D-PBS senza calcio e magnesio (Euroclone[®], n. cat. ECB4004L); un tampone HBSS senza calcio e magnesio (Life TechnologiesTM, n. cat. 14175053); il terreno di coltura Epilife[®], con calcio 60 mM (Life TechnologiesTM, n. cat. MEPI500CA); una soluzione di tripsina 0,025%/EDTA 0,01% (TE, Life TechnologiesTM, n. cat. R001100), ed il trypan blue 0,4 % p/v (TB, Sigma-Aldrich[®], n. cat. T8156). È stata inoltre utilizzata un'anidride carbonica (CO₂) ad alto grado di purezza (AirLiquide, purezza 99,95%, n. cat. N35).

Per il congelamento delle cellule sono stati utilizzati i seguenti reagenti: il dimetilsolfossido (DMSO, filtrato sterilmente e certificato come adatto per le applicazioni biotecnologiche, Sigma, n. cat. D2438); il glicerolo (Sigma-Aldrich[®], n. cat. G7757); un mezzo di congelamento senza siero, contenente DMSO (8,7%) e metilcellulosa (4,3 %) in terreno MEM¹ [22, 23] (CFM-1, Sigma, n. cat. C6295); un secondo mezzo di congelamento senza siero e senza DMSO (CFM-2, Sigma, n. cat. C2639); un siero testato per cellule staminali (MCGS, PoieticsTM, n. cat. PT-4106E); un siero di vitello (fetale) (FC, Euroclone[®], n. cat. ECS0180L), ed un ultimo mezzo di congelamento chiamato Synth-a-Freeze[®] (SaF, Life TechnologiesTM, n. cat. A1254201).

Per la pulizia e la disinfezione degli spazi appositi sono stati utilizzati: l'isopropanolo (Sigma-Aldrich[®], n. cat. 33539-4x2,5L-R), il Lysoform (Unilever), e l'Umonium³⁸ medical spray (Laboratoire Huckert's International, n. cat. PF12209). L'isopropanolo utilizzato per la disinfezione è stato sempre diluito al 70% v/v con acqua Milli-Q. L'acqua distillata e Milli-Q sono state prodotte nel nostro laboratorio (si veda oltre).

¹ Minimum Essential Medium

Le cellule HEKa sono state mantenute in coltura oppure crio-preservate in azoto liquido (N₂L, grado tecnico, SOL spa) a -196°C. TN, TE, FBS, HKGS-kit, CFM-1, CFM-2, MCGS, FC, SaF, e le loro aliquote (si veda oltre) sono state conservate a -21°C. Il terreno Epilife[®] è stato conservato a 4°C. D-PBS, HBSS, TB, DMSO, il glicerolo, l'isopropanolo, il Lysoform e l'Umonium³⁸ sono stati conservati a temperatura ambiente (i.e., 20-25°C). Inoltre, CFM-1, CFM-2, e SaF sono sempre stati utilizzati a 4°C, mentre TN e TE a 4-20°C. Il TB precipita nel tempo, pertanto occorre filtrarlo (0,22 µm) prima dell'utilizzo.

2.2.2. Protezione e sicurezza

Gli esperimenti sono stati eseguiti indossando i necessari dispositivi di protezione individuali (DPI): camice, guanti monouso in lattice o nitrile e, durante il lavoro asettico, una maschera facciale. L'accesso al laboratorio è avvenuto sempre indossando calzature perfettamente pulite, o sovrascarpe monouso.

In particolare si riporta che le HEKa, sebbene i test per il micoplasma, l'epatite B e C, ed il virus HIV-1 siano stati dichiarati negativi dal fornitore [21], sono state manipolate con le dovute precauzioni. Il FBS è stato testato per vari virus e micoplasma dal fornitore [24], con esito negativo; nonostante questo, essendo un derivato del sangue, può essere vettore degli agenti patogeni ematici, pertanto va maneggiato con precauzione. Il TB è marcato R45 (potenzialmente cancerogeno), pertanto è stato manipolato con estrema cautela. Il DMSO è un composto organico che, se giunge a contatto con la cute, determina una riorganizzazione dei lipidi dello strato corneo, quindi una maggiore facilità nell'assorbimento delle sostanze, anche tossiche, attraverso l'epidermide. Inoltre, le esposizioni prolungate al DMSO possono causare danni alla retina e al fegato [25, 26].

2.2.3. Materiale consumabile in plastica

Il materiale in plastica, sterile e non, utilizzato per i nostri esperimenti comprende: un contenitore per il congelamento delle cellule (Nunc, n. cat. 5100-0001); delle crio-vial sterili di volume 4 mL (Corning); delle fiasche sterili da 25 e 75 cm² (Corning, Euroclone[®], TPP), 175 cm² (Corning), e da 182 cm² (Euroclone[®]); degli imbuti filtranti con pori di diametro 0,22 µm (TPP); dei microtubi da centrifuga non sterili da 1,5 mL; le piastre da 24 pozzetti, sterili (Euroclone[®]); delle pipette in plastica, sterili, da 10 o 25 mL (Corning, Euroclone[®]); dei puntali col filtro, sterili, di volume 1000, 200, e 20 µL; dei puntali non sterili, di volume 1000, 200, e 20 µL, da usare prima o dopo sterilizzazione; e dei tubi in plastica, sterili, di volume 50 e 15 mL (Corning, TPP), 1,5 mL (TPP), e 1,2 mL (Corning).

2.2.4. Materiale consumabile in vetro

Il materiale in vetro da noi utilizzato comprende: delle bottiglie in vetro Duran[®] (500 mL, collo: GL 45), un emocitometro (Hausser Scientifics, n. cat. 1492), e delle pipette Pasteur da 150 e 250 mm.

2.2.5. Strumenti

Per i nostri esperimenti abbiamo utilizzato gli strumenti riportati qui di seguito: un'autoclave (PBI International S.p.A., modello: beta 25 easy-lock); un bagno termostato (Julabo, modello: TW 12); una cappa a flusso laminare (ThermoFisher Scientific, modello: MSC 1 - Advantage); una centrifuga da banco (ThermoFisher Scientific, modello: Heraeus Maegafuge 11R); un contenitore per l'azoto liquido (Air Liquide, modello: GT35); un freezer, - 85°C (KW apparecchi scientifici, modello: K56HS); un frigo-freezer combinato (Indesit, modello: BAAN13; -20°C); un frigorifero (Indesit, modello: SA300L); un freezer a pozzetto (Ignis, modello: ICF221; -28 - -30°C); un incubatore a CO₂ (ThermoFisher Scientific, modello: BB15); delle micropipette a volume variabile (Gilson, Eppendorf); due microscopi invertiti (Leica microsystems, modello: DMIL LED (per acquisizione di immagine) / BEL, modello: INV-100 (per routine)); due pipettatori (Brand, modello: Accu-jet / Biohit, modello: Midi Plus); una pompa da vuoto (KNF, modello: N86KT.18), ed un sistema per la produzione di acqua ultrapura, con il quale è stata prodotta l'acqua distillata e Milli-Q (Siemens, modello: LaboStar[™] TWF UV 7).

2.2.6. Analisi dei dati

I dati sperimentali sono stati analizzati, ed opportunamente presentati utilizzando i seguenti programmi: Microsoft Office Excel 2007, Origin 6.0, ed Image Tool 3.00. L'acquisizione delle immagini al microscopio invertito è avvenuta mediante il software Leica Application Suite V3.

2.3. Metodi

2.3.1. Sterilizzazione e pulizia del materiale e della strumentazione

I puntali senza filtro, le pipette Pasteur da 250 mm, e le bottiglie in vetro Duran[®] sono state sterilizzate in autoclave, a 121°C, per 15 minuti, e ad una pressione di 1 bar, prima dell'utilizzo. L'acqua Milli-Q, all'occorrenza, è stata ugualmente sterilizzata in autoclave, all'interno delle bottiglie in vetro Duran[®].

L'incubatore è stato pulito interamente (i.e., ripiani e pareti interne) una volta al mese con sapone neutro, Umonium[®], ed isopropanolo (70% v/v). L'acqua presente al suo interno durante il funzionamento è acqua Milli-Q, precedentemente sterilizzata. Sul fondo dell'incubatore, nell'acqua, sono stati riposti alcuni frammenti di rame, per evitare la sua contaminazione microbica [27].

La cappa a flusso laminare è stata accuratamente disinfettata, all'inizio e alla fine di ogni sessione di lavoro, con isopropanolo (70% v/v). La pulizia è avvenuta mediante un panno di carta imbevuto di isopropanolo (70% v/v), con il quale sono stati disinfettati il piano di lavoro ed il vetro (parte interna ed esterna). Al termine del lavoro, inoltre, la disinfezione con isopropanolo (70% v/v) è stata seguita da un ciclo di 15 minuti di raggi UV. Oltre a questa pulizia di routine, la cappa è stata pulita in maniera più accurata una volta al mese, lavando piano di lavoro, pareti interne, vetro, e la parte sotto il piano di lavoro, con sapone neutro, Umonium[®], isopropanolo, ed un ciclo finale di raggi UV di 15 minuti.

I banconi adiacenti alla cappa sono stati puliti con un panno umido prima di ogni accensione della cappa, per evitare l'aspirazione di polvere e sporcizia all'interno della stessa. Inoltre, i banconi da lavoro ed il pavimento sono stati mantenuti costantemente puliti e disinfettati.

Il materiale che è stato portato all'interno della cappa a flusso laminare durante una sessione di lavoro (e.g., pipettatore, tubi in plastica, scarabattole con puntali) è stato accuratamente sterilizzato con isopropanolo (70% v/v).

L'acqua distillata presente nel bagno termostato a 37°C è stata supplementata con il 20% di una soluzione contenente tensioattivi non-ionici e cationici (Lysoform) per evitare la sua contaminazione microbica [28].

2.3.2. Preparazione del neutralizzatore della tripsina

È possibile preparare il neutralizzatore della tripsina utilizzando tampone e siero. Questo TN verrà indicato, per distinguerlo da quello acquistato dalla Life Technologies[™], con l'acronimo TN-lab. Il procedimento di preparazione è molto semplice: da una bottiglia di tampone senza calcio e magnesio (sia esso HBSS o D-PBS) sono stati prelevati sterilmente 50 mL. Questo volume è stato poi sostituito con 50 mL di FBS. La soluzione così ottenuta è stata filtrata con imbuto filtrante (TPP), aliquotata, e congelata.

2.3.3. Aliquotazione dei reagenti per la coltura cellulare

La maggior parte dei reagenti utilizzati sono stati suddivisi in aliquote e conservati nel freezer a -21°C. L'aliquotazione dei reagenti è stata necessaria in quanto alcuni di essi si deteriorano se subi-

scono eccessivi cicli di congelamento e scongelamento [22, 24, 29-32]. Per questo motivo i volumi delle aliquote sono stati scelti in modo che una singola porzione potesse soddisfare il fabbisogno di un esperimento o di un set di esperimenti, e non dovesse venir ricongelata.

Per qualsiasi supplemento/reagente da aliquotare, si è proceduto in due diversi modi. (i) Il flacone di reagente è stato spostato dal freezer al frigo (4°C) dove è stato lasciato per tutta la notte, e la mattina dopo si è proceduto all'aliquotazione. (ii) In alternativa, si è immerso il flacone nel bagno termostato a 37°C, ed è stato scongelato quasi completamente il contenuto. Quando è rimasta una piccola parte ancora ghiacciata, il flacone è stato trasferito nella cappa. Questo ha assicurato che la temperatura del reagente non eccedesse i 37°C.

A seconda del volume totale e del numero di aliquote da preparare, si sono disposti nel piano di lavoro i tubi di plastica, sterili, che avrebbero dovuto contenere le aliquote. In ciascun tubo è stato sempre annotato, con un pennarello indelebile, il nome del reagente e la casa produttrice, il numero di catalogo e di lotto, la data di aliquotazione e la data di scadenza, nonché il nome dell'operatore.

Prima di dispensare una qualsiasi quantità dal flacone originale ai tubi in plastica, è stato necessario ridisperderne omogeneamente il contenuto: ciò si è ottenuto pipettando su e giù alcuni millilitri di contenuto con una pipetta in plastica, sterile, evitando, in questa operazione, la formazione di schiuma. Quando il reagente è stato omogeneamente disperso, si è proceduto alla preparazione delle aliquote. Queste, infine, sono state conservate in freezer a -21°C.

Nella Tabella 2.1 sono riportati i reagenti che normalmente sono stati aliquotati ed il numero di aliquote prodotto con i rispettivi volumi.

Tabella 2.1. Numero e volumi delle aliquote prodotte.

Reagente	Volume originale (mL)	N. aliquote	mL/aliquota
TE	100	8	12,5
TN	100	8	12,5
TN-lab	500	10	50
SaF	50	12	4,2
CFM-1	50	12	4,2
CFM-2	50	12	4,2

2.3.4. Preparazione del terreno supplementato

Il terreno di coltura ricostituito è stato preparato come di seguito schematizzato. Il flacone di terreno Epilife® è stato portato nella cappa sterile; 30 mL di terreno sono stati dispensati in un tubo di plastica, sterile. Sono stati scongelati i supplementi (i.e., HKGS-kit) nel bagno termostato a 37°C (Par. 2.2.1). Il loro contenuto è stato pipettato sterilmente nel flacone di terreno, e le vial contenen-

ti i supplementi sono state sciacquate con il terreno precedentemente aliquotato almeno 5 volte, in modo da assicurarsi il completo recupero degli stessi. Infine, il terreno è stato filtrato con imbuto filtrante (TPP) montato su una bottiglia Duran[®], precedentemente sterilizzata. Il terreno completamente ricostituito contiene, quindi, estratto pituitario bovino (0,2%), insulina bovina (5 µg/mL), idrocortisone (0,18 µg/mL), transferrina bovina (5 µg/mL), fattore di crescita umano epidermico (0,2 ng/mL), e una soluzione di gentamicina (0,25 µg/mL)/amfotericina-b (0,01 mg/mL).

Il terreno è stato, quindi, conservato a 4°C, al buio, fino al successivo utilizzo. La casa produttrice consiglia di utilizzare il terreno entro un mese dall'aggiunta dei supplementi [33].

2.3.5. Scongellamento e semina di una crio-vial di cellule

Sono stati usati due metodi di scongelamento. Quello riportato qui di seguito verrà indicato come Metodo 1. La crio-vial contenente le cellule è stata estratta dal bidone dell'azoto liquido e scongelata a 37°C nel più breve tempo possibile, in modo da minimizzare i danni alle cellule. Successivamente, la crio-vial è stata trasferita nella cappa sterile, ed il suo contenuto è stato ridisperso accuratamente mediante l'utilizzo di una micropipetta (1000 µL).

Per verificare il numero di cellule presenti per unità di volume dopo scongelamento, si è proceduto alla conta cellulare utilizzando il "metodo di esclusione del TB" [34]. Questo metodo è così chiamato in quanto il TB penetra istantaneamente all'interno delle cellule morte, che al microscopio appariranno come delle bollicine di colore blu acceso. Al contrario, le cellule vive (o vitali) appaiono biancastre. Pertanto è molto semplice discernere tra le cellule vive e quelle morte. Il conteggio deve essere effettuato nel più breve tempo possibile, in quanto il TB dopo cinque minuti inizia a penetrare all'interno delle cellule [34, 35], quindi il numero di cellule vive viene falsato. Per alcuni scopi (Par. 2.4.3) è importante contare sia il numero di cellule vive sia quello delle cellule morte.

Pertanto, sono stati prelevati 12 µL di dispersione cellulare accuratamente ridispersa, i quali sono stati pipettati in un microtubo contenente un uguale volume di TB (diluizione 1:1). Subito dopo la miscelazione, 10 µL di dispersione cellulare in TB, sono stati pipettati in ciascuna delle due camere dell'emocitometro. È bene precisare che i 10 µL pipettati occupano anche lo spazio circostante il quadrato riportato in Figura 2.1, mentre il volume compreso all'interno di tale quadrato è di 0,1 mm³ [36]. Per la stima del numero di cellule contenute in un millilitro occorre contare le cellule presenti nel quadrato centrale e nei 4 quadrati situati agli spigoli di ciascuna camera. Si noti come ciascun quadrato laterale sia a sua volta formato da 16 piccoli quadrati, mentre quello centrale da 25 piccoli quadrati (Fig. 2.1).

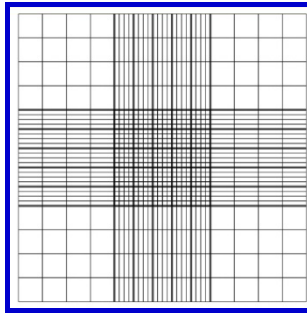


Figura 2.1. Rappresentazione di una camera dell'emocitometro. Adattato da [37].

Per rendere la conta ripetibile, si è seguita la regola secondo la quale si contano le cellule nel bordo in alto e a sinistra di ciascun quadrato considerato (i.e., cerchi azzurri in Fig. 2.2), mentre non si contano quelle nel bordo in basso e a destra (i.e., croci in Fig. 2.2) [38]. Questa regola è rappresentata nella Figura 2.2.

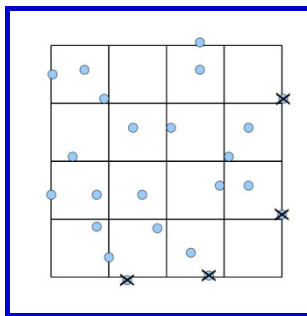


Figura 2.2. Regola per la conta cellulare nell'emocitometro. Adattato da [39].

Infine, è sempre meglio ripetere la conta due volte, prelevando, quindi, altri 12 μL di dispersione cellulare, diluendo in TB e seguendo il procedimento descritto sopra. Questo serve per avere una stima più precisa della concentrazione delle cellule.

Per ottenere il numero di cellule, vive o morte, presenti in 1 millilitro occorre svolgere il seguente calcolo:

$$n.\text{cell./mL} = \text{media cellule in ogni quadrato} \times \text{fattore di diluizione} \times 10^4$$

La conta delle cellule vive permette di calcolare la percentuale di recovery, ossia la percentuale di cellule che viene ritrovata viva al momento dello scongelamento, rispetto al numero di cellule vive congelate.

La somma del numero di cellule vive e morte contate al momento dello scongelamento può, tuttavia, non coincidere con il numero di cellule congelate. Ciò può essere dovuto a diversi fattori

quali: (i) passaggi aggiuntivi di centrifugazione-diluizione-dispensazione tra la conta e l'effettivo trasferimento nella crio-vial che sarà congelata, (ii) eventuale lisi delle cellule durante il congelamento o lo scongelamento rapido con liberazione del contenuto citoplasmatico, (iii) differenze tra cellule normali e tumorali, e (iv) fattori imputabili ad errori umani. Per questo motivo può essere utile contare anche il totale delle cellule vive e morte scongelate e, rispetto a questo, valutare la percentuale di recovery di vive e morte.

A seconda della concentrazione cellulare ottenuta, e della concentrazione di semina consigliata per il tipo cellulare in esame, sono state preparate le fiasche necessarie per la coltura. La concentrazione di semina indica il numero di cellule vive da seminare per cm² di superficie coltivabile. Nel caso dei cheratinociti, la Life Technologies™ consiglia una precisa densità di semina [2], riportata in Tabella 2.2. Dopo aver calcolato i volumi di cellule da dispensare nelle fiasche a partire dalla quantità di cellule vive presenti nella crial appena scongelata, il terreno necessario è stato aliquotato in tubi di plastica, sterili. I volumi sono riportati in Tabella 2.2.

Tabella 2.2. Parametri per la semina dei cheratinociti.

	Quantità/cm ²	Quantità/25 cm ²	Quantità/75 cm ²
densità di semina (n. cell.)	2.500	62.500	187.500
volume terreno (mL)	0,2	5	15

I tubi col terreno sono stati riposti prima nel bagno a 37°C (ca. 15 minuti) e poi nell'incubatore (ca. 30 minuti), in modo che il mezzo di coltura venisse equilibrato² sia per la temperatura che per la concentrazione di CO₂. Quando si sono usati tubi con tappo privo di filtro, il tappo è stato leggermente svitato, per permettere l'ingresso della CO₂. Al termine di questa fase, nelle fiasche è stato pipettato sterilmente prima il terreno, e poi le cellule; la fiasca è stata ben chiusa e poi fatta ondeggiare in modo che la dispersione di terreno e cellule coprisse la superficie di adesione, e le stesse cellule si ripartissero uniformemente in essa. La fiasca è stata, infine, riposta nell'incubatore, a 37°C, con il 5% di CO₂, e 100% di umidità relativa (RH).

Un secondo metodo di scongelamento, il quale verrà indicato come Metodo 2, prevede la diluizione della dispersione cellulare in pochi mL di terreno, la successiva centrifuga (7 minuti, 180 g, 20°C) e ridispersione del pellet in terreno e successiva conta. Questo metodo è stato utilizzato perché consigliato da alcune case produttrici dalle quali sono stati acquistati i mezzi di congelamento [22, 32, 40].

² Qualora nel resto del testo venga citato "terreno equilibrato" si intenderà equilibrato come qui descritto.

2.3.6. Coltura e rinnovamento del terreno

Le cellule all'interno delle fiasche crescono in numero di giorno in giorno, utilizzando, come fonte di sostentamento, i nutrienti presenti nel terreno. Pertanto, nei momenti prestabiliti è necessario sostituire il mezzo di coltura nelle fiasche. La frequenza del rinnovamento del terreno viene solitamente consigliata dalla ditta che fornisce le cellule. Nel caso dei cheratinociti, la Life Technologies™ suggerisce il cambio a giorni alterni fino al raggiungimento del 50% di confluenza; successivamente, il cambio del terreno deve essere effettuato ogni giorno [2].

Per il cambio del terreno nelle fiasche si è proceduto in questo modo: il terreno ricostituito necessario è stato aliquotato in uno o più tubi sterili, riscaldato prima nel bagno a 37°C (ca. 15 minuti) poi equilibrato nell'incubatore (ca. 30 minuti). Quando sono stati utilizzati tubi privi di filtro, i loro tappi sono stati leggermente svitati per permettere l'ingresso della CO₂. Al termine della fase di equilibratura nell'incubatore, i tubi sono stati portati nella cappa a flusso laminare. Le fiasche sono state aperte ed il terreno "vecchio" è stato aspirato per mezzo di una pipetta Pasteur in vetro, sterile, collegata ad una pompa da vuoto, grazie alla quale i liquidi biologici di scarto sono stati riversati in uno scarico. Infine, per mezzo di una pipetta in plastica, sterile, inserita in un pipettatore, il terreno appena equilibrato è stato dispensato nelle fiasche, avendo cura di dirigere il getto nella parete della fiasca opposta a quella in cui crescono le cellule.

Quando lo scongelamento è avvenuto secondo il Metodo 1, il terreno è stato cambiato non appena si è constatata la completa adesione delle cellule alla fiasca (e.g., se le cellule sono state seminate di mattina, il terreno è stato cambiato in tarda serata, oppure la mattina dopo). Quando lo scongelamento, invece, è avvenuto secondo il Metodo 2, il cambio è stato effettuato dopo 48 ore.

Secondo la Life Technologies™, il mantenimento in coltura dei cheratinociti deve proseguire fino a quando le cellule hanno occupato circa l'80% della superficie della fiasca. Questo implica un periodo di tempo di 5-7 giorni. Inoltre è fondamentale non portare la coltura a confluenza (i.e., tutta la superficie di crescita è stata utilizzata e le cellule sono in stretto contatto l'una con l'altra [41]), in quanto la loro crescita potrebbe essere in seguito rallentata o inibita [2]. Durante i nostri esperimenti, le colture sono state osservate giornalmente al microscopio invertito, ed è stato visto che esse impiegano dai 4 ai 10 giorni a raggiungere l'80% della confluenza.

2.3.7. Subcultura

Non appena le cellule nella fiasca hanno raggiunto l'80% di confluenza, si è proceduto al loro distacco (i.e., tripsinizzazione). I reagenti necessari sono la TE, ed il suo inibitore (TN o TN-lab). La prima permette il vero e proprio distacco delle cellule dalla superficie alla quale sono adese, in quanto con la sua azione enzimatica scinde le proteine che determinano le interazioni cellula-

cellula e cellula-substrato [42]. Inoltre, l'EDTA, contenuto nella TE, permette la chelazione degli ioni Ca^{2+} , facilitando l'azione della TE sulle proteine di adesione [42]. Infine, il TN (o TN-lab) è necessario affinché la tripsina non danneggi eccessivamente le cellule, perché, essendo ricco di proteine, entra in competizione con l'attività proteolitica della TE [43].

Pertanto, si è ritenuto opportuno introdurre, nel protocollo originale, un lavaggio iniziale delle cellule con tampone privo di calcio e magnesio (sia esso HBSS o D-PBS). Infatti, il lavaggio con tampone rimuove i residui di terreno (e sue proteine) dalla fiasca, favorendo l'azione della TE, e rende più difficile la formazione di aggregati cellulari [44].

Si vuole evidenziare che durante la tripsinizzazione, le cellule subiscono delle modificazioni riguardanti soprattutto i recettori per i fattori di crescita e le proteine di membrana [45, 46]. Di conseguenza, le cellule derivanti da una stessa tripsinizzazione si dice che appartengono allo stesso passaggio (P) [47]. Inoltre, le cellule normali, come i cheratinociti utilizzati in questo studio, dopo alcuni passaggi vanno in senescenza e muoiono [48]. Pertanto, dopo ogni tripsinizzazione, sono stati crio-preservedi degli stock di cellule, soprattutto quelli appartenenti a passaggi bassi (i.e., P1-P4).

Il protocollo riportato schematicamente qui sotto è scaricabile dal sito Life Technologies™ [2]. Si tenga presente che, come detto poc' anzi, il lavaggio con tampone è stato introdotto da noi. Tutto il procedimento è stato effettuato in condizioni asettiche, utilizzando materiale sterile in plastica o vetro, monouso o sterilizzato in autoclave (Par. 2.2.3, 2.2.4, 2.3.1). Se non altrimenti indicato, è stato utilizzato terreno ricostituito ed equilibrato. Infine, i volumi indicati nel seguente protocollo sono riferiti ad una fiasca avente una superficie di 25 cm².

Protocollo.

- 1- Le aliquote di TE e TN/TN-Lab sono state scongelate non completamente nel bagno termostato a 37°C. Si ricorda che la temperatura ideale di utilizzo di questi reagenti è 4-20°C.
- 2- Dalla fiasca è stato rimosso completamente il terreno.
- 3- In seguito sono stati pipettati 5 mL di HBSS o D-PBS nella fiasca, facendola poi oscillare (5 minuti) in modo che tutta la superficie di adesione venisse ben coperta.
- 4- Il tampone è stato rimosso dalla fiasca.
- 5- Sono stati aggiunti 3 mL di TE, poi la fiasca è stata incubata a temperatura ambiente (RT) per 3 minuti, mantenendo il movimento ondulatorio della fiasca.
- 6- I 3 mL di TE sono stati rimossi dalla fiasca.
- 7- È stato aggiunto 1 mL di TE nella fiasca, la quale è stata poi incubata a RT per 10 minuti. Durante questo intervallo di tempo, le cellule sono state osservate al microscopio invertito: es-

- se hanno assunto una forma tondeggianti quando prossime al distacco. Infine, il distacco è stato favorito da leggeri colpetti al fondo della fiasca.
- 8- Sono stati aggiunti 3 mL di TN o TN-lab nella fiasca. Si è proseguito con il distacco delle cellule, ed infine tutto il contenuto della fiasca è stato trasferito in un tubo di plastica da 15 mL.
 - 9- Ulteriori 3 mL di TN o TN-lab sono stati pipettati nella fiasca, versando ripetutamente la soluzione sulle pareti, favorendo così il distacco delle ultime cellule rimaste. Questa soluzione è stata aggiunta al tubo da 15 mL.
 - 10- Le cellule sono state centrifugate per 7 minuti, a 180 g, e 20°C.
 - 11- Tutto il surnatante è stato aspirato ed il pellet è stato redisperso in 1 mL di terreno non equilibrato.
 - 12- È stata determinata la concentrazione delle cellule nella dispersione, mediante il metodo di esclusione al TB (Par. 2.3.5).
 - 13- Le cellule sono state seminate ad una densità di 2.500/cm², e poi incubate a 37°C, 5% CO₂, e 100% RH. In alternativa, le cellule sono state congelate (Par. 2.3.7).

2.3.8. Congelamento

La crio-conservazione viene effettuata disperdendo le cellule in un mezzo che limita la formazione di cristalli di ghiaccio in seguito al congelamento dell'acqua intracellulare [49].

Questo procedimento rappresenta una fase delicata nel ciclo di coltura cellulare, pertanto si è ritenuto di provare diversi mezzi di congelamento (Tab. 2.3), per valutare quale potesse essere il più idoneo per i cheratinociti da noi coltivati. Questo è stato fatto anche perché la Life Technologies™ non suggerisce un preciso mezzo di congelamento [2]. Nella maggior parte dei casi, in ogni crio-vial sono state congelate circa 500.000 cellule vitali; talvolta è stato necessario congelare un numero superiore di cellule (Tab. 2.6) unicamente per motivi pratici.

Una prima soluzione da noi adottata per il congelamento è stata quella che prevede l'utilizzo di siero e DMSO (formulazione A in Tab. 2.3), o siero e glicerolo (formulazione B in Tab. 2.3). Con questa metodica, 700 µL di dispersione cellulare sono stati addizionati a 200 µL di siero, e 100 µL di DMSO o glicerolo. In un secondo momento, è stato considerato, invece, l'utilizzo di mezzi completi, i quali contengono DMSO, ma sono privi di siero (formulazione C e D, in Tab. 2.3), oppure altri componenti con azione crio-protettrice (formulazione E in Tab. 2.3). In questi casi, le cellule (pellet) sono state risospese in 1 mL di terreno per il congelamento (4°C) il quale è stato poi trasferito nella crio-vial. Infine, si precisa che il siero utilizzato nella formulazione A è un FBS ottimizzato per la coltura delle cellule mesenchimali; quello utilizzato nella formulazione B, invece, è un FC (Tab. 2.3).

Tabella 2.3. Composizione delle formulazioni A-E utilizzate per la crioconservazione delle HEKa.

Componente	Volumi aggiunti nella crio-vial (μL)				
	A	B	C	D	E
Dispersione cellulare	700	700	<i>pellet</i>	<i>pellet</i>	<i>pellet</i>
Siero	200	200	/	/	/
DMSO	100	/	/	/	/
Glicerolo	/	100	/	/	/
SaF	/	/	1.000	/	/
CFM-1	/	/	/	1.000	/
CFM-2	/	/	/	/	1.000

Seguendo le raccomandazioni del mezzo di congelamento CFM-1, le crio-vial contenenti la formulazione B sono state riposte inizialmente nel ghiaccio (0°C) [22] per un periodo di tempo di 1-2 h. In seguito, come discusso più avanti nel Paragrafo 2.4.3, questo passaggio è stato eliminato.

Pertanto, le crio-vial contenenti le dispersioni cellulari da crio-preservare sono state, in seguito, riposte direttamente nel freezer a -80°C , in un contenitore che permette il congelamento graduale (i.e., $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$). In seguito, dopo un tempo che va da un minimo di 2 h alle 24 h, le crio-vial sono state spostate dal freezer al contenitore di N_2L , ad una temperatura che si aggira intorno ai -196°C (possibilmente, a contatto con il liquido e non con i vapori). La posizione della crio-vial all'interno del bidone dell' N_2L è stata annotata in una apposita scheda, ed il livello di N_2L nel bidone misurato ogni 10 giorni circa, assicurandosi che questo non scendesse al di sotto della metà (i.e., le crio-vial situate nelle tre posizioni più basse erano sempre immerse in N_2L). In questo contenitore, le cellule possono essere conservate per un periodo di tempo di alcuni anni, mantenendo la loro vitalità [50-52].

2.4. Presentazione e discussione dei risultati

2.4.1. Morfologia dei cheratinociti

I cheratinociti coltivati sono cellule aderenti, ed è stato osservato che essi sono caratterizzati da tre fenotipi. Il fenotipo più abbondante è rappresentato da cellule che crescono confinanti l'una all'altra, e formando isolette quando la confluenza è ancora bassa (fenotipo N, Fig. 2.3 e Tab. 2.4).

Il secondo fenotipo, che si trova in numero nettamente inferiore rispetto al primo, è rappresentato da cellule che abbiamo indicato come fenotipo G (Fig. 2.3 e Tab. 2.4). Queste cellule hanno dimensioni maggiori rispetto al fenotipo N, forma tondeggianti ed appiattite, e bordi frastagliati. Esse, solitamente, possiedono due nuclei, ed uno-due nucleoli per nucleo. Talvolta è stata osserva-

ta la presenza di vacuoli nel citoplasma. Abbiamo anche notato che il fenotipo G, quando non è circondato da altre cellule, può assumere una forma allungata, simile a quella dei fibroblasti, che diventa però permanente. In questo caso le cellule sono state da noi indicate come fenotipo A (Fig. 2.3 e Tab. 2.4). Quest'ultimo fenotipo non è stato riscontrato in tutte le fiasche, ed anche quando è stato osservato, era scarsamente rappresentato (Tab. 2.4). Nella Figura 2.3 sono visibili i diversi fenotipi osservati nelle colture di HEKa.

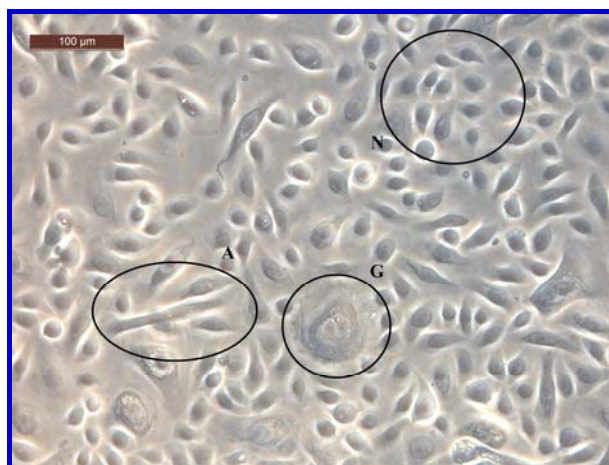


Figura 2.3. Coltura di cheratinociti, P4. Foto in contrasto di fase, obiettivo 20×.

Tutti e tre i fenotipi (i.e., N, G, ed A) sono stati misurati (Image Tool 3.00) considerando la distanza tra i due punti più lontani nella cellula (citoplasma e nuclei). I risultati ottenuti sono raccolti nella Tabella 2.4, dove sono riportate la media e relative deviazioni standard delle dimensioni dei cheratinociti e dei loro nuclei, ed inoltre il numero delle cellule misurate, ed il numero di foto osservate.

Tabella 2.4. Dimensioni dei cheratinociti.

Fenotipo	Dimens. cell. (μm)	Dimens. nucleo (μm)	N. cell. misurate	N. foto
N	31,18 ± 7,89	14,27 ± 1,34	90	9
G	95,21 ± 24,65	24,63 ± 9,38	17	2
A	140,83 ± 55,43	26,34 ± 6,83	9	2

Nel protocollo fornito dalla casa produttrice è riportato che, durante le colture, possono essere osservate alcune cellule dalla forma irregolare, oltre che alcuni melanociti che dovrebbero scomparire dal terzo passaggio [2]. Nelle nostre colture è stato osservato che le cellule con fenotipo G mantengono sempre lo stesso rapporto numerico rispetto a quelle del fenotipo N nei diversi passaggi. Il fenotipo A si è mostrato il più raro, ed inoltre, non è mai stata osservata la presenza di melanociti.

Durante la coltura dei cheratinociti non abbiamo notato ulteriori differenze morfologiche tra le cellule dei diversi passaggi. I passaggi P4, P5, P6, e P7 sono stati utilizzati per gli esperimenti di vitalità cellulare (Cap.6).

2.4.2. Coltivazione cellulare e dati di crescita derivanti

La concentrazione di semina riportata dalla Life Technologies™ è di 2.500 cellule/cm² [2]. Al momento della semina, tuttavia, non sempre si è potuto rispettare questo parametro, come commentato più avanti.

I dati raccolti durante tutti i cicli di coltivazione dei cheratinociti sono riportati nella Tabella 2.5. In essa sono stati messi a confronto la concentrazione di semina (Conc. S.), i giorni di coltura (Tempo), la concentrazione di cellule al momento della tripsinizzazione (Conc. T.), la percentuale di crescita media giornaliera (CMG), ed il passaggio (P). Per questo ultimo parametro, nella Tabella 2.5 si ritrova la dicitura “Px → Py” che indica il passaggio prima e dopo la tripsinizzazione. Le note (Tab. 2.5) permettono di distinguere i dati derivanti da cellule in coltura continua o espanse dopo congelamento. Infine, si riporta che i dati inseriti nella colonna “CMG” sono stati ottenuti utilizzando la seguente equazione:

$$CMG = \frac{\frac{Conc.T. \times 100}{Conc.S.} - 100}{giorni}$$

Questa percentuale è stata tabulata in quanto può offrire un confronto sommario della crescita cellulare nelle diverse prove. È bene ricordare, infatti, che questi valori sono una media della crescita giornaliera, e non rispecchiano la diversa velocità di crescita durante l'intero periodo di coltura. Infatti, non appena vengono seminate, le cellule trascorrono alcune ore in una “fase di latenza”, in cui esse si adattano al nuovo ambiente e la replicazione è estremamente bassa. Questa è seguita da una fase di crescita esponenziale (ca. 3 giorni) in cui la velocità di replicazione è la più alta, per terminare con una fase di plateau, in cui la crescita cellulare rallenta, in funzione della percentuale di confluenza raggiunta [53, 54].

Osservando attentamente la Tabella 2.5, si può inizialmente commentare che i Trial 1, 2, 6-10 e 16-18 derivano da cellule scongelate e seminate, mentre quelli dei Trial 3-5 e 11-15 da cellule in coltura continua. Inoltre, è ben evidente che la concentrazione di semina non rispetta sempre quella raccomandata (2.500 cell/cm²) [2]. Infatti, nei Trial 6-9 e 10 è stato seminato un numero superiore di cellule per compensare quelle che non aderivano alla fiasca (vedi oltre).

Tabella 2.5. Parametri relativi alla crescita dei cheratinociti.

Trial	Conc. S. (cell/cm ²)	Tempo (g)	Conc. T. (cell/cm ²)	CMG (%)	Passaggio (P)	Note
1	2.500	7	2.720	1,26	P1 → P2	1
2	2.500	7	5.300	16,00	P1 → P2	1
3	2.591	4	12.376	94,41	P2 → P3	
4	2.591	7	58.112	306,12	P2 → P3	
5	2.475	4	39.999	379,03	P3 → P4	
6	6.920	9	28.960	35,39	P3 → P4	3 *
7	6.920	9	22.080	24,34	P3 → P4	3 *
8	6.920	10	28.800	31,62	P3 → P4	3 *
9	6.920	10	26.240	27,92	P3 → P4	3 *
10	3.576	8	25.200	75,59	P3 → P4	3 **
11	2.567	6	32.660	195,38	P4 → P5	
12	1.948	8	11.114	58,82	P4 → P5	
13	2.500	5	5.626	25,01	P5 → P6	
14	2.593	5	23.787	163,47	P5 → P6	
15	2.400	7	14.267	70,64	P6 → P7	
16	2.483	7	9.520	40,49	P6 → P7	2 *
17	2.987	7	55.600	251,63	P4 → P5	2
18	2.333	7	15.816	82,56	P5 → P6	2

1 Coltura derivante da crial originale; **2** Coltura derivante da crial congelata con mezzo C; **3** Coltura derivante da crial congelata con mezzo B; * Crio-vial tenuta 2 ore in ghiaccio, prima del congelamento; ** Crio-vial tenuta 2 ore in ghiaccio, prima del congelamento, e scongelata con Metodo 2.

Nei Trial 1-5, si può notare come la famigliarizzazione con queste cellule e l'introduzione del lavaggio con il tampone (punto 3 del protocollo al Par. 2.3.6) dal Trial 2, abbia minimizzato il numero di cellule che rimanevano adese alle fiasche dopo la tripsinizzazione. Infatti, dal Trial 1 al Trial 5 si può osservare come la percentuale di crescita media giornaliera cresca progressivamente da 1,26% fino ad arrivare ad un 379,03%.

I Trial 6-9, come precedentemente ricordato, derivano da cellule congelate con la formulazione B (Tab. 2.3). In questo caso si sono ottenute delle percentuali di crescita che si assestano su 29,82 ± 4,76%. Le potenziali cause che possono aver portato a questo risultato potrebbero essere: (i) una densità di semina più alta di un fattore di 2,77 rispetto a quella raccomandata [2] che è comunque poco superiore a quella massima di 5.000 cell/cm² riportata da altri autori [7], (ii) permanenza a 0°C per due ore prima del criocongelamento controllato, (iii) il mezzo di congelamento contenente glicerolo poteva non essere appropriato, (iv) il mezzo di congelamento è rimasto nella coltura per le

prime 24 ore dopo la semina. Lo scongelamento secondo il metodo 1 (Par. 2.3.5) non viene preso tra i fattori che possono aver influenzato la percentuale di crescita. È bene precisare che si è scelto di seminare ad una densità elevata (Trial 6-9) in quanto in una coltura (i cui dati non sono riportati in Tab. 2.5) le cellule non avevano aderito al fondo della fiasca. Pertanto, nelle colture successive (i.e., Trial 6-9) si era scelta una densità di semina elevata per assicurarsi che un numero sufficiente di cellule aderisse al substrato.

Tuttavia, se osserviamo i dati relativi al Trial 10, considerando che il metodo di scongelamento 2 (Par. 2.3.5) dovrebbe essere più aggressivo, gli elementi che rimangono per giustificare una percentuale di crescita del 75,59% sono: (i) una densità di semina più vicina a quella raccomandata, e (ii) la rimozione del mezzo di congelamento al momento dello scongelamento.

I Trial 11-12 riportano dati di cellule derivanti da coltura. La percentuale di crescita giornaliera è diversa tra i due Trial: la percentuale inferiore si riscontra nel Trial 12, nonostante i giorni di coltura siano stati superiori rispetto a quelli del Trial 11. Anche in questo caso, la concentrazione di semina è stata diversa nei due Trial, e si nota una correlazione tra minore concentrazione di semina e inferiore percentuale di crescita giornaliera. Nel Trial 12, infatti, la concentrazione di semina è stata inferiore a quella consigliata, pertanto si pensa che questo abbia determinato una crescita più lenta.

Prendendo in considerazione i Trial 13-14, si nota che le percentuali di crescita giornaliera sono molto diverse tra loro, nonostante la concentrazione di semina, e la durata della coltura siano state mantenute costanti. In entrambi i Trial, inoltre, le cellule derivano da coltura. Nonostante questi parametri siano uguali nei due Trial, la percentuale di crescita è notevolmente diversa.

I Trial 15-16 riguardano cellule di passaggio P6, derivanti da coltura (Trial 15) e da crio-vial (Trial 16). Anche in questo caso, con una densità di semina molto simile nelle due colture, si è ottenuta una percentuale di crescita giornaliera molto diversa. Questo può essere dovuto al fatto che il Trial 16 (in cui si è ottenuta la percentuale più bassa) derivava da una crio-vial, mentre il Trial 15 derivava da una coltura. Nel Trial 16, quindi, la presenza del mezzo di congelamento nelle prime 24 ore di coltura può aver influenzato negativamente la crescita, come anche già osservato nei Trial 6-10.

Infine, i Trial 17-18 derivano entrambi da crio-vial e cellule congelate nello stesso mezzo e con la stessa metodica. Ciononostante, hanno mostrato delle percentuali di crescita giornaliera molto diverse.

In linea generale, si può affermare che le percentuali di crescita giornaliera superiori al 100% sono state poche, e riguardano tutte colture derivanti, a loro volta, da coltura (i.e., Trial 4, 5, 11, e 14, in cui la densità di semina è stata molto vicina a quella raccomandata), appartenenti anche a passaggi differenti, ma con l'eccezione del Trial 17. Questo potrebbe anche indicare che le HEKa

non hanno subito un processo di senescenza marcato, che possa averne rallentato la crescita. Infatti, il Trial 14 riporta i dati di cellule P5, con una percentuale di crescita giornaliera del 163%. Anche il Trial 15, di passaggio P6, riporta una percentuale di crescita giornaliera tra le più alte osservate, del 70,64%. Inoltre, le colture in cui sono state registrate delle percentuali di crescita giornaliera molto alte sono quelle dei Trial 4 e 5, appartenenti, rispettivamente, ai passaggi P2 e P3.

Un ulteriore confronto può essere fatto tra le cellule derivanti da crio-vial, ma congelate con diversi mezzi di congelamento. Ci si riferisce, quindi, ai Trial 1-2, congelati con il mezzo di congelamento proprietario (LT in Tab. 2.6), ai Trial 6-10 e ai Trial 16-18, congelati rispettivamente con le formulazione B e C (Tab. 2.3). Non si è notata una particolare differenza nella crescita delle colture: a parte i Trial 1 e 2 (in cui le ragioni delle percentuali di crescita giornaliera particolarmente basse sono motivate più in alto), il congelamento con la formulazione B sembra dare sempre la stessa percentuale di crescita nelle diverse colture (i.e., in media $29,82 \pm 4,76$ %, escludendo il Trial 10 in cui si è avuta una percentuale di crescita più alta forse dovuta ad una densità di semina più bassa o alla rimozione del mezzo di congelamento). Per quanto riguarda i Trial 16-18, si può notare che il tempo di permanenza a 0°C non è stato benefico (Trial 16 vs. Trial 17-18) sulla crescita media giornaliera.

2.4.3. Influenza del mezzo di congelamento sulla vitalità cellulare post-scongelo

Nella Tabella 2.6 vengono riassunti tutti i dati ottenuti sperimentalmente con il metodo di scongelamento 1 (Par. 2.3.5) e necessari per descrivere le valutazioni che hanno permesso di scegliere la formulazione poi usata abitualmente. Si evidenzia, inoltre, che solo il trial Trial 3 è stato scongelato con il Metodo 2 (Par. 2.3.5).

I dati presi in esame in Tabella 2.6 sono: il numero totale di cellule vitali congelate (Cell. Cong.), il numero totale di cellule vitali recuperate dopo lo scongelamento della crio-vial (Cell. Scong.), il rapporto in percentuale della quantità di cellule vitali recuperate dopo lo scongelamento e calcolato rispetto al numero di cellule congelate (% Rec.), il numero totale di cellule (vive e morte) contate al momento dello scongelamento (Tot. V/M), la percentuale di cellule vive e morte scongelate e calcolata rispetto al totale di cellule vive e morte scongelate (%V/M), il passaggio a cui appartengono le cellule scongelate (P), e la formulazione utilizzata per le cellule (M. Cong.) così come da Tabella 2.3

Non sempre è stato possibile calcolare i valori da riportare nelle colonne “Tot. V/M” e “%V/M” (i.e., Trial 1 e 12), in quanto non era stato annotato il numero cellule morte ritrovate nella crio-vial al momento dello scongelamento.

L’analisi della Tabella 2.6 confronta tre mezzi di congelamento (A, B, e C) rispetto alla formulazione proprietaria utilizzata dal fornitore.

Tabella 2.6. Dati riguardanti il processo di congelamento-scongelo delle HEKa.

Trial	Cell. Cong.	Cell. Scong.	% Rec.	Tot. V/M	%V/M	P	M. Cong.	Note
1	564.000	452.000	80,1	/	/	P1	LT	§
2	204.000	146.000	71,6	186.000	78,5 / 21,5	P2	A	
3	622.571	357.000	57,4	543.600	65,8 / 34,2	P3	B	***
4	622.571	748.000	120,2	950.000	78,7 / 21,3	P3	B	*
5	622.571	692.000	111,2	910.000	76,0 / 24,0	P3	B	*
6	622.571	824.000	132,4	1.070.000	77,0 / 23,0	P3	B	*
7	3.398.000	1.614.000	47,5	1.891.000	85,4 / 14,6	P4	B	
8	3.398.000	1.956.000	57,6	2.412.000	81,1 / 18,9	P4	B	
9	3.398.000	1.540.000	45,3	1.882.000	81,8 / 18,2	P4	B	
10	3.398.000	1.680.000	49,4	2.380.000	70,6 / 29,4	P4	B	
11	3.398.000	1.696.000	49,9	2.224.000	76,3 / 23,7	P4	B	
12	518.665	345.000	66,5	/	/	P5	C	**
13	713.600	354.000	49,6	546.000	64,8 / 31,2	P6	C	*
14	713.600	368.000	51,6	528.000	69,7 / 30,3	P6	C	*
15	713.600	384.000	53,8	624.000	61,5 / 38,5	P6	C	*
16	616.000	624.000	101,3	792.000	78,8 / 21,2	P7	C	
17	552.000	448.000	81,2	504.000	88,9 / 11,1	P4	C	
18	1.005.000	700.000	69,7	760.000	92,1 / 7,9	P5	C	

* Crio-vial lasciata 2 h in ghiaccio; ** Crio-vial lasciata 1 h in ghiaccio; *** Crio-vial lasciata 2 h in ghiaccio e scongelata secondo il Metodo 2. § LT: mezzo di congelamento proprietario. Si evidenzia che il numero di Cell. Cong. riportato nel Trial 1 è quello che si dovrebbe trovare dopo scongelamento, come indicato nel certificato di analisi [21].

Il mezzo di congelamento A è stato utilizzato solo una volta, in quanto si è rivelato non adatto ai cheratinociti da noi coltivati. Questo si è dedotto non tanto dall'analisi di “% recovery” e “%V/M”, entrambe superiori al 70 %, ma dall'osservazione della morfologia cellulare in seguito allo scongelamento e semina delle cellule congelate con questo terreno. Queste cellule, infatti, hanno assunto una forma allungata già a partire dalle 48 ore successive alla semina. Nei primi due giorni di coltura le cellule sono cresciute molto lentamente; in seguito sono aumentate di numero, mantenendo, alcune, la forma allungata, altre la forma tipica dei cheratinociti (fenotipo N), e molte altre, invece, appartenevano al fenotipo G osservato spesso nelle nostre colture HEKa. Tuttavia, dopo 7 giorni queste cellule si sono mostrate incapaci di raggiungere la confluenza. Non è possibile mostrare una foto di quanto qui descritto, in quanto all'epoca non avevamo pensato potesse essere utile.

Le cellule congelate con il mezzo B appartengono ai passaggi P3 e P4 ed ai Trial 3-11. Queste prove si distinguono ulteriormente nei Trial 3-6, dove le cellule sono state congelate lasciando la crio-vial due ore in ghiaccio prima del congelamento nel freezer a -80°C. In particolare, nel Trial 3

la crio-vial è stata lasciata due ore in ghiaccio, ed inoltre è stata scongelata con il Metodo 2, pertanto ha subito una centrifuga. Confrontando inizialmente questo insieme di dati (Trial 3 vs. Trial 4-6) si può osservare che lo scongelamento mediante Metodo 2 (Par. 2.3.5, Trial 3) ha un effetto negativo sulla percentuale di recovery ($57,4\%$ vs. $121,3 \pm 10,6\%$). Se tuttavia si osserva il rapporto percentuale tra le cellule vive e morte ritrovate dopo lo scongelamento (%V/M) la differenza non è così marcata. Infatti, nel Trial 3 la percentuale di cellule vive e morte è rispettivamente più bassa e più alta del $11,4 \pm 1,4\%$. Pertanto sembra che ci siano due fattori concomitanti: (i) perdita di cellule durante la centrifugazione o completa lisi delle stesse, ed (ii) in parte morte cellulare non litica.

Considerando, invece, i Trial 7-11, congelati sempre con il mezzo B, ma senza la fase di permanenza in ghiaccio, notiamo che la percentuale di recovery è bassa (i.e., $49,9 \pm 4,6\%$) in generale e per confronto con i Trial 4-6. I dati relativi a %V/M pur essendo leggermente più alti rispetto a quelli dei Trial 4-6, non sono statisticamente differenti (vive: $79,0 \pm 5,7\%$ vs. $77,2 \pm 1,4\%$; morte: $21,1 \pm 5,7\%$ vs. $22,8 \pm 1,4\%$). Tutto ciò fa pensare che sia il numero di cellule congelato (ca. 3 milioni) la causa della scarsa recovery.

Nei Trial 12-18 si è utilizzato il mezzo di congelamento C. In questo insieme di prove, si possono confrontare cellule mantenute per una (Trial 12), due (Trial 13-15) o nessuna (Trial 16-18) ora a 0°C prima del crio-congelamento controllato. In questo caso, è possibile osservare come la percentuale di recovery aumenta diminuendo il tempo trascorso a 0°C , passando da $51,7 \pm 2,1\%$ a $66,5\%$ ed infine ad un range di 70-100%. Anche il dato %V/M cresce significativamente (Trial 13-15 vs Trial 16-18). Si è pertanto ritenuto che con il mezzo di congelamento C, la permanenza delle cellule ad una temperatura di 0°C non sia benefica in quanto le crio-vial vengono riposte direttamente a contatto con il ghiaccio, quindi lo sbalzo di temperatura subito dalle cellule risulta eccessivo. Invece, venendo riposte nel freezer a -80°C , il congelamento è graduale (i.e., $1^\circ\text{C}/\text{minuto}$) anche perché il bagno di isopropanolo è mantenuto a temperatura ambiente. Per tale motivo, nei congelamenti successivi, ed anche nelle colture degli altri fenotipi cellulari (i.e., HEMa-LP e Colo-38), la fase di permanenza in ghiaccio è stata eliminata.

La scelta tra il mezzo di congelamento B e C è stata determinata dall'assenza di siero nella formulazione C (come nel terreno di coltura delle HEKa) e dalle più alte percentuali di recovery.

2.5. Conclusioni

Nelle nostre colture di cheratinociti si sono osservati 3 fenotipi (N, G, ed A, Par. 2.4.1), ma non sono mai stati osservati dei melanociti, come riportato nel protocollo originale [2]. Le HEKa hanno mostrato un tempo di coltura di 4-10 giorni (Par. 2.4.2), e la tripsinizzazione è avvenuta seguendo il protocollo della Life Technologies™ [2], con l'utilizzo di un tampone (HBSS o D-PBS) privo di calcio e magnesio prima dell'aggiunta di TE. Questa modifica ha determinato un miglioramento

del processo di subcultura, tradottosi in un maggiore numero di cellule raccolte dalla fiasca (Par. 2.4.2).

Le HEKa sono state le prime cellule ad essere da noi coltivate. Nel primo periodo di coltura (Trial 1-2, Par. 2.4.2) si sono ottenute Conc. T. e CMG (Tab. 2.5) basse rispetto ai Trial successivi, dove un miglioramento in questo senso è stato ottenuto grazie all'acquisizione di una maggiore manualità e l'introduzione del lavaggio col tampone (Par. 2.4.2).

Numerosi parametri sono stati valutati per ottimizzare tutte le fasi della coltura. Le tappe più critiche sono state, senza dubbio, la subcultura (Par. 2.4.2) ed il congelamento (Par. 2.4.3), per le quali sono state apportati degli accorgimenti che hanno consentito di ottenere un numero di cellule sufficiente ad espletare tutti gli esperimenti preposti ed anche a crio-preservare numerosi stock di cellule.

2.6. Bibliografia e note

- [1] Baroli, B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? *J Pharm Sci* 99(1), 21-50 (2010).
- [2] Protocollo per la coltura dei cheratinociti, scaricabile dal sito Life Technologies™. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/HEKa_man.pdf> (10 settembre 2012).
- [3] Manuale dei terreni di coltura per i cheratinociti, scaricabile dal sito Lonza. <http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_Clonecetics_Keratinocyte_Media_Products.pdf> (28 febbraio 2013).
- [4] Protocollo di coltura dei cheratinociti, scaricabile dal sito Lonza. <http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_Clonecetics_human_epidermal_keratinocyte_cell_systems.pdf> (28 febbraio 2013).
- [5] Pagina web del sito ATCC <<https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/PCS-200-011.aspx#09DA316FA4A4451C90096E41983A01F2>> (01 marzo 2013).
- [6] Manuale del terreno di coltura per cheratinociti, scaricabile dal sito ATCC. <<https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/PCS-200-030.aspx#10C5F80529A5-47D6AA8B08636E2E2F44>> (01 marzo 2013).
- [7] Protocollo per la coltura dei cheratinociti, scaricabile dal sito ATCC. <<https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/PCS-200-011.aspx#10C5F80529A547-D6AA8B08636E2E2F44>> (01 marzo 2013).
- [8] Park, Y.-H., Kim, J.N., Jeong, S.H., Choi, J.E., Lee, S.H., Choi, B.H., Lee, J.P., Sohn, K.H., Park, K.L., Kim, M.-K., Son, S.W. Assessment of dermal toxicity of nanosilica using cultured keratinocytes, a human skin equivalent model and an *in vivo* model. *Toxicology* 267(1-3), 178-181 (2010).
- [9] Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Matsuyama, K., Nakazato, Y., Tochigi, S., Kondoh, S., Hirai, T., Akase, T., Nagano, K., Abe, Y., Yoshioka, Y., Kamada, H., Itoh, N., Tsunoda, S.-I., Tsutsumi, Y. Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes. *Part Fibre Toxicol* 8(1), 1-10 (2011).

- [10] Gong, C., Tao, G., Yang, L., Liu, J., Liu, Q., Li, W., Zhuang, Z. Methylation of PARP-1 promoter in the regulation of nano-SiO₂-induced decrease of PARP-1 mRNA expression. *Toxicol Lett* 209(3), 264-269 (2012).
- [11] Rancan, F., Gao, Q., Graf, C., Troppens, S., Hadam, S., Hackbarth, S., Kembuan, C., Blume-Peytavi, U., Ruhl, E., Lademann, J., Vogt, A. Skin penetration of amorphous silica nanoparticles with variable size, surface functionalization, and colloidal stability. *ACS Nano* 6(8), 6829-6842 (2012).
- [12] Yang, X., Liu, J., He, H., Zhou, L., Gong, C., Wang, X., Yang, L., Yuan, J., Huang, H., He, L., Zhang, B., Zhuang, Z. SiO₂ nanoparticles induce cytotoxicity and protein expression alteration in HaCaT cells. *Part Fibre Toxicol* 7(1), 1-12 (2010).
- [13] Gong, C., Tao, G., Yang, L., Liu, J., He, H., Zhuang, Z. The role of reactive oxygen species in silicon dioxide nanoparticle-induced cytotoxicity and DNA damage in HaCaT cells. *Mol Biol Rep* 39(4), 4915-4925 (2012).
- [14] Schaeublin, N.M., Braydich-Stolle, L.K., Schrand, A.M., Miller, J.M., Hutchison, J., Schlager, J.J., Hussain, S.M. Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. *Nanoscale* 3(2), 410-420 (2011).
- [15] Lu, S., Xia, D., Huang, G., Jing, H., Wang, Y., Gu, H. Concentration effect of gold nanoparticles on proliferation of keratinocytes. *Colloids Surf B Biointerfaces* 81(2), 406-411 (2010).
- [16] Monteiro-Riviere, N.A., Inman, A.O., Zhang, L.W. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in human cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 234 (2), 222-235 (2008).
- [17] Horie, M., Nishio, K., Fujita, K., Endoh, S., Miyauchi, A., Sayto, Y., Iwahashi, H., Yamamoto, K., Murayama, H., Nakano, H., Nanashima, N., Niki, E., Yoshida, Y. Protein adsorption of ultrafine metal oxide and its influence in cytotoxicity toward cultured cells. *Chem Res Toxicol* 22(3), 543-553 (2009).
- [18] Mijovic, B., Tominac Trcin, M., Agic, A., Bujic, E.M.Z., Spoliaric, I., Kosec, V. Study on cell adhesion detection onto biodegradable electrospun PCL scaffolds. *J Fiber Bioeng Inf* 5(1), 33-40 (2012).
- [19] Maduray, K., Karsten, A., Odhav, B., Nyokong, T. In vitro toxicity testing of zinc tetrasulfophthalocyanines in fibroblast and keratinocyte cells for the treatment of melanoma cancer by photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 103(2), 98-104 (2011).
- [20] Zhang, L.W., Yang, J., Barron, A.R., Monteiro-Riviere, N.A. Endocytic mechanisms and toxicity of a functionalized fullerene in human cells. *Toxicol Lett* 191(2-3), 149-157 (2009).
- [21] Certificato di analisi scaricabile dal sito Life Technologies™, relativo al lotto di cheratinociti da noi coltivati. <http://tools.invitrogen.com/Content/SFS/COAPDFs/2011-/709-919_C0055C.pdf> (12 settembre 2012).
- [22] Il manuale del mezzo di congelamento CFM-1 fu scaricato al momento del suo arrivo; attualmente non è più disponibile nel sito, pertanto non si può fornire l'URL.
- [23] Waymouth, C. and Varnum, D.S. Simple freezing procedure for storage in serum-free media of cultured and tumor cells of mouse. *TCA Manual* 2(1), 311-313 (1976).
- [24] Certificato di analisi scaricabile dal sito Life Technologies™, relativo al lotto di FBS da noi utilizzato. <http://tools.invitrogen.com/Content/SFS/COAPDFs/2010/41Q-6401K_10270.pdf> (4 marzo 2013).
- [25] Rubin, L.F. Toxicologic update of dimethyl sulfoxide. *Ann NY Acad Sci* 411, 6-10 (1983).

- [26] Anigbogu, A.N.C., Williams, A.C., Barry, B.W., Edwards, H.G.M. Fourier transform Raman spectroscopy of interactions between the penetration enhancer dimethyl sulfoxide and human stratum corneum. *Int J Pharm* 125 (2), 265-282 (1995).
- [27] Kim, S.-J. Effects of heavy metals on natural populations of bacteria from surface microlayers and subsurface water. *Mar Ecol Prog Ser* 26, 203-206 (1985).
- [28] McDonnell, G., Denver Russell, A. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 12 (1), 147-179 (1999).
- [29] Manuale della TE da noi utilizzata, scaricabile dal sito Life Technologies™. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/proddoc15.12%20TE%20and%20rTE_111407.pdf> (4 marzo 2013).
- [30] Manuale del TN da noi utilizzato, scaricabile dal sito Life Technologies™. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/proddoc125.2%20TN%20and%20DTI_111507.pdf> (4 marzo 2013).
- [31] Protocollo di utilizzo del mezzo di congelamento Synth a Freeze, scaricabile dal sito Life Technologies™. <<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/5040synth-afreeze.pdf>> (12 settembre 2012).
- [32] Protocollo di utilizzo del mezzo di congelamento CFM-2, scaricabile dal sito Sigma-Aldrich®. <<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/3/c2639dat.Par.0001.File.tmp/c2639dat.pdf>> (12 febbraio 2013).
- [33] Manuale del terreno di coltura per i cheratinociti, scaricabile dal sito Life Technologies™. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/EpiLifeMedium_man.pdf> (4 marzo 2013).
- [34] Strober, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*, Appendix 3:Appendix 3B (2001).
- [35] Manuale di utilizzo del trypan blue, scaricabile dal sito Sigma-Aldrich®. <<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Usage/t8154use.Par.0001.File.tmp/t8154use.pdf>> (4 marzo 2013).
- [36] Pagina web con specifiche dell'emocitometro da noi utilizzato <http://www.hausserscientific.com/products/reichert_bright_line.html> (7 febbraio 2013).
- [37] Rappresentazione schematica di una camera diemocitometro. <http://www.microbehunter.com/wp/wpcontent/uploads/2010/06/counting_chamber7.jpg> (10 settembre 2012).
- [38] Freshney, R.I. *Culture of animal cells. A manual of basic technique.* (Wiley, quinta edizione, 2005), p. 337.
- [39] Regola per la conta nell'emocitometro. <http://www.microbehunter.com/wp/wpcontent/uploads/2010/06/counting_chamber5.jpg> (10 settembre 2012).
- [40] Manuale del mezzo di congelamento Recovery™, scaricabile dal sito Life Technologies™. Recovery™ è stato utilizzato solo con HEMa-LP e Colo-38. <<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/3968%20cell%20culture%20freeze%20media.pdf>> (4 marzo 2013).
- [41] Freshney, R.I. *Culture of animal cells. A manual of basic technique.* (Wiley, quinta edizione, 2005), p. 40.
- [42] Freshney, R.I. *Culture of animal cells. A manual of basic technique.* (Wiley, quinta edizione, 2005), p. 184.
- [43] Freshney, R.I. *Culture of animal cells. A manual of basic technique.* (Wiley, quinta edizione, 2005), p. 135.

- [44] Freshney, R.I. Culture of animal cells. A manual of basic technique. (Wiley, quinta edizione, 2005), pp. 32-33.
- [45] Huang, H.-L., Hsing, H.-W., Lai, T.-C., Chen, Y.-W., Lee, T.-R., Chan, H.-T., Lyu, P.-C., Wu, C.-L., Lu, Y.-C., Lin, S.T., Lin, C.-W., Lai, C.-H., Chan, H.-T., Chou, H.-C., Chan, H.-L. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J Biomed Sci* 17(36), 1-10 (2010).
- [46] Russell, T., Pastan, I. Plasma membrane cyclic adenosine 3':5'-monophosphate phosphodiesterase of cultured cells and its modification after trypsin treatment of intact cells. *J Biol Chem* 248(16), 5835-5840 (1973).
- [47] Freshney, R.I. Culture of animal cells. A manual of basic technique. (Wiley, quinta edizione, 2005), p. 9.
- [48] Freshney, R.I. Culture of animal cells. A manual of basic technique. (Wiley, quinta edizione, 2005), p. 41.
- [49] Freshney, R.I. Culture of animal cells. A manual of basic technique. (Wiley, quinta edizione, 2005), p. 322.
- [50] Guerrero, M.A., Evans, D.B., Lee, J.E., Bao, R., Bereket, A., Gantela, S., Griffin, G.D., Perrier, N.D. Viability of cryopreserved parathyroid tissue: when is continued storage versus disposal indicated? *World J Surg* 32(5), 836-839 (2008).
- [51] Kleeberger, C.A., Lyles, R.H., Margolick, J.B., Rinaldo, C.R., Phair, J.P., Giorgi, J.V. Viability and recovery of peripheral blood mononuclear cells cryopreserved for up to twelve years in a multicenter study. *Clin Diagn Lab Immunol* 6(1), 14-19 (1999).
- [52] McHenry, C.R., Stenger, D.B., Calandro, N.K. The effect of cryopreservation on parathyroid cell viability and function. *Am J Surg* 174(5), 481-484 (1997).
- [53] Freshney, R.I. Culture of animal cells. A manual of basic technique. (Wiley, quinta edizione, 2005), p. 207.
- [54] Seluanov, A., Hine, C., Azpurua, J., Feigenson, M., Bozzella, M., Mao, Z., Catania, K.C., Gorbunova, V. Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat. *Prot Natl Acad Sci USA* 106(46), 19.352-19.357 (2009).

3.1. Introduzione

I melanociti sono cellule presenti nello strato basale dell'epidermide. Esse si caratterizzano da lunghe espansioni dendritiche che si allungano tra i cheratinociti, anche negli strati superiori della cute; si distinguono, inoltre, per la presenza, nel loro citoplasma di organuli chiamati melanosomi, i quali contengono il pigmento melanina. Questi organuli vengono trasferiti ai cheratinociti mediante un complicato processo [1, 2].

I melanociti coltivati per i nostri esperimenti sono delle cellule umane normali, adulte, con una bassa pigmentazione (HEMa-LP) [3], e sono stati coltivati in un terreno contenente siero, cloruro di calcio, estratto pituitario bovino, insulina bovina, transferrina bovina, fattore di crescita dei fibroblasti, idrocortisone, eparina, ed endotelina-1 [4]. Un'altra casa produttrice suggerisce la coltivazione dei melanociti in terreni che contengono il fattore di crescita dei fibroblasti, PMA (i.e., forbollo 12-miristato 13-acetato), insulina ricombinante, idrocortisone, estratto pituitario bovino, siero bovino fetale, gentamicina/anfotericina-b, ed endotelina-3 [5]. La differenza essenziale con il terreno utilizzato nei nostri esperimenti è dovuta alla presenza di PMA (mentre il terreno Life TechnologiesTM ne è privo) e di endotelina-3 anziché l'isoforma 1. Tra i supplementi, inoltre, sono presenti anche due antibiotici. L'azienda ATCC, infine, suggerisce la coltivazione dei melanociti in un terreno contenente una bassa concentrazione di siero, insulina ricombinante, acido ascorbico, L-glutamina, epinefrina, cloruro di calcio, fattore di crescita peptidico, ed un supplemento chiamato M8 con formulazione proprietaria [6]. Nel caso del terreno ATCC, le differenze col terreno da noi utilizzato risiedono nella presenza di acido ascorbico, L-glutamina, ed epinefrina.

In conclusione, si può affermare che i terreni precedentemente descritti siano costituiti da componenti che promuovono l'adesione cellulare (i.e., idrocortisone, cloruro di calcio), la crescita cellulare (i.e., estratto pituitario bovino, fattore di crescita dei fibroblasti, fattore di crescita peptidico, e PMA), da ormoni, vitamine, proteine di trasporto, ed aminoacidi fondamentali per le cellule.

La concentrazione di semina consigliata per la coltura dei melanociti va da 5.000 [3, 6] a 10.000 cellule/cm² [5].

Per la subcultura delle cellule, alcuni fornitori reputano fondamentale l'utilizzo di un tampone prima dell'aggiunta della tripsina [5, 7]; questo non era, invece, contemplato nel protocollo dei melanociti da noi coltivati [3]. La casa fornitrice Lonza suggerisce l'utilizzo di tripsina/EDTA, a temperatura ambiente (RT), diluita in rapporto 1:1 con Versene[®]/EDTA [5], mentre ATCC propone di utilizzare una tripsina/EDTA più concentrata rispetto a quella usata da noi [8], ed inoltre i reagenti per la subcultura devono essere pre-riscaldati a 37°C [7]. Quest'ultimo aspetto è in contrasto con quanto precisato nel protocollo Life Technologies[™] [3], dove viene raccomandato l'utilizzo di reagenti non caldi.

In bibliografia sono riportati alcuni lavori in cui i melanociti sono stati utilizzati per i test di tossicità in vitro. Essi sono stati esposti ad un derivato del fullerene [9, 10], a nanoparticelle di biossido di titanio [11], ed a quantum dot [12], e la vitalità cellulare è stata misurata mediante il saggio WST-1 [9, 10], o MTT [11]. I melanociti sono stati esposti anche a farmaci antitumorali, e la vitalità cellulare misurata mediante citometria di flusso [13, 14]. Infine, un'approfondita ricerca su Pubmed non ha portato ad alcun risultato riguardante l'esposizione dei melanociti all'eparina, a nanoparticelle di silice, d'oro, ed all'utilizzo del CellTiter Blue per i saggi di vitalità cellulare.

3.2. Materiali

3.2.1. Prodotti per la coltivazione delle cellule

I melanociti umani, adulti, isolati da cute umana normale, leggermente pigmentata (HEMa-LP, Life Technologies[™], sesso: donna; età 22; passaggio: P2; lot. 477908; n. cat. C0245C) [15], sono stati coltivati con i seguenti reagenti: un neutralizzatore di tripsina (TN, Life Technologies[™], n. cat. R002100); un siero bovino fetale (FBS, Life Technologies[™], n. cat. 10270); i supplementi necessari al terreno di coltura (HMGS-2, Life Technologies[™], n. cat. S0165); un tampone D-PBS senza calcio e magnesio (Euroclone[®], n. cat. ECB4004L); un tampone HBSS senza calcio e magnesio (Life Technologies[™], n. cat. 14175053); il terreno di coltura M254 (Life Technologies[™], n. cat. M254500); una soluzione di Tripsina 0,025%/EDTA 0,01% (TE, Life Technologies[™], n. cat. R001100), ed il trypan blue 0,4% p/v (TB, Sigma-Aldrich[®], n. cat. T8156).

Per il congelamento delle cellule è stato utilizzato il terreno Recovery[™], (R, Life Technologies[™], n. cat. 12648010), che contiene FBS, siero di vitello (la casa produttrice non riporta le percentuali dei due sieri), e dimetilsolfossido (DMSO, 10%), in terreno DMEM¹ [16].

¹ Dulbecco's Modified Eagle Media

Per la pulizia e la disinfezione degli spazi appositi sono state utilizzate le sostanze e le soluzioni indicate nel Paragrafo 2.2.1.

L'anidride carbonica (CO₂) è stata utilizzata per condizionare l'ambiente all'interno dell'incubatore (AirLiquide, purezza 99,95%, n. cat. N35). L'acqua distillata e Milli-Q sono state prodotte nel nostro laboratorio (si veda oltre).

Le HEMa-LP sono state mantenute in coltura oppure crio-preservate in azoto liquido (N₂L, grado tecnico, SOL spa). TN, TE, FBS, HMGS-2, R, e le loro aliquote (si veda oltre) sono state conservate a -21°C. Il terreno M254 è stato conservato a 4°C. D-PBS, HBSS, TB, l'isopropanolo, il Lysoform, e l'Umonium³⁸ sono stati conservati a temperatura ambiente (i.e., 20-25°C). Inoltre, RecoveryTM è stato sempre utilizzato a 4°C, mentre TN e TE a 4-20°C. Il TB precipita nel tempo, pertanto occorre filtrarlo (0,22 µm) prima dell'utilizzo.

3.2.2. Protezione e sicurezza

Oltre quanto indicato nel Paragrafo 2.2.2, si riporta che le HEMa-LP, sebbene i test per il micoplasma, l'epatite B e C, ed il virus HIV-1 siano stati dichiarati negativi dal produttore [15], sono state manipolate con le dovute precauzioni per evitare tutti i rischi connessi con i patogeni del sangue.

3.2.3. Materiale consumabile e strumentazione

Il materiale in plastica ed in vetro, sterile e non, utilizzato per la coltivazione delle HEMa-LP è indicato nei Paragrafi 2.2.3 e 2.2.4, mentre la strumentazione nel Paragrafo 2.2.5.

3.2.4. Analisi dei dati

I dati sperimentali sono stati analizzati, ed opportunamente presentati utilizzando i seguenti programmi: Excel 2007, Origin 6.0, ed Image Tool 3.00. L'acquisizione delle immagini al microscopio invertito è avvenuta mediante il software Leica Application Suite V3.

3.3. Metodi

Come si può già facilmente intuire, alcune delle metodiche utilizzate per coltivare le cellule saranno comuni per i tre fenotipi cellulari descritti in questa tesi. Pertanto, anche nel caso delle HEMa-LP il materiale consumabile è stato sterilizzato e la strumentazione mantenuta pulita come descritto nel Paragrafo 2.3.1, mentre il TN-Lab è stato preparato come indicato nel Paragrafo 2.3.2.

3.3.1. Aliquotazione dei reagenti per la coltura cellulare

La maggior parte dei reagenti utilizzati sono stati suddivisi in aliquote e conservati nel freezer a -21°C. L'aliquotazione dei reagenti è stata necessaria in quanto alcuni di essi si deteriorano se subiscono eccessivi cicli di congelamento e scongelamento [16-19]. Per questo motivo i volumi delle aliquote sono stati scelti in modo che una singola porzione potesse soddisfare il fabbisogno di un esperimento o di un set di esperimenti. Per aliquotare e congelare i reagenti utilizzati per la coltura delle HEMa-LP (Tab. 3.1) è stato seguito quanto descritto nel Paragrafo 2.3.3.

Tabella 3.1. Numero e volumi delle aliquote prodotte.

Reagente	Volume originale (mL)	N. aliquote	mL/ aliquota
TE	100	8	12,5
TN	100	8	12,5
TN-lab	500	10	50
R	50	12	4,2

3.3.2. Preparazione del terreno supplementato

Il terreno di coltura ricostituito è stato preparato asepticamente come di seguito schematizzato. Il flacone di terreno M254 è stato portato nella cappa sterile; 30 mL di terreno sono stati dispensati in un tubo di plastica. La vial contenente tutti i supplementi (i.e., HMGS-2) è stata scongelata nel bagno termostato a 37°C. Il suo contenuto è stato pipettato nel flacone di terreno M254; la vial di supplemento è stata, quindi, sciacquata con terreno almeno 5 volte, in modo da assicurarsi il completo recupero del contenuto. Infine, il terreno è stato filtrato con imbuto filtrante (TPP) montato su una bottiglia Duran[®], precedentemente sterilizzata.

Il terreno completamente ricostituito contiene: FBS (0,5%), fattore di crescita dei fibroblasti (basico) (3 ng/mL), estratto pituitario bovino (0,2%), eparina (3 µg/mL), idrocortisone (0,18 µg/mL), insulina bovina (5 µg/mL), transferrina bovina (5 µg/ml), ed endotelina-1 (10 nM). Il terreno è stato conservato a 4°C, al buio, fino al successivo utilizzo. La casa produttrice consiglia di utilizzare il terreno entro un mese dall'aggiunta dei supplementi [20].

3.3.3. Scongelamento e semina di una crio-vial di cellule

Le cellule HEMa-LP sono state scongelate sempre secondo il metodo che viene descritto qui di seguito. La crio-vial contenente le cellule è stata estratta dal bidone dell'azoto liquido e scongelata a 37°C nel più breve tempo possibile, in modo da minimizzare i danni alle cellule. Successivamente,

la crio-vial è stata trasferita nella cappa sterile, ed il suo contenuto è stato ridisperso accuratamente mediante l'utilizzo di una micropipetta (1000 μ L). Per verificare il numero di cellule presenti per unità di volume dopo scongelamento, si è proceduto alla conta cellulare utilizzando il “metodo di esclusione del TB” [21], che è stato dettagliatamente descritto nel Paragrafo 2.3.5. A seconda della concentrazione cellulare ottenuta, sono state preparate le fiasche necessarie per la coltura tenendo conto della densità di semina consigliata dalla Life TechnologiesTM [3], e schematizzata in Tabella 3.2. Dopo aver calcolato i volumi di cellule da dispensare nelle fiasche a partire dalla quantità di cellule vive presenti nella crial appena scongelata, il terreno ricostituito necessario (volumi in Tab. 3.2) è stato asetticamente aliquotato in tubi di plastica, ed equilibrato come descritto nel Paragrafo 2.3.5.

Tabella 3.2. Parametri per la semina dei melanociti.

	Quantità/cm ²	Quantità/25 cm ²	Quantità/75 cm ²
densità di semina (n. cell.)	5.000	125.000	375.000
volume terreno (mL)	0,2	5	15

La semina delle HEMa-LP è stata eseguita con la metodica descritta precedentemente (Par. 2.3.5).

3.3.4. Coltura e rinnovamento del terreno

Le cellule all'interno delle fiasche crescono in numero di giorno in giorno, utilizzando, come fonte di sostentamento, i nutrienti presenti nel terreno. Pertanto, nei momenti prestabiliti è necessario sostituire il mezzo di coltura nelle fiasche. La frequenza del rinnovamento del terreno viene solitamente consigliata dalla ditta che fornisce le cellule. Nel caso dei melanociti, la Life TechnologiesTM suggerisce il cambio a giorni alterni fino al raggiungimento dell'80-90% di confluenza; successivamente, il cambio del terreno deve essere effettuato ogni giorno [3]. Questo implica un periodo di tempo di 12-16 giorni [3].

Tuttavia, durante i nostri esperimenti, le colture sono state osservate giornalmente al microscopio invertito, ed è stato visto che, durante la fase di espansione della coltura, impiegano 10-12 giorni a raggiungere l'80% della confluenza. Per il cambio del terreno nelle fiasche si è proceduto come descritto nel Paragrafo 2.3.6. Inoltre, si vuole evidenziare che nel caso di semina dopo scongelamento, questa è stata effettuata di mattina, mentre il terreno è stato cambiato in tarda serata, oppure la mattina dopo.

3.3.5. Subcultura

Non appena le cellule nella fiasca hanno raggiunto l'80% di confluenza, si è proceduto al loro distacco (i.e., tripsinizzazione). I reagenti necessari sono la TE, ed il suo inibitore (TN o TN-lab). Inoltre, si è ritenuto opportuno introdurre, anche in questo caso, un lavaggio iniziale delle cellule con un tampone privo di calcio e magnesio (sia esso HBSS o D-PBS).

Il protocollo riportato schematicamente qui sotto è scaricabile dal sito Life Technologies™ [3]. Si tenga presente che, come detto poc' anzi, il lavaggio con tampone è stato introdotto da noi.

Tutto il procedimento è stato effettuato in condizioni asettiche, utilizzando materiale sterile in plastica o vetro, monouso o sterilizzato in autoclave (Par. 2.2.3, 2.2.4, 2.3.1). Se non altrimenti indicato, il terreno ricostituito è stato utilizzato equilibrato. Infine, i volumi indicati nel seguente protocollo sono riferiti ad una fiasca avente una superficie di 25 cm².

Protocollo.

- 1- Le aliquote di TE e TN/TN-Lab sono state scongelate non completamente nel bagno termostato a 37°C. Si ricorda che la temperatura ideale di utilizzo di questi reagenti è di 4-20°C.
- 2- Dalla fiasca è stato rimosso completamente il terreno.
- 3- In seguito sono stati pipettati 5 mL di HBSS o D-PBS nella fiasca, facendola poi oscillare in modo che tutta la superficie di adesione venisse ben coperta. Il tempo di esposizione delle cellule al tampone è stato di 5 minuti.
- 4- Il tampone è stato rimosso dalla fiasca.
- 5- Sono stati aggiunti 4 mL di TE, poi la fiasca è stata fatta oscillare in modo che il reagente coprisse tutta la superficie.
- 6- Sono stati immediatamente rimossi 3 mL di TE dalla fiasca.
- 7- La fiasca è stata incubata a temperatura ambiente (RT) per 1-3 minuti. Durante questo intervallo di tempo, le cellule sono state osservate al microscopio invertito: l'incubazione è proseguita fino a quando le cellule hanno assunto una forma tondeggiante (i.e., prossime al distacco).
- 8- Infine, il distacco è stato determinato da dei leggeri colpetti sul fondo della fiasca.
- 9- Sono stati aggiunti 3 mL di TN o TN-lab nella fiasca, e si è proseguito con il distacco delle cellule. Infine, tutto il contenuto della fiasca è stato trasferito in un tubo in plastica, sterile, da 15 mL.
- 10- Ulteriori 3 mL di TN o TN-lab sono stati pipettati nella fiasca, versando ripetutamente la soluzione sulla parete della fiasca in cui vi erano le cellule, favorendo il distacco delle ultime rimaste adese. Anche questa soluzione è stata aggiunta al tubo da 15 mL.
- 11- Le cellule sono state centrifugate per 7 minuti, a 180 g, ed a 20°C.

- 12- Tutto il surnatante è stato aspirato ed il pellet è stato redisperso in 1 mL di terreno ricostituito, non equilibrato.
- 13- È stata determinata la concentrazione delle cellule nella dispersione mediante il metodo di esclusione al TB (Par. 2.3.5).
- 14- Le cellule sono state seminate con una densità di 5.000/cm² e poi incubate a 37°C, 5%, e 100% RH. In alternativa, le cellule sono state congelate (Par. 3.3.6).

3.3.6. Congelamento

La crio-conservazione viene effettuata disperdendo le cellule in un mezzo che limita la formazione di cristalli di ghiaccio in seguito al congelamento dell'acqua intracellulare [22].

I melanociti da noi coltivati sono stati congelati con il mezzo di congelamento R. In ogni crio-vial sono state congelate ca. 500.000 cellule vitali in un mL di R; talvolta è stato necessario congelare un numero superiore di cellule (Tab. 3.5) unicamente per motivi pratici. Una volta determinata la concentrazione cellulare mediante il metodo di esclusione del TB, la dispersione cellulare è stata ricentrifugata (7 minuti, 180 g, 20°C), ed il pellet risospeso in un volume adeguato di terreno per congelamento R. La dispersione cellulare ottenuta è stata aliquotata (1 mL) nelle crio-vial da congelare. Secondo quanto prescritto dalla casa produttrice per il prodotto R, questo terreno deve essere utilizzato ad una temperatura di 2–8°C [16]. Le crio-vial contenenti le dispersioni cellulari sono state riposte inizialmente nel freezer a -80°C, in un contenitore che permette il congelamento graduale (i.e., 1°C/minuto). In seguito, dopo un tempo che va da un minimo di 2 ore alle 24 ore, le crio-vial sono state spostate dal freezer al contenitore di azoto liquido, ad una temperatura che si aggira intorno ai -196°C (possibilmente, a contatto con il liquido e non con i vapori). La posizione della crio-vial all'interno del bidone dell'azoto liquido è stata annotata in una apposita scheda ed il livello di N₂L nel bidone misurato ogni 10 giorni circa, assicurandosi che questo non scendesse al di sotto della metà (i.e., le crio-vial situate nelle tre posizioni più basse erano sempre immerse in N₂L). In questo contenitore, le cellule possono essere conservate per un periodo di tempo di alcuni anni, mantenendo la loro vitalità [23-25].

3.4. Presentazione e discussione dei risultati

3.4.1. Morfologia dei melanociti

I melanociti coltivati sono cellule aderenti che presentano un piccolo corpo cellulare allungato ed estensioni citoplasmatiche sottilissime, le quali, a loro volta, possono essere ramificate. Sono state osservate, e.g., cellule con due sole diramazioni, con tre diramazioni, o con un numero di estensioni

citoplasmatiche talmente alto da sembrare “raggi”. In accordo con quanto indicato dai produttori [3], la maggior parte dei melanociti dovrebbe avere una morfologia multipolare (Fig. 3.3, A), e, nelle colture più vecchie, alcune cellule potrebbero diventare bipolari (Fig. 3.3, B). In effetti, questo cambiamento morfologico è stato osservato con il progredire dei passaggi (Fig. 3.3).

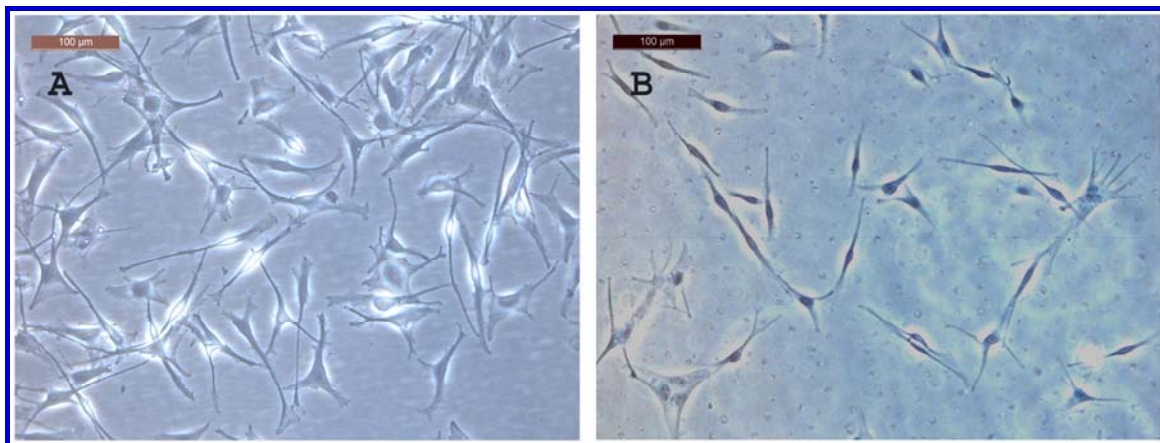


Figura 3.3. (A) Melanociti P2, (B) melanociti P6. Foto in contrasto di fase, obiettivo 20×.

Si è notato, inoltre, che queste cellule crescono mantenendo i loro corpi distaccati dalle cellule adiacenti, ma portando in contatto solamente le estroflessioni citoplasmatiche. È stato osservato che, nella maggior parte dei casi, i melanociti presentano un solo nucleo, 1-2 nucleoli, ed il citoplasma contiene numerose strutture sferiche, simili a granuli, di colore scuro. È stato ipotizzato, in base a quanto riportato in letteratura [26] che questi siano i melanosomi contenenti il pigmento melaina. Nella Tabella 3.3 sono state riportate le dimensioni medie dei corpi cellulari, dell’intera cellula (Corpo cell. + estroflessioni), dei soli prolungamenti cellulari (Estroflessioni), dei nuclei, e dei melanosomi. I dimensionamenti (Image Tool 3.00) sono stati effettuati considerando la distanza tra i due punti più lontani della cellula o dell’organello cellulare. Le cellule misurate appartengono tutte allo passaggio P2.

Tabella 3.3. Dimensioni dei melanociti.

	Lunghezza (µm)	n. misure	n. foto
Corpo cellulare	27,92 ± 9,66	45	4
Corpo cell. + estroflessioni	134,96 ± 27,22	42	4
Estroflessioni	106,40 ± 24,84	42	4
Nuclei	23,14 ± 4,69	45	4
Melanosomi	1,25 ± 0,49	55	4

Dalla Tabella 3.3 si evince che il corpo cellulare ed il nucleo rappresentano una piccola parte dell'intera lunghezza della cellula: rispettivamente il 20,7 e il 17,2 %. Inoltre, si può affermare che il nucleo occupi la quasi totalità del corpo cellulare. Le strutture identificate come melanosomi hanno mostrato avere una dimensione media di 1,25 μm . Tuttavia, in letteratura è riportato che, a seconda del fototipo della pelle (i.e., gradazione di pigmentazione), le dimensioni oscillano tra 0,566 e 0,699 μm [27]. Infine, secondo quanto riportato nel protocollo della Life Technologies™ [3], nella coltura di melanociti si sarebbero potuti ritrovare, fino alla coltura terziaria, alcuni cheratinociti, che però non sono mai stati osservati. I melanociti utilizzati negli esperimenti di tossicità (Par. 6.4.3) appartengono ai passaggi P4-P7.

3.4.2. Coltivazione cellulare e dati di crescita derivanti

Come precedentemente accennato, il produttore riporta che seminando le HEMa-LP ad una concentrazione di 5.000 cellule/cm², queste raggiungeranno una confluenza del 80% in 12-16 giorni [3]. Nelle nostre colture, la densità di semina è stata compresa tra 4.000 e 5.600 cellule/cm² per non sprecare cellule o fiasche, o perché il numero delle cellule non era sufficiente per i contenitori più piccoli. Nel caso del Trial 12 (Tab. 3.4) la densità di semina è stata invece così alta perché si aveva necessità di ottenere velocemente un numero di cellule sufficienti per gli esperimenti successivi. Si era infatti potuto osservare che erano sufficienti 10-12 giorni (Trial 1-3, in Tab. 3.4) per ottenere una alta confluenza e quindi un numero sufficiente di cellule per gli esperimenti di vitalità cellulare (Par. 6.4.1.2 e 6.4.3).

I dati raccolti durante tutti i cicli di coltivazione dei melanociti sono riportati nella Tabella 3.4, dove sono stati messi a confronto: la concentrazione di semina (Conc. S.), i giorni di coltura (Tempo), la concentrazione di cellule al momento della tripsinizzazione (Conc. T.), la percentuale di crescita media giornaliera (CMG), ed il passaggio (P). Per questo ultimo parametro, nella Tabella 3.4 si ritrova la dicitura "Px \rightarrow Py" che indica il passaggio prima e dopo la tripsinizzazione. Le note (Tab. 3.4) permettono di distinguere i dati derivanti da cellule in coltura continua o espanse dopo congelamento. Si vuole evidenziare che sia il mezzo di congelamento proprietario, sia il mezzo R da noi usato, contengono entrambi il DMSO. Il parametro CMG è stato calcolato come descritto nel Paragrafo 2.4.2.

Il Trial 1 riporta i dati riguardanti le cellule derivanti dalla crio-vial originale. Queste cellule derivano da una coltura secondaria (i.e., P2) ed è stato osservato che la CMG è stata del 55%.

I Trial 2-3, invece, riguardano cellule di passaggio P3. In particolare, nel Trial 2 i dati riguardano cellule derivanti da coltura, mentre il Trial 3, da crio-vial. La CMG riscontrata nei due trial è simile (rispettivamente, 51,8 e 47,22 %).

Tabella 3.4. Parametri relativi alla crescita dei melanociti.

Trial	Conc. S. (cell/cm ²)	Tempo (g)	Conc. T. (cell/cm ²)	CMG (%)	Passaggio (P)	Note
1	4.503	9	26.800	55,02	P2 → P3	1
2	4.919	10	30.400	51,80	P3 → P4	
3	4.200	12	28.000	47,22	P3 → P4	2
4	4.286	8	14.743	30,50	P4 → P5	
5	5.220	11	23.200	31,31	P4 → P5	2
6	5.626	7	8.960	8,47	P4 → P5	2
7	4.240	11	16.533	26,36	P4 → P5	2
8	5.453	8	9.867	10,12	P5 → P6	
9	4.620	14	20.000	23,78	P5 → P6	
10	5.082	10	10.747	11,15	P6 → P7	
11	4.066	19	28.800	32,02	P6 → P7	
12	10.435	7	15.169	6,48	P7 → P8	
13	4.400	12	11.467	13,38	P4 → P5	2
14	4.133	4	3.680	-2,74	P4 → P5	2
15	4.000	19	2.742	-1,66	P5 → P6	2
16	4.945	12	2.637	-3,89	P4 → P5	2
17	4.800	7	2.742	-6,13	P5 → P6	

1 Coltura derivante da crial originale; 2 Coltura derivante da crial congelata con mezzo R.

I trial 4-17 sono relativi a colture effettuate per avere un numero sufficiente di cellule per gli esperimenti successivi, o per acclimatare le cellule scongelate prima di effettuare gli esperimenti successivi.

Pur prendendo in considerazione tutti i parametri presenti in Tabella 3.4 ed anche altri (e.g., quanti giorni erano trascorsi dalla preparazione del terreno, ditta fornitrice delle fiasche), così come si è operato per i cheratinociti (Par. 2.4.2) non si è giunti ad una risposta certa sulle cause della variazione delle CMG nel tempo. È inoltre singolare il comportamento degli ultimi quattro trial (Trial 14-17), che avremmo anche potuto non far vedere, dove abbiamo ritrovato meno cellule di quelle seminate.

3.4.3. Influenza del mezzo di congelamento sulla vitalità cellulare post-scongelo

La crio-vial originale era congelata con terreno di congelamento Life Technologies™, che contiene DMSO [3]. Il congelamento dei melanociti da noi coltivati è stato effettuato sempre con il terreno R, come riportato nel Paragrafo 3.3.6. Considerando che il protocollo di coltura dei melanociti,

della Life TechnologiesTM, non suggerisce alcun mezzo di congelamento, la scelta di utilizzare il mezzo R è stata influenzata da alcune questioni. Primo, il suo ampio spettro di utilizzo che lo rende adatto per congelare numerosi fenotipi cellulari [16]. Secondo, questo mezzo contiene DMSO come il mezzo di congelamento Life TechnologiesTM. Terzo, essendo un mezzo di congelamento completo il suo utilizzo risulta essere pratico e veloce. Inoltre, il mezzo R è stato da noi utilizzato, ancor prima che sui melanociti, per il congelamento delle Colo-38 (i.e., cellule di melanoma umano), con dei risultati di recovery dopo scongelamento e crescita dopo la semina molto buoni (Par. 4.4.3). Infine, la stessa ditta vendeva, in quel tempo, solo due terreni per congelare, di cui uno non è adatto per i melanociti. Tutti gli aspetti sopra elencati hanno quindi fatto ricadere la nostra scelta su questo mezzo di congelamento.

Nella Tabella 3.5 vengono riportati i dati relativi alle percentuali di recovery ottenute dopo scongelamento delle crio-vial congelate col mezzo R.

I dati presi in esame in Tabella 3.5 sono: il numero totale di cellule vitali congelate (Cell. Cong.), il numero totale di cellule vitali recuperate dopo lo scongelamento della crio-vial (Cell. Scong.), il rapporto in percentuale della quantità di cellule vitali recuperate dopo lo scongelamento, calcolato rispetto al numero di cellule congelate (% Rec.), il numero totale di cellule (vive e morte) contate al momento dello scongelamento (Tot. V/M), la percentuale di cellule vive e morte scongelate, rispetto al totale di cellule vive e morte scongelate (%V/M), il passaggio a cui appartengono le cellule scongelate (P), la formulazione utilizzata per le cellule, (M. Cong.), e la percentuale di tempo in cui la crio-vial era immersa nell'azoto liquido, piuttosto che nei vapori, rispetto al tempo totale di permanenza nel bidone (N₂L %).

Tabella 3.5. Dati riguardanti il processo di congelamento-scongelo delle HEMa-LP.

Trial	Cell. Cong.	Cell. Scong.	% Rec.	Tot. V/M	%V/M	P	M. Cong.	N ₂ L %
1	690.000	692.000	100,3	796.000	86,9 / 13,1	P2	LT	/
2	700.000	630.000	90,0	756.000	83,3 / 16,7	P3	R	38
3	534.000	522.000	97,8	672.000	77,7 / 22,3	P4	R	64
4	534.000	422.000	79,0	628.000	67,2 / 32,8	P4	R	59
5	534.000	318.000	59,6	450.000	70,7 / 29,3	P4	R	63
6	534.000	330.000	61,8	430.000	76,7 / 23,3	P4	R	74
7	534.000	310.000	58,1	660.000	47,0 / 53,0	P4	R	72
8	883.000	300.000	34,0	375.000	80,0 / 20,0	P5	R	60
9	1.140.000	900.000	79,0	1.240.000	72,6 / 27,4	P4	R	93

LT: mezzo di congelamento proprietario. Si evidenzia che il numero di Cell. Cong. riportato nel Trial 1 è il numero di cellule che si dovrebbe trovare dopo scongelamento, come indicato nel certificato di analisi [15].

La percentuale di cellule vive (in %V/M) ottenuta dallo scongelamento delle nove cryo-vial è risultata superiore al 70 % in tutti i casi, eccetto i Trial 4 e 7, in cui sono state scongelate, rispettivamente, il 67,8 % ed il 47,0 % di cellule vive. Ciononostante, il parametro %Rec. è risultato non stabile nelle sei cryo-vial che contenevano le cellule del passaggio P4, le quali si dividono in due lotti, dove un gruppo ha mostrato una percentuale di recovery del ca. 60 %, e l'altro una percentuale superiore al 79 %. Quando si è preso in considerazione il tempo in cui queste sono rimaste coperte dal liquido stesso, non è stata trovata nessuna correlazione.

3.5. Conclusioni

Nelle nostre colture di melanociti si è osservato un unico fenotipo, caratterizzato da un corpo cellulare da cui si dipartono lunghe estroflessioni, le quali diminuiscono di numero con l'aumentare dei passaggi (Par. 3.4.1). Le HEMa-LP hanno mostrato un tempo di coltura di 10-12 giorni (Par.3.4.2), e la tripsinizzazione è avvenuta seguendo il protocollo della Life Technologies™ [3], con l'utilizzo di un tampone (HBSS o D-PBS) privo di calcio e magnesio prima dell'aggiunta di TE. Questa modifica è stata apportata fin dalla prima subcultura. Anche il processo di crio-conservazione (Par. 3.3.6) si è mostrato semplice e lineare in quanto è stato utilizzato un unico mezzo di congelamento. La coltivazione di queste cellule, seppur semplice, è stata influenzata da qualche fattore non facilmente identificabile che ha determinato velocità di crescita non costanti, anche se nella maggior parte dei casi, il numero di HEMa-LP è stato sempre sufficiente ad espletare gli esperimenti necessari.

3.6. Bibliografia

- [1] Zhang, R.-Z., Zhu, W.-Y., Xia, M.-Y., Feng, Y. Morphology of cultured human epidermal melanocytes observed by atomic force microscopy. *Pigment Cell Res* 17(1), 62-65 (2004).
- [2] Ando, H., Niki, Y., Yoshida, M., Ito, M., Akiyama, K., Kim, J.-H., Yoon, T.-J., Lee, J.-H., Matsui, M.S., Ichihashi, M. Keratinocytes in culture accumulate phagocytosed melanosomes in the perinuclear area. *Pigment Cell Melanoma Res* 23(1), 129-133 (2010).
- [3] Protocollo per la coltura dei melanociti, scaricabile dal sito Life Technologies™. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/HEMa_man.pdf> (6 marzo 2013).
- [4] Manuale dei supplementi per la coltura dei melanociti, scaricabile dal sito Life Technologies™. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/HMGS2_man.pdf> (6 marzo 2013).
- [5] Protocollo per la coltura dei melanociti, scaricabile dal sito Lonza. <http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_-_Melanocyte_Cell_Systems.pdf> (6 marzo 2013).

- [6] Pagina web del sito ATCC, riguardante il terreno ricostituito per la coltura dei melanociti. <<http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/PCS-200-042.aspx#09DA31-6FA4A4451C90096E41983A01F2>> (6 marzo 2013).
- [7] Pagina web del sito ATCC, da cui è possibile scaricare il manuale per la coltura dei melanociti. <<https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/PCS-200-013.aspx?filestream=true#10C5F80529A547D6AA8B08636E2E2F44>> (6 marzo 2013).
- [8] Pagina web del sito ATCC dove sono descritte le caratteristiche della tripsina/EDTA. <<http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/PCS-999-003.aspx#09DA316FA4A4-451C90096E41983A01F2>> (6 marzo 2013).
- [9] Xiao, L., Matzubayashi, K., Miwa, N. Inhibitory effect of the water-soluble polymer-wrapped derivative of fullerene on UVA-induced melanogenesis via downregulation of tyrosinase expression in human melanocytes and skin tissues. *Arch Dermatol Res* 299 (5-6), 245-257 (2007).
- [10] Xiao, L., Aoshima, H., Saitoh, Y., Miwa, N. Fullerene-polyvinilpyrrolidone clathrate localizes in the cytoplasm to prevent ultraviolet-a ray-induced DNA-fragmentation and activation of the transcriptional factor NF-kappaB. *J Cell Biochem* 111(4), 955-966 (2010).
- [11] Kiss, B, Biro, T., Czifra, G., Toth, B.I., Kertesz, Z., Szikszai, Z., Kiss, A.Z., Juhasz, I., Zouboulis, C.C., Hunyadi, J. Investigation of micronized titanium dioxide penetration in human skin xenografts and its effect on cellular functions of human skin-derived cells. *Exp Dermatol* 17(8), 659-667 (2008).
- [12] Kim, M.J., Lee, J.Y., Nehrbass, U., Song, R., Choi, Y. Detection of melanoma using antibody-conjugated quantum dots in a coculture model for high-throughput screening system. *Analyst* 137(6), 1440-1445 (2012).
- [13] Cabello, C.M., Lamore, S.D., Bair, W.B.III, Qiao, S., Azimian, S., Lesson, J.L., Wondrak, G.T. The redox antimalarial dihydroartemisinin targets human metastatic melanoma cells but not primary melanocytes with induction of NPXA-dependent apoptosis. *Invest New Drugs* 30(4), 1289-1301 (2011).
- [14] Kundu, S., Fan, K., Cao, M., Lindner, D.J., Tuthill, R., Liu, L., Gerson, S., Borden, E., Yi, T. Tyrosine phosphatase inhibitor-3 sensitizes melanoma and colon cancer to biotherapeutics and chemotherapeutics. *Mol Cancer Ther* 9(8), 2287-2296 (2010).
- [15] Certificato di analisi scaricabile dal sito Life technologies™, relativo al lotto di melanociti da noi coltivati. <http://tools.invitrogen.com/Content/SFS/COAPDFs/2011/-477-908_C0245C.pdf> (12 settembre 2012)
- [16] Protocollo di utilizzo del mezzo di congelamento Recovery™, scaricabile dal sito Life Technologies™. <<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/3968%20cell%20culture%-20freeze%20media.pdf>> (12 settembre 2012).
- [17] Kim, S.-J. Effects of heavy metals on natural populations of bacteria from surface microlayers and subsurface water. *Mar Ecol Prog Ser* 26, 203-206 (1985).
- [18] Manuale della TE da noi utilizzata, scaricabile dal sito Life Technologies™. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/proddoc15.12%20TE%20-and%20rTE-_111407.pdf> (4 marzo 2013).
- [19] Manuale del TN da noi utilizzato, scaricabile dal sito Life Technologies™. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/proddoc125.2%20TN%20and%20DTI_111507.pdf> (4 marzo 2013).
- [20] Manuale del terreno di coltura per i melanociti, scaricabile dal sito Life Technologies™. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/M254_man.pdf> (7 marzo 2013)

- [21] Strober, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*, Appendix 3:Appendix 3B (2001).
- [22] Freshney, R.I. *Culture of animal cells. A manual of basic technique.* (Wiley, quinta edizione, 2005), p. 322.
- [23] Guerrero, M.A., Evans, D.B., Lee, J.E., Bao, R., Bereket, A., Gantela, S., Griffin, G.D., Perrier, N.D. Viability of cryopreserved parathyroid tissue: when is continued storage versus disposal indicated? *World J Surg* 32(5), 836-839 (2008).
- [24] Kleeberger, C.A., Lyles, R.H., Margolick, J.B., Rinaldo, C.R., Phair, J.P., Giorgi, J.V. Viability and recovery of peripheral blood mononuclear cells cryopreserved for up to twelve years in a multicenter study. *Clin Diagn Lab Immunol* 6(1), 14-19 (1999).
- [25] McHenry, C.R., Stenger, D.B., Calandro, N.K. The effect of cryopreservation on parathyroid cell viability and function. *Am J Surg* 174(5), 481-484 (1997).
- [26] Borovansky, J. *Melanins and melanosomes: biosynthesis, biogenesis, physiological, and pathological functions.* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., prima edizione, 2011), pp. 1-20.
- [27] van Nieuwpoort, F., Smit, N.P.M., Kolb, R., van der Meulen, H., Koerten, H., Pavel, S. Tyrosine-induced melanogenesis shows differences in morphologic and melanogenic preferences of melanosomes from light and dark skin types. *J Invest Dermatol* 122(5), 1251-1255 (2004).

COLTURA DI CELLULE DI MELANOMA UMANO

4.1. Introduzione

Il melanoma è un tumore della cute, il più aggressivo fra tutti, e rappresenta, a livello mondiale, il 75% delle cause di morte per cancro alla pelle [1]. Esso deriva dalla trasformazione maligna dei melanociti [2]. L'incidenza del melanoma è aumentata negli ultimi vent'anni, nelle popolazioni caucasiche, mentre risulta stabile, ed inferiore, nelle popolazioni con un fototipo scuro. Si pensa che a determinare lo sviluppo di tale patologia sia un insieme di fattori esogeni (i.e., ambientali) ed endogeni (i.e., fattori di rischio, cause genetiche) [3].

Le Colo-38 utilizzate per i nostri esperimenti sono cellule umane, descritte come aderenti dal fornitore, la Cell Lines Service [4]. Esse sono state coltivate in un terreno contenente siero e GlutaMAX™. Un'altra casa fornitrice consiglia la coltura delle cellule di melanoma umano in terreno EMEM¹, con siero, tampone HEPES, e sodio piruvato [5].

Per il distacco delle cellule dal substrato, la Cell Lines Service consiglia l'utilizzo di tripsina 0,025% ed EDTA 0,03% [4]; tuttavia noi abbiamo messo a punto un protocollo differente (Par. 4.3.10). La casa fornitrice ATCC, invece, suggerisce una tripsina 0,25% ed EDTA 0,53 mM [6].

Numerosi esempi in letteratura riportano l'utilizzo delle cellule di melanoma umano per i test di tossicità in vitro. Esse sono state esposte a nanoparticelle di silice per un tempo variabile da pochi minuti [7], a 2 [8] e 24 h [9, 10]. Questo fenotipo cellulare è stato anche esposto a nanoparticelle d'oro per 0,5 [11], 1 e 12 [12], 16 [13], 24 [14], e 48 h [15]. La vitalità cellulare è stata valutata mediante differenti saggi: MTT [9, 10, 12, 15], CellTiter 96 [8], e SRB [11]. Le cellule di melanoma umano sono state esposte anche a farmaci antitumorali [16-18], e ad eparina [19, 20]. Infi-

¹ Eagle's Minimum Essential Medium

ne, il CellTiter Blue è stato utilizzato per quantificare la vitalità cellulare, ma non in presenza delle nanoparticelle da noi utilizzate [21].

4.2. Materiali

4.2.1. Prodotti per la coltivazione delle cellule

Le cellule di melanoma umano (Colo-38, Cell Lines Service o CLS, passaggio P20; lot. 300151-2012; n. cat. 300151 [4]) sono state coltivate con i seguenti reagenti: il GlutaMAXTM (Life TechnologiesTM, n. cat. 35050); un siero bovino fetale (FBS, Life TechnologiesTM, n. cat. 10270); un tampone D-PBS senza calcio e magnesio (Euroclone[®], n. cat. ECB4004L); il tampone HBSS senza calcio e magnesio (Life TechnologiesTM, n. cat. 14175053); il terreno di coltura RPMI² 1640, senza L-glutamina (RPMI, Life TechnologiesTM, n. cat. 42401-018 / Lonza, n. cat. BE12-167F), e il trypan blue 0,4% p/v (TB, Sigma-Aldrich[®], n. cat. T8156).

Per il congelamento delle cellule sono stati utilizzati i seguenti reagenti: il dimetilsolfossido (DMSO, filtrato sterilmente e certificato per applicazioni biotecnologiche, Sigma, n. cat. D2438); il glicerolo (Sigma-Aldrich[®], n. cat. G7757); un mezzo di congelamento senza siero, contenente l'8,7% di DMSO e il 4,3 % di metilcellulosa in terreno MEM³ [22, 23] (CFM-1, Sigma, n. cat. C6295); un secondo mezzo di congelamento senza siero e senza DMSO (CFM-2, Sigma, n. cat. C2639); un siero di vitello (fetale) (FC, Euroclone[®], n. cat. ECS0180L); Synth-a-Freeze[®] (SaF, Life TechnologiesTM, n. cat. A1254201), e RecoveryTM (R, Life TechnologiesTM, n. cat. 12648010) che contiene FBS, siero di vitello (la casa produttrice non riporta le percentuali), e DMSO (10%), in terreno DMEM⁴ [24].

Per la pulizia e la disinfezione degli spazi appositi sono state utilizzate le sostanze e le soluzioni indicate nel Paragrafo 2.2.1.

L'anidride carbonica (CO₂) è stata utilizzata per condizionare l'ambiente all'interno dell'incubatore (AirLiquide, purezza 99,95%, n. cat. N35). L'acqua distillata e Milli-Q sono state prodotte nel nostro laboratorio (si veda oltre).

Le Colo-38 sono state mantenute in coltura oppure crio-preserved in azoto liquido (N₂L, grado tecnico, SOL spa). I prodotti FBS, CFM-1, CFM-2, FC, SaF, R e le loro aliquote (si veda oltre) sono stati conservati a -21°C. Il terreno RPMI è stato conservato a 4°C. I prodotti D-PBS, HBSS, TB, DMSO, il glicerolo, l'isopropanolo, il Lysoform, e l'Umonium³⁸ sono stati conservati a tempe-

² Roswell Park Memorial Institute medium

³ Minimum Essential Medium

⁴ Dulbecco's modified Eagle Medium

ratura ambiente (i.e., 20-25°C). Inoltre, i prodotti CFM-1, CFM-2, SaF, e R sono sempre stati utilizzati a 4°C. Il TB precipita nel tempo, pertanto occorre filtrarlo (0,22 µm) prima dell'utilizzo.

4.2.2. Protezione e sicurezza

Oltre a quanto indicato nel Paragrafo 2.2.2, si riporta che le Colo-38, sebbene i test per il micoplasma, i batteri ed i funghi siano stati dichiarati negativi dal fornitore [4], sono state manipolate con le dovute precauzioni per evitare potenziali contaminazioni dell'operatore, anche da patogeni del sangue.

4.2.3. Marcatori fluorescenti

Per la colorazione delle cellule sono stati utilizzati i seguenti reagenti: un'albumina di siero bovino (BSA, Sigma-Aldrich[®], n. cat. A7906); una falloidina marcata (Alexa Fluor[®] 488-Phalloidin, Life Technologies[™], n. cat. A12379); una soluzione di formalina 10% v/v (Sigma-Aldrich[®], n. cat. HT50-1-1); una soluzione di glicerolo e gelatina (Sigma-Aldrich[®], n. cat. GG1); la soluzione Hoechst (Life Technologies[™], soluzione acquosa con concentrazione 10 mg/mL, n. cat. H3569); lo ioduro di propidio (PI, Life Technologies[™], soluzione acquosa con concentrazione 1,0 mg/mL, n. cat. P3566); una soluzione salina tamponata in tampone fosfato (PBS, Sigma-Aldrich[®], n. cat. P4417-100TAB); il triton X-100 (Sigma-Aldrich[®], n. cat. T9284, e lo Yo-Pro[®] (Life Technologies[™], soluzione in DMSO con concentrazione 1 mM, n. cat. Y3603).

4.2.4. Materiale consumabile e strumentazione

Il materiale in plastica utilizzato per la coltivazione delle Colo-38 è indicato nel Paragrafo 2.2.3. Oltre al materiale in vetro elencato nel paragrafo 2.2.4, è stato utilizzato un matraccio da 100 mL, i vetrini da 4 o da 8 camere (Nunc, n. cat. 154526, 4 camere; n. cat. 154534, 8 camere). ed i vetrini coprioggetto (Menzel-Glaser, n. cat. BB024060A1, 24 × 60 mm). La strumentazione utilizzata è elencata nel Paragrafo 2.2.5. Oltre a questa, è stato utilizzato un agitatore magnetico (Falc, modello: F60), ed una bilancia analitica sensibile alla quarta cifra decimale (Kern, modello: ABS 120-4).

4.2.5. Analisi dei dati

I dati sperimentali sono stati analizzati, ed opportunamente presentati utilizzando i seguenti programmi: Excel 2007, Origin 6.0, ed Image Tool 3.00. L'acquisizione delle immagini al microscopio invertito è avvenuta mediante il software Leica Application Suite V3.

4.3. Metodi

Come si può già facilmente intuire, alcune delle metodiche utilizzate per coltivare le cellule saranno comuni per i tre fenotipi cellulari descritti in questa tesi. Pertanto, anche nel caso delle Colo-38 il materiale consumabile è stato sterilizzato e la strumentazione mantenuta pulita come descritto nel Paragrafo 2.3.1.

4.3.1. Aliquotazione dei reagenti per la coltura cellulare

La maggior parte dei reagenti utilizzati sono stati suddivisi in aliquote e conservati nel freezer a -21°C. L'aliquotazione dei reagenti è stata necessaria in quanto alcuni di essi si deteriorano se subiscono eccessivi cicli di congelamento e scongelamento [22, 24-28]. Per questo motivo i volumi delle aliquote sono stati scelti in modo che una singola porzione potesse soddisfare il fabbisogno di un esperimento o di un set di esperimenti, e non dovesse venir ri-congelata. Per aliquotare e congelare i reagenti è stato seguito quanto descritto nel Paragrafo 2.3.3. Tuttavia, nella Tabella 4.1 sono riportati i reagenti utilizzati per la coltura delle Colo-38 che sono stati aliquotati ed il numero di aliquote prodotto con i rispettivi volumi.

Tabella 4.1. Numero e volumi delle aliquote prodotte.

Reagente	Volume originale (mL)	N. aliquote	mL/aliquota
FBS	500	10	50
GlutaMAX™	100	20	5
SaF	50	12	4,2
CFM-1	50	12	4,2
CFM-2	50	12	4,2
R	50	12	4,2

4.3.2. Preparazione di una soluzione salina tamponata in tampone fosfato (PBS)

Il PBS è stato preparato sciogliendo una pastiglia di sostanza per ogni 200 mL di acqua Milli-Q e, successivamente, sottoponendolo ad agitazione con un agitatore magnetico per favorirne la solubilizzazione. Il PBS contiene tampone fosfato (0,01 M) composto da fosfato dibasico di potassio e fosfato monobasico di sodio, cloruro di potassio (0,0027 M), e cloruro di sodio (0,137 M). La soluzione finale ha un pH di 7,4.

4.3.3. Preparazione di una soluzione 1% (p/v) di BSA in PBS

Sulla bilancia analitica precedentemente calibrata è stato pesato 1 g di BSA, il quale è stato poi trasferito in un matraccio da 100 mL. La sostanza è stata disciolta in PBS e la soluzione così ottenuta è stata poi portata a volume.

4.3.4. Preparazione di una soluzione 0,1% (v/v) di triton X-100 in PBS

Il triton X-100 è un tensioattivo, ed ha una consistenza leggermente viscosa. Nel nostro caso, 0,1 mL di triton X-100 sono stati prelevati molto lentamente, pipettati in un matraccio da 100 mL, diluiti con PBS, e la soluzione portata infine a volume.

4.3.5. Preparazione del terreno supplementato

Il flacone di terreno RPMI è stato portato nella cappa sterile, e 50 mL del suo contenuto sono stati asetticamente dispensati in un tubo in plastica sterile. Sono state scongelate una aliquota di FBS, ed una di GlutaMAX™ nel bagno termostato a 37°C (Par. 2.3.3), e poi anch'esse sono state trasferite nella cappa sterile. L'intera aliquota da 50 mL di FBS e l'aliquota da 5 mL di GlutaMAX™ sono state pipettate sterilmente nel flacone di RPMI. Infine, il terreno è stato filtrato (0,22 µm) con imbuto filtrante montato su una bottiglia Duran®, precedentemente sterilizzata. Il terreno completamente ricostituito contiene, quindi, FBS (9,90%) e GlutaMAX™ (0,99%). Il terreno è stato conservato a 4°C, al buio, fino al successivo utilizzo. Le case produttrici da cui il terreno RPMI è stato acquistato non indicano un preciso periodo di tempo entro il quale il terreno ricostituito deve essere utilizzato [29, 30]. Pertanto, è stata applicata la regola di utilizzarlo entro un mese dal momento dell'aggiunta dei supplementi [31, 32], così come è stato fatto per i terreni Epilife® e M254.

4.3.6. Scongelo e semina di una crio-vial di cellule

Le cellule Colo-38 sono state scongelate secondo il metodo che viene descritto qui di seguito. La crio-vial contenente le cellule è stata estratta dal bidone dell'azoto liquido e scongelata a 37°C nel più breve tempo possibile, in modo da minimizzare i danni alle cellule. Successivamente, la crio-vial è stata trasferita nella cappa sterile, ed il suo contenuto è stato ridisperso accuratamente mediante l'utilizzo di una micropipetta (1000 µL).

Per verificare il numero di cellule presenti per unità di volume dopo scongelamento, si è proceduto alla conta cellulare utilizzando il "metodo di esclusione del TB" [33], che è stato dettagliatamente descritto nel Paragrafo 2.3.5.

Le Colo-38, solitamente, sono state diluite in un certo volume di terreno, prima di essere contaminate. Questo è stato necessario in quanto nelle crio-vial si trova un numero troppo alto di cellule. Pertanto, la loro visualizzazione all'emocitometro sarebbe stata complicata, e la conta quasi impossibile. Normalmente noi le abbiamo diluite, dopo scongelamento, in una quantità di terreno che va da 5 a 50 mL.

A seconda del numero di cellule stimate, e a seconda della concentrazione di semina consigliata per il tipo cellulare, sono state preparate le fiasche necessarie per la coltura. La concentrazione di semina indica il numero di cellule vive da seminare in ogni cm². Nel caso delle Colo-38 da noi coltivate, la CLS non consiglia una precisa densità di semina, ma piuttosto un intervallo, che va da ¼ a ½ della massima densità raggiungibile durante la coltivazione, per cm². La massima densità raggiungibile, secondo il protocollo CLS [34] va da 100.000 a 300.000 cellule/cm². Pertanto, noi abbiamo scelto di seminare le cellule tumorali ad una densità che pari ad ½ della minima riportata dalla casa produttrice: 50.000 cellule/cm². Per i dettagli si veda la Tabella 4.2. Dopo aver calcolato i volumi di cellule da dispensare nelle fiasche a partire dalla quantità di cellule vive presenti nella crial appena scongelata, il terreno ricostituito necessario (volumi in Tab. 4.2) è stato asetticamente aliquotato in tubi di plastica, ed equilibrato come descritto nel Paragrafo 2.3.5.

Tabella 4.2. Parametri per la semina delle cellule di melanoma umano.

	Quantità/cm ²	Quantità/25 cm ²	Quantità/75 cm ²
densità di semina (n. cell.)	50.000	1.250.000	3.750.000
volume terreno (mL)	0,2 mL	5 mL	15 mL

4.3.7. Semina in piastre da 24 pozzetti

Non sempre le cellule, siano esse derivanti da crio-vial o da coltura, sono state seminate nelle fiasche. Durante la coltura delle Colo-38, sono state utilizzate anche le piastre da 24 pozzetti. Ciascun pozzetto ha una superficie di 1,9 cm², pertanto la densità di semina è stata aggiustata di conseguenza. Tuttavia, come riferimento, non è stata considerata la concentrazione di semina menzionata nel paragrafo precedente, bensì 25.000/cm² (i.e., ¼ del valore minimo di densità massima). Questa scelta è stata fatta per evitare di ottenere un numero troppo elevato di cellule all'interno del pozzetto, soprattutto in previsione degli esperimenti a tempo. Proporzionalmente alla superficie di un pozzetto (i.e., 1,9 cm²), il numero di cellule da seminare sarebbe dovuto essere 47.500. Noi ne abbiamo seminato 50.000: tale variazione è un arrotondamento adottato per semplificare i calcoli.

Anche il volume del terreno per pozzetto è stato rapportato alla superficie di 1,9 cm². In accordo con questo, 380 µL di terreno si sarebbero dovuti pipettare in ciascun pozzetto; noi ne abbiamo

pipettati 500 (+ 31,58%). Il motivo di questa scelta risiede nell'intenzione di avere un volume standard da utilizzare per tutti gli esperimenti. Ai 380 μL di terreno si sarebbe dovuto aggiungere, infatti, il volume della dispersione cellulare, che varia a seconda del numero di cellule da pipettare. Invece, in questo caso, è stata preparata una dispersione contenente, come volume di terreno, il volume totale da dispensare nella piastra, e, come numero di cellule, il numero totale da seminare nella piastra. Dopo una accurata ridispersione, di volta in volta si sono prelevati 500 μL , i quali sono stati pipettati in ciascun pozzetto. I 500 μL , quindi, avrebbero dovuto contenere 50.000 cellule.

Dopo aver terminato la semina, la piastra è stata chiusa e fatta ondeggiare lievemente per ca. 10 secondi, per permettere alle cellule di disporsi uniformemente sulla superficie di ciascun pozzetto.

La piastra è stata, a questo punto, incubata a 37°C, con il 5% CO_2 , e 100% RH.

4.3.8. Semina in vetrini da 4 o da 8 camere

La semina nei vetrini è simile a quella nelle piastre da 24 pozzetti. La superficie di ciascuna camera varia a seconda del numero di camere presenti nel vetrino: nel vetrino a 4 camere la superficie di ciascuna è di 1,7 cm^2 , mentre in quello a 8 camere è di 0,7 cm^2 . Nella Tabella 4.2 vengono riportati quantità di cellule e volumi dispensati nei vetrini.

Tabella 4.3. Quantità di cellule e terreno dispensati nei vetrini.

	N. cellule/camera	Terreno/camera
Vetrino 4 camere	50.000	500 μL
Vetrino 8 camere	20.000	500 μL

La semina nelle camere dei vetrini è avvenuta secondo la metodica descritta precedentemente (Par. 4.3.7).

4.3.9. Coltura e rinnovamento del terreno

Le cellule all'interno delle fiasche crescono in numero di giorno in giorno, utilizzando, come fonte di sostentamento, i nutrienti presenti nel terreno. Pertanto, nei momenti prestabiliti è necessario sostituire il mezzo di coltura nelle fiasche. La frequenza del rinnovamento del terreno viene solitamente consigliata dalla ditta che fornisce le cellule. Nel caso delle Colo-38, la CLS suggerisce il cambio di terreno da 2 a 3 volte alla settimana [4]. Tuttavia, già dalla prima coltura è stato osservato che queste cellule tumorali crescono con una velocità nettamente superiore rispetto alle HEKa e alle HEMa-LP, tanto da necessitare il cambio del terreno a giorni alterni, o tutti i giorni quando la coltura è vicino alla confluenza. È stato constatato, inoltre, che le sostanze nutrienti presenti nel

terreno venivano consumate molto rapidamente dalle cellule in coltura, tanto da determinare un cambio di colore del mezzo di coltura stesso (da rosso scuro ad arancio).

Per il cambio del terreno nelle fiasche si è proceduto come descritto nel Paragrafo 2.3.6. Nel caso di semina dopo scongelamento, il terreno è stato cambiato non appena si è constatata la completa adesione delle cellule alla fiasca.

La CLS non dà indicazioni riguardo il tempo di mantenimento in coltura delle Colo-38. È stato constatato, tuttavia, che una copertura del 90-95% della superficie di crescita è stata raggiunta in 3-4 giorni. Come per le HEKa e le HEMa-LP, anche per le Colo-38 è stato evitato il raggiungimento della confluenza (i.e., tutta la superficie di crescita è stata utilizzata e le cellule sono in stretto contatto l'una con l'altra [35]). Durante i nostri esperimenti, le colture sono state osservate giornalmente al microscopio invertito.

4.3.10. Subcultura

Non appena le cellule nella fiasca hanno raggiunto il 90-95% di confluenza, si è proceduto al loro distacco dal supporto su cui crescono. Nel caso delle Colo-38, al contrario degli altri tipi cellulari di cui abbiamo discusso (Cap. 2-3), non abbiamo effettuato una vera e propria tripsinizzazione. Infatti l'uso della tripsina si è rivelato superfluo. Questo è stato appurato quando ci siamo apprestati ad effettuare il primo distacco. Durante il lavaggio con tampone, che, nelle colture di HEKa e HEMa-LP, precedeva l'uso della tripsina, abbiamo notato che un cospicuo numero di cellule si trovava in sospensione nella fiasca. Poste a contatto col TB, tali cellule si sono rivelate vive. Pertanto è stato ritenuto sufficiente il solo uso del tampone per il loro distacco.

Anche nel caso delle Colo-38, è stato utilizzato il tampone senza calcio e magnesio (sia esso HBSS o D-PBS, il risultato è indifferente). Sebbene sia stato usato solamente tampone per il distacco delle cellule, per comodità nel testo ci si riferirà ugualmente a questo processo come tripsinizzazione, ma questo termine sarà scritto virgolettato.

La CLS non suggerisce un vero e proprio protocollo per la tripsinizzazione: infatti non vengono indicati quantità e tempi di esposizione della tripsina da utilizzare [4]. Di seguito si riporta il protocollo della CLS, e quello messo a punto da noi.

Tutto il procedimento è stato effettuato in condizioni asettiche, utilizzando materiale sterile in plastica o vetro, monouso o sterilizzato in autoclave (Par. 2.2.3, 2.2.4, 2.3.1). Se non altrimenti indicato, il terreno utilizzato è ricostituito ed equilibrato. Infine, si evidenzia che nel protocollo CLS non viene indicata la superficie della fiasca, mentre i volumi indicati nel protocollo Vinci-Baroli sono riferiti ad una fiasca avente una superficie di 25 cm².

Protocollo CLS.

- 1- Rimuovere tutto il terreno dalla fiasca.
- 2- Aggiungere tripsina 0,025% / EDTA 0,03% nella fiasca.
- 3- Sciacquare e rimuovere la tripsina.
- 4- Incubare la fiasca a temperatura ambiente.
- 5- Aggiungere terreno fresco, aspirare e seminare in nuove fiasche.

Protocollo Vinci-Baroli.

- 1- Tutto il terreno è stato rimosso dalla fiasca.
- 2- Sono stati aggiunti 5 mL di tampone HBSS nella fiasca, facendola poi oscillare in modo che tutta la superficie di adesione venisse ben coperta. Il tempo di esposizione delle cellule al tampone è stato di 5 minuti.
- 3- La fiasca è stata spostata dalla cappa a flusso laminare ad un bancone accuratamente pulito con isopropanolo (70% v/v). Il distacco delle cellule è stato aiutato da leggeri colpi sul fondo della fiasca.
- 4- La fiasca è stata osservata al microscopio invertito ogni 2 minuti circa. Si è proseguito con il distacco fino a quando tutte le cellule (o quasi) erano in sospensione nel tampone. Questo è stato dedotto dalla torbidità della dispersione, e confermato dall'osservazione della fiasca al microscopio invertito prima e dopo esposizione al tampone.
- 5- Il contenuto della fiasca è stato trasferito in un tubo di plastica.
- 6- Le cellule sono state centrifugate per 7 minuti, a 180 g, ed a 20°C.
- 7- Tutto il surnatante è stato aspirato ed il pellet è stato redisperso in terreno ricostituito, non equilibrato. A seconda dello spessore del pellet, il volume di terreno utilizzato per la redispersione è variato da 10 a 50 mL.
- 8- È stata determinata la concentrazione delle cellule nella sospensione mediante il metodo di esclusione al TB (Par. 2.3.5).
- 9- Le cellule sono state seminate alle densità riportate ai Paragrafi 4.3.6, 4.3.7, e 4.3.8., e poi incubate a 37°C, 5% CO₂, e 100% RH. In alternativa, le cellule sono state congelate.

Nel Paragrafo 2.3.7 si è detto che ogni tripsinizzazione determina una modificazione nelle cellule, pertanto esse vengono differenziate in passaggi (P) [36]. Questa affermazione può non essere valida per le Colo-38, in quanto la tripsina non è mai stata utilizzata. Inoltre, le cellule Colo-38, essendo tumorali, possono replicarsi, potenzialmente, un numero infinito di volte (i.e., sono cellule immortalizzate) [37]. Ciononostante, noi abbiamo preferito seguire il criterio di distinguere i vari passaggi per mantenere una traccia per eventuali future osservazioni.

4.3.11. Congelamento

Il congelamento delle cellule viene effettuato disperdendo le cellule in un mezzo che limita la formazione di cristalli di ghiaccio in seguito al congelamento dell'acqua intracellulare [38].

Le cellule Colo-38 da noi coltivate sono state congelate con diversi mezzi di congelamento. Infatti, sebbene la CLS consigli, come mezzo di congelamento, il CM-1 [4], si sono voluti testare i mezzi di congelamento già presenti presso il nostro laboratorio (Tab. 4.4). Normalmente, le crio-vial sono state predisposte per il congelamento in modo che ciascuna contenesse circa 15.000.000 di cellule. Questo numero di cellule è stato scelto in quanto si avvicina a quello contenuto nella crio-vial originale CLS (i.e., 14.000.000).

Tabella 4.4. Composizione delle formulazioni A-E utilizzate per la crioconservazione delle Colo-38.

Formulazione	Volumi aggiunti nella crial (μL)							
	A	B	C	D	E	F	G	R
Dispersione cellulare	700	700	700	700	<i>pellet</i>	<i>pellet</i>	<i>pellet</i>	<i>pellet</i>
FBS	200	/	200	/	/	/	/	/
FC	/	200	/	200	/	/	/	/
Glicerolo	100	100	/	/	/	/	/	/
DMSO	/	/	100	100	/	/	/	/
CFM-1	/	/	/	/	1000	/	/	/
CFM-2	/	/	/	/	/	1000	/	/
SaF	/	/	/	/	/	/	1000	/
Recovery™	/	/	/	/	/	/	/	1000

Una prima formulazione per il congelamento da noi adottata è stata quella che prevede l'utilizzo di siero e DMSO, o siero e glicerolo. Con questa metodica, 700 μL di dispersione cellulare sono stati addizionati a 200 μL di siero e 100 μL di DMSO o glicerolo. Il volume totale ottenuto (1 mL) è stato poi trasferito in una crio-vial.

In una seconda formulazione è stato considerato, invece, l'utilizzo di mezzi completi, i quali contengono DMSO e, talvolta, siero o, in alternativa, altre sostanze con azione crio-protettrice. Sono stati utilizzati alcuni terreni appartenenti a questa categoria: SaF, CFM-1, CFM-2, e R. In questo caso, la dispersione cellulare è stata risospesa in 1 mL di terreno e poi trasferita nella crio-vial. Secondo quanto prescritto dalla casa produttrice del prodotto SaF, questo terreno deve essere utilizzato alla temperatura di 4°C [26]. Noi abbiamo utilizzato anche i mezzi CFM-1, CFM-2, e R seguendo questo consiglio. Nella Tabella 4.4 vengono riportati i mezzi di congelamento adottati.

Le crio-vial contenenti le dispersioni cellulari sono state riposte inizialmente nel freezer a -80°C, in un contenitore che permette il congelamento graduale (i.e., 1°C/minuto). In seguito, dopo un tempo che va da un minimo di 2 alle 24 h, le crio-vial sono state spostate dal freezer al contenitore di N₂L, ad una temperatura che si aggira intorno ai -196°C (possibilmente, a contatto con il liquido e non con i vapori). La posizione della crio-vial all'interno del bidone dell'N₂L è stata annotata in una apposita scheda, ed il livello di N₂L nel bidone misurato ogni 10 giorni circa, assicurandosi che questo non scendesse al di sotto della metà (i.e., le crio-vial situate nelle tre posizioni più basse erano sempre immerse in N₂L). In questo contenitore, le cellule possono essere conservate per un periodo di tempo di alcuni anni, mantenendo la loro vitalità [39-41].

4.3.12. Colorazione delle cellule con marcatori fluorescenti

Per la colorazione delle Colo-38 sono stati utilizzati due principali metodi di colorazione: uno è stato da noi denominato “3-stain” in quanto prevede la colorazione con tre diversi coloranti (Yo-Pro, PI e Hoechst), e l'altro consiste nella colorazione dell'actina filamentosa (o F-actina) cellulare e implica, essenzialmente, l'utilizzo di due coloranti (falloidina marcata e Hoechst). Quest'ultimo metodo, messo a punto da noi, si discosta leggermente da quello suggerito dalla casa produttrice [42], ma è stata comunque confermata la sua efficacia. La Tabella 4.5 riassume la funzione dei coloranti utilizzati [42-45].

Tabella 4.5. Funzione dei marcatori fluorescenti

Colorante	Cellule vive	Cellule apoptotiche	Cellule morte
Hoechst (blu)	+	+	+
PI (rosso)		+	+
Yo-Pro (verde)	±	++	
Falloidina (verde)	+	+	+

Simboli in arancione e grassetto quando le cellule sono preventivamente permeabilizzate

Di seguito vengono riportati i protocolli dettagliati dei due metodi di colorazione. I volumi indicati sono riferiti ai vetrini ad otto camere.

Protocollo colorazione “3-stain”

Soluzione di lavoro: in una provetta opportunamente rivestita con dell'alluminio in fogli, si pipettano 2 µL Yo-Pro, 2 µL PI, 0,5 µL Hoechst, e 2 mL PBS.

1- Il terreno di coltura è stato completamente aspirato dalle camere del vetrino.

- 2- Le cellule sono state lavate con PBS a temperatura ambiente (2 volte, 500 μ L/camera).
- 3- Le cellule sono state fissate con formalina, 300 μ L/camera (11 minuti).
- 4- Le cellule sono state lavate di nuovo con PBS a temperatura ambiente (3 volte, 500 μ L/camera).
- 5- È stata dispensata la soluzione di lavoro nel vetrino, 240 μ L/camera. Questa rimane a contatto con le cellule al buio per 30 minuti.
- 6- Le cellule sono state lavate con PBS a temperatura ambiente (3 volte, 500 μ L/camera).
- 7- Infine, il vetrino è stato lasciato asciugare all'aria e al buio (alcune ore).
- 8- La soluzione glicerolo-gelatina è stata messa a bagnomaria, affinché si liquefacesse, e poi una goccia è stata riposta in ogni camera del vetrino.
- 9- Un vetrino coprioggetto è stato posizionato esattamente sopra il vetrino, facendo in modo che la soluzione di glicerolo-gelatina coprisse, sotto forma di film sottile, tutta la superficie. Inoltre, si è prestata attenzione a non muovere il coprioggetto rispetto al vetrino.
- 10- Si è atteso alcuni minuti affinché la gelatina solidificasse.
- 11- Il vetrino è stato osservato, ed eventualmente fotografato al microscopio invertito, oppure conservato a 4°C, al buio, fino al successivo utilizzo.
- 12- Ogni campo di osservazione è stato acquisito in contrasto di fase e fluorescenza, ed le varie immagini sono state ricomposte in una unica immagine con il software Adobe Photoshop 6.0.

Protocollo per la visualizzazione della F-actina cellulare

Soluzione di lavoro: in una provetta opportunamente rivestita con dell'alluminio in fogli, si pipettano 50 μ L falloidina, 0,5 μ L Hoechst, e 2 mL sieroalbumina bovina 1% in PBS.

- 1- Il terreno di coltura è stato completamente aspirato dalle camere del vetrino.
- 2- Le cellule sono state lavate con PBS a temperatura ambiente (1 volta, 500 μ L/camera).
- 3- Successivamente, le cellule sono state fissate con formalina, 300 μ L/camera (15 minuti).
- 4- In seguito, le cellule sono state nuovamente lavate con PBS a temperatura ambiente (3 volte, 500 μ L/camera).
- 5- A questo punto le cellule sono state permeabilizzate con la soluzione di triton X-100, 300 μ L/camera (2 minuti).
- 6- Infine, le cellule sono state nuovamente lavate con PBS a temperatura ambiente (3 volte, 500 μ L/camera).
- 7- È stata dispensata la soluzione di lavoro nel vetrino, 250 μ L/camera. Questa è rimasta a contatto con le cellule al buio per 20 minuti.
- 8- Le cellule hanno subito un ulteriore lavaggio con PBS a temperatura ambiente (3 volte, 500 μ L/camera).

- 9- Infine, il vetrino è stato lasciato asciugare all'aria e al buio (alcune ore).
- 10- La soluzione di glicerolo-gelatina è stata messa a bagnomaria, affinché si liquefacesse, e poi una goccia è stata riposta in ogni camera del vetrino.
- 11- Un vetrino coprioggetto è stato posizionato esattamente sopra il vetrino, facendo in modo che la soluzione di glicerolo-gelatina coprisse, sotto forma di film sottile, tutta la superficie. Inoltre, si è prestata attenzione a non muovere il coprioggetto rispetto al vetrino.
- 12- Si è atteso alcuni minuti affinché la gelatina si solidificasse.
- 13- Il vetrino è stato osservato, ed eventualmente fotografato al microscopio invertito, oppure conservato a 4°C, al buio, fino al successivo utilizzo.
- 14- Ogni campo di osservazione è stato acquisito in contrasto di fase e fluorescenza, ed le varie immagini sono state ricomposte in una unica immagine con il software Adobe Photoshop 6.0.

4.4. Presentazione e discussione dei risultati

4.4.1. Morfologia delle cellule di melanoma umano

Le cellule di melanoma umano da noi coltivate sono state acquistate come cellule aderenti [4]. Tuttavia, già dalla prima coltura si è notato che esse presentano due fenotipi: uno aderente, di forma allungata, da noi chiamato "L" (Fig. 4.1.A), e l'altro, di forma tondeggiante, che cresce principalmente sopra le cellule L, e/o alla fiasca quando ci sono ancora "poche" cellule (Fig. 4.1.A). Le cellule di questo secondo fenotipo, indicato da noi con la lettera "T" possono anche trovarsi in sospensione, come entità singole (non mostrato), ed in numero rilevante ma non tanto da rendere torbido il terreno.

Il fenotipo L è caratterizzato da una forma allungata, triangolare o a losanga, generalmente possiede un nucleo con due nucleoli anche se sono state osservate cellule con due nuclei e uno o più nucleoli per nucleo. Nel citoplasma delle cellule L sono stati osservati numerosissimi granuli di melanina, come quelli descritti per i melanociti. Queste cellule crescono molto velocemente, disponendosi, apparentemente, in maniera disordinata. Ad un'analisi più attenta, invece, si nota che il fenotipo L delle Colo-38 si dispongono a formare strutture che si ripetono, da noi indicate come e.g. cordoni o isolette, dove le cellule sono molto vicine ed in parte sovrapposte.

Come accennato più sopra, il fenotipo T è rappresentato da cellule che hanno una forma tondeggiante, e crescono sopra le altre cellule L, fino a ricoprirle quasi completamente con il passare dei giorni (Fig. 4.1.A vs. 4.1.C e D), e a creare zone dove si dispongono su più strati (area di color marron in Fig. 4.1.C e D). Questa deduzione è confermata dalla difficoltà di trovare un piano in cui sia possibile mettere a fuoco tutte le cellule. Il confronto delle immagini in Figura 4.1 evidenzia la crescita esponenziale avvenuta in solo 4 giorni. Quando la coltura ha raggiunto una crescita di

queste proporzioni, osservando la fiaschetta al microscopio, si può notare che basta spostarla con il traslatore X-Y per vedere le cellule T ondeggiare. Si commenta inoltre che non è sembrato che le cellule T vengano prodotte dalle cellule L.

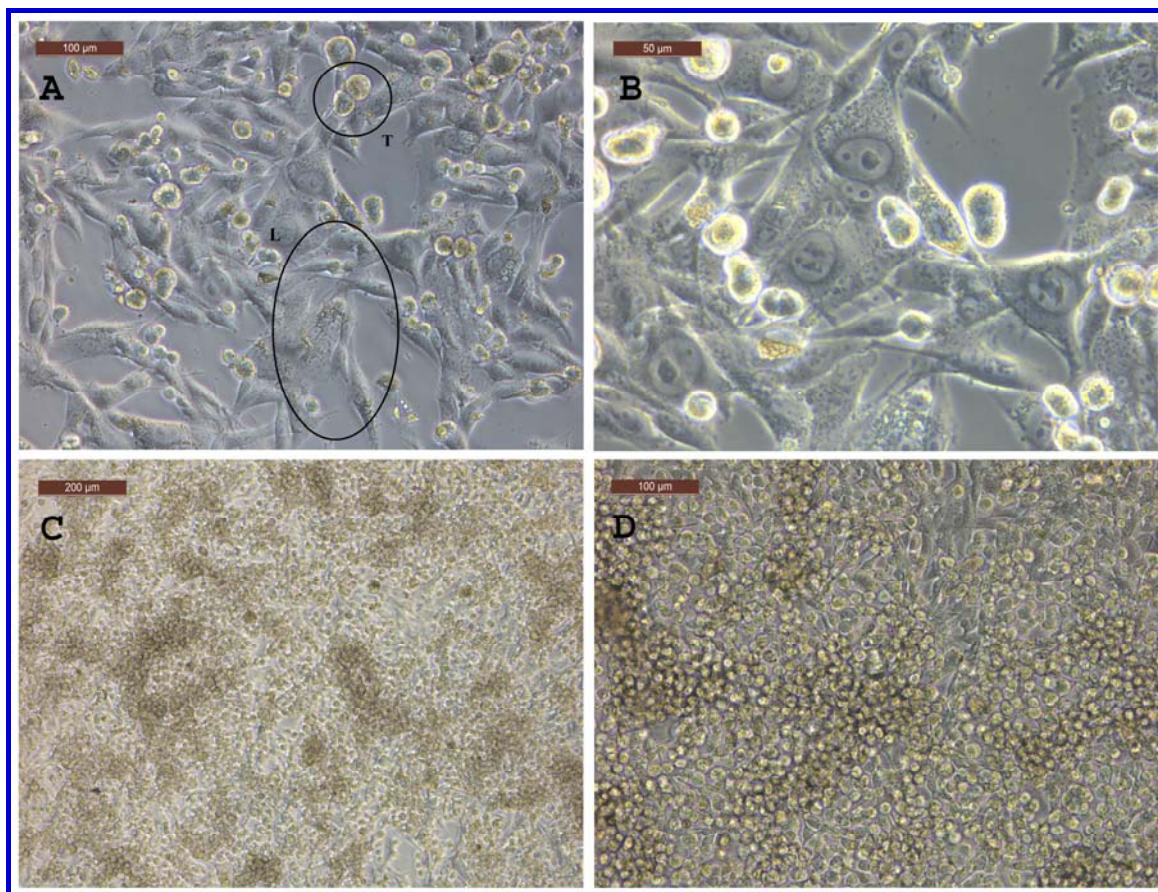


Figura 4.1. Colo-38, P20, dopo 4 (A e B) e 8 (C e D) giorni di cultura. Foto in contrasto di fase, a vari ingrandimenti: A e D, obiettivo 20×; C., obiettivo 10×; B (un dettaglio della immagine A), obiettivo 40×.

Il corpo cellulare dei due fenotipi (i.e., L e T), e solo il nucleo ed i melanosomi delle cellule L sono stati misurati (Image Tool 3.00) utilizzando immagini in contrasto di fase e considerando la distanza tra i due punti più lontani della cellula o dell'organulo cellulare. Nel caso del corpo cellulare delle cellule T, si può parlare di diametro. Tuttavia, non è stato possibile misurare né il nucleo, né i melanosomi presenti nelle cellule T, in quanto tali organelli non erano distinguibili nel citoplasma a causa della rifrangenza osservabile in Figura 4.1.A. Pertanto, per misurare questi nuclei, si sono utilizzate delle immagini acquisite in fluorescenza.

Nella Tabella 4.6 sono riportate la media e deviazioni standard delle dimensioni delle cellule di melanoma umano (Dimens. cell.); la media delle dimensioni nuclei (Dimens. nucleo) e dei melano-

somi (Dimens. melanosom), misurati nelle cellule di fenotipo L; il numero di cellule misurate (N. misure), ed il numero di foto osservate.

Tabella 4.6. Dimensioni delle cellule di melanoma umano.

Fenotipo	Dimens. cell. (μm)	Dimens. nucleo (μm)	Dimens. melanosom (μm)	N. misure	N. foto
L	77,83 \pm 21,72	20,30 \pm 6,79	1,31 \pm 0,37	47	3
T	20,05 \pm 5,70	10,90 \pm 1,98	/	47 / 10	3 / 1

In arancione le misure effettuate su immagini acquisite in fluorescenza

Le cellule Colo-38, fenotipo L, hanno una lunghezza media di 77,83 \pm 21,72 μm , mentre quelle del fenotipo T hanno un diametro medio di 20,05 \pm 5,70 μm . Inoltre, si è visto che queste ultime sono grandi quanto il nucleo delle cellule del fenotipo L. Inoltre, i granuli di melanina (i.e., melanosomi) misurati hanno mostrato possedere delle dimensioni medie di 1,31 \pm 0,37 μm , in concordanza con le dimensioni dei granuli osservati nei melanociti (1,25 \pm 0,49, Par. 3.4.1) e similmente a quanto riportato in letteratura per i melanosomi osservati nei cheratinociti [46]. I melanosomi si sono mostrati in numero almeno dieci volte superiore rispetto ai melanociti. Spesso, infatti, in queste ultime cellule non è stata possibile la loro individuazione nel citoplasma, mentre nelle Colo-38 apparivano nitidi e numerosissimi.

Non è stata notata alcuna differenza morfologica tra le cellule dei diversi passaggi. Le cellule utilizzate per gli esperimenti di tossicità appartengono ai passaggi P26-P30.

4.4.2. Coltivazione cellulare e dati di crescita derivanti

La concentrazione di semina da noi scelta, all'interno dell'intervallo consigliato dalla CLS [4] è di 50.000 cellule/cm², ed abbiamo osservato che il 95% di confluenza viene raggiunto in un tempo molto breve: 3-4 giorni in media.

I dati raccolti durante tutti i cicli di coltivazione in fiasca delle Colo-38 sono riportati nella Tabella 4.7. In essa sono stati messi a confronto la concentrazione di semina (Conc. S.), i giorni (g) e le ore (h) di coltura (Tempo), la concentrazione di cellule al momento della tripsinizzazione (Conc. T.), la percentuale di crescita media giornaliera (CMG), la percentuale di crescita media per ora (CMH), ed il passaggio (P). Per questo ultimo parametro, nella Tabella 4.7 si ritrova la dicitura "Px \rightarrow Py" che indica il passaggio prima e dopo la tripsinizzazione. Le note (Tab. 4.7) permettono di distinguere i dati derivanti da cellule in coltura continua o espanse dopo congelamento. Il parametro CMG è stato calcolato come descritto nel Paragrafo 2.4.2. Il CMH è stato calcolato come CMG, sostituendo al numero dei giorni di coltura, le ore di coltura.

Tabella 4.7. Parametri relativi alla crescita delle cellule di melanoma umano.

Trial	Conc. S. (cell/cm ²)	Tempo (g / h)	Conc. T. (cell/cm ²)	CMG / CMH	Passaggio (P)	Note
1	48.640	3 / 69	83.709	24,03 / 1,04	P20 → P21	1
2	48.640	5 / 116	388.667	139,81 / 6,03	P20 → P21	1
3	51.253	2 / 48	161.429	107,48 / 4,48	P21 → P22	2
4	51.253	2 / 54	234.714	178,98 / 6,63	P21 → P22	2
5	51.253	3 / 72	181.524	84,72 / 3,53	P21 → P22	2
6	51.253	3 / 76	272.571	143,94 / 5,68	P21 → P22	2
7	36.190	3 / 72	315.200	256,99 / 10,71	P21 → P22	2
8	36.190	5 / 114	371.429	185,27 / 8,13	P21 → P22	2
9	45.305	3 / 72	169.520	91,39 / 3,81	P22 → P23	3
10	32.440	4 / 88	465.085	333,42 / 15,16	P22 → P23	3
11	53.752	3 / 72	335.543	174,75 / 7,28	P23 → P24	2
12	53.752	3 / 79	300.800	153,20 / 5,82	P23 → P24	2
13	53.752	3 / 81	343.314	179,57 / 6,65	P23 → P24	2
14	30.000	3 / 76	130.400	111,56 / 4,40	P24 → P25	2
15	30.000	4 / 92	333.511	252,93 / 11,00	P24 → P25	2
16	50.000	2 / 46	86.400	36,40 / 1,58	P26 → P27	2
17	49.733	5 / 114	572.000	210,03 / 9,21	P26 → P27	3
18	51.600	3 / 72	190.286	89,59 / 3,73	P27 → P28	3
19	49.595	3 / 72	304.113	171,06 / 7,13	P27 → P28	3
20	48.400	3 / 66	209.800	111,16 / 5,05	P27 → P28	3
21	45.495	2 / 42	64.121	20,47 / 0,97	P27 → P28	3
22	53.774	3 / 70	399.572	214,35 / 9,19	P28 → P29	3
23	53.586	3 / 68	137.241	52,04 / 2,30	P28 → P29	3
24	46.226	3 / 72	128.171	59,09 / 2,46	P28 → P29	3
25	50.420	3 / 72	370.739	211,77 / 8,82	P29 → P30	3
26	53.333	3 / 70	160.533	67,00 / 2,87	P29 → P30	3
27	51.022	3 / 72	129.649	51,37 / 2,14	P29 → P30	3

1 Coltura derivante da crial originale; 2 coltura derivante da coltivazione; 3 coltura derivante da crial congelata con mezzo R.

Si è ritenuto opportuno stimare approssimativamente il tempo di coltura in ore, oltre che in giorni, in quanto spesso, a parità di giorni di coltura e di passaggio, le concentrazioni di cellule al momento della tripsinizzazione sono risultate molto diverse. Pertanto, data l'elevata velocità di crescita di queste cellule, si è pensato che anche poche ore di differenza potessero essere determinanti.

I Trial 1-2 nella Tabella 4.7 riportano i dati di cellule di passaggio P20, derivanti dalla crio-vial CLS. La percentuale di crescita giornaliera risulta differente tra i due trial in quanto il primo (Trial 1) deriva da lavaggi con tampone HBSS, in cui erano state raccolte le cellule in sospensione nelle fiasche, ma non era stato effettuato un distacco completo. Pertanto la maggior parte delle cellule era rimasta adesa alle fiasche. Le cellule coltivate in queste stesse fiasche sono state infine “tripsinizzate” con HBSS due giorni dopo: la percentuale di crescita giornaliera è riportata nel Trial 2, e si è mostrata nettamente più alta rispetto a quella riportata nel Trial 1.

I Trial 3-8 riportano, invece, i dati delle cellule di passaggio P21, tutte derivanti da coltura, di cui quattro (Trial 3-6) sono stati seminati alla concentrazione di 51.253 cell/cm² mentre gli altri due (Trial 7-8) alla concentrazione di 36.190 cell/cm². Si notano delle differenze nella percentuale di crescita media giornaliera tra i diversi trial, che inizialmente, quando avevamo considerato solo i giorni (CMG) e non le ore (CMH), erano anche abbastanza importanti. Infatti, sia la percentuale di crescita (CMG) più bassa, che quella più alta, è stata osservata dopo 3 giorni di coltura (rispettivamente, Trial 5 e 7). Tuttavia, prendendo in considerazione le ore di coltura, e le coppie Trial 3-4, 5-6, e 7-8, si può osservare che un tempo di coltivazione in ore più lungo è correlabile con un recupero di cellule superiore. Cionondimeno, seguendo questo ragionamento, nei Trial 5-6 era attesa una quantità di cellule superiore a quelle trovata nel Trial 4. Infine, nei Trial 7-8 si è ottenuta una crescita giornaliera superiore ai Trial 3-6. Continuando ad osservare i dati provenienti dalle cellule in coltura Trial 11-16, si possono distinguere altri tre gruppi: Trial 11-13, 14-15, e 16. Nel primo gruppo, Trial 11-13, nonostante le 10 ore di differenza, il numero di cellule ritrovate (colonna Conc. T.) non sembra rispettare quanto visto per i gruppi precedenti, anche se in tre giorni sono cresciute molte cellule. Il secondo gruppo, Trial 14-15, ha mostrato una CMH bassa nel Trial 14, ma comparabile ai Trial 7-8 nel Trial 15. Infine, il Trial 16, quando viene confrontato con i Trial 21, 3 e 4, soddisfa nuovamente la crescita ad ore.

Senza entrare nel merito degli altri trial, per i quali si possono fare delle considerazioni analoghe, non avendo notato differenza eclatanti tra i risultati ottenuti da cellule in coltura continua o iniziata dopo scongelamento, si è arrivati alla conclusione che questi risultati siano la conseguenza di come crescono le cellule.

Nel precedente paragrafo è stato messo in risalto che le Colo-38 crescono in maniera tumultuosa, e che ogni fenotipo cresce differentemente. Il fenotipo L ha caratteristiche più simili alle cellule normali aderenti. Infatti, sebbene parte del loro corpo cellulare si può notare sopra le altre dello stesso fenotipo, non ci è sembrato che queste crescano in piani differenti, mantenendo un certo senso di “inibizione da contatto” [47]. Al contrario, le cellule appartenenti al fenotipo T cresce sopra le altre, in più piani, ed è debolmente adeso alle cellule di entrambi i fenotipi. L’osservazione che la CMH cresca per poi diminuire con il tempo può essere la conseguenza di due variabili. (i) Di-

sponibilità di nutrienti che avrà un effetto promotore all'inizio della coltura e maggiormente se il numero di cellule seminate è inferiore. Con il passare del tempo e con la conseguente crescita cellulare, la diminuita disponibilità di nutrienti può giocare un ruolo inibitore. (ii) Cambio del terreno con conseguente perdita di una parte delle cellule già in sospensione o più debolmente adese.

Sebbene le cellule tumorali non dovrebbero subire il processo di senescenza [37] e dovrebbero potersi riprodurre indefinitamente, per valutare se ci fosse una relazione tra crescita media giornaliera/oraria (g/h) ed il passaggio delle cellule è stato preso il gruppo più consistente in Tabella 4.7, e cioè le cellule coltivate per 3 giorni e 72 ore. Il grafico risultante (non mostrato) non mette in rilievo nessuna differenza importante né tra i vari passaggi né tra colture continue o iniziate dopo scongelamento delle Colo-38.

4.4.3. Influenza del mezzo di congelamento sulla vitalità cellulare post-scongelamento

La crio-vial originale era congelata con terreno di congelamento CLS, che contiene siero [48]. In seguito alla prima tripsinizzazione, sebbene il terreno consigliata dalla CLS fosse il CM-1, si è ritenuto opportuno testare, sulle cellule, i mezzi di congelamento in nostro possesso semplicemente per una questione economica. Pertanto, dopo la prima "tripsinizzazione" (Trial 1 in Tab. 4.7), parte delle cellule è stata congelata con gli 8 mezzi di congelamento riportati in Tabella 4.4.

Per questa prova, in ciascuna crio-vial sono state pipettate 500.000 cellule tutte appartenenti al passaggio P21, che sono state congelate come descritto precedentemente (Par. 4.3.11). È bene precisare che le crio-vial sono state conservate, all'interno del bidone dell'azoto liquido in posizioni che assicurassero la completa copertura delle stesse con il liquido. Dopo 48 ore le crio-vial sono state scongelate e le cellule seminate, in parte, in 6 vetrini da 8 camere, e, per la restante parte, in una piastra da 24 pozzetti al fine di monitorare durante un periodo di 7 giorni la crescita delle cellule dopo scongelamento e semina. Era già stato osservato, infatti, che nei cheratinociti il congelamento con un mezzo di congelamento non adatto aveva portato alla mancata confluenza di una coltura (Par. 2.4.3).

I dati presi in esame in Tabella 4.8 sono: il numero totale di cellule vitali congelate (Cell. Cong.), il numero totale di cellule vitali recuperate dopo lo scongelamento della crio-vial (Cell. Scong.), il rapporto in percentuale della quantità di cellule vitali recuperate dopo lo scongelamento, calcolato rispetto al numero di cellule congelate (% Rec.), il numero totale di cellule, vive e morte, scongelate (Tot. V/M), la percentuale di cellule vive e morte scongelate, rispetto al totale di cellule vive e morte scongelate (%V/M), una indicazione della velocità di crescita nei vetrini (Cresc.), il passaggio a cui appartengono le cellule scongelate (P), e la formulazione utilizzata per le cellule, così come da Tabella 4.4 (M. Cong.).

Tabella 4.8. Dati ottenuti dalla crio-conservazione delle Colo-38 con diversi mezzi di congelamento.

Trial	Cell. Cong.	Cell. Scong.	% Rec.	Tot. V/M	% V/M	Cresc.	P	M. Cong.
1	500.000	382.000	76,4	556.000	68,7 / 31,3	+	P21	A
2	500.000	352.000	70,4	526.000	66,9 / 33,1	+	P21	B
3	500.000	498.000	99,6	640.000	77,8 / 22,2	++	P21	C
4	500.000	640.000	128,0	802.000	79,8 / 20,2	-	P21	D
5	500.000	380.000	76,0	562.000	67,6 / 32,4	-	P21	E
6	500.000	246.000	49,2	572.000	43,0 / 57,0	-	P21	F
7	500.000	458.000	91,6	554.000	82,7 / 17,3	+	P21	G
8	500.000	470.000	94,0	640.000	73,4 / 26,6	+	P21	R

Analizzando i dati relativi alla percentuale di recovery (% Rec.), tutti i mezzi tranne la formulazione F permettono di recuperare più del 70 % di cellule vitali. Tuttavia, rispetto al totale di cellule ritrovate, il rapporto percentuale tra le cellule vive e morte ritrovate indica che le formulazioni che determinano un danno inferiore sono le seguenti: C, D, G ed R. Infatti, osservando la colonna %V/M, queste formulazioni assicurano un percentuale di cellule vitali superiore al 70 %. È possibile che in presenza di questi quattro mezzi di congelamento la vitalità delle cellule post-scongelo sia risultata alta, in quanto essi contengono siero, come il mezzo di congelamento consigliato dalla CLS. Il siero, come riportato in letteratura, risulta essere importante per il congelamento delle cellule tumorali, così come il DMSO [38, 49], anch'esso contenuto nei mezzi di congelamento C, D, G, ed R.

Come si è detto in precedenza, le cellule congelate con gli 8 diversi mezzi di congelamento sono state seminate e mantenute in coltura per 7 giorni. Durante questo periodo di tempo le cellule sono state monitorate ed è stata annotata qualsiasi anomalia che potesse presentarsi sia nella velocità di crescita, sia nella morfologia. Le cellule coltivate sui vetrini sono state colorate con marcatori fluorescenti, e fotografate dopo 1, 3 e 7 giorni di coltura.

Nella Figura 4.2, sono mostrate le cellule derivanti dal congelamento con diversi mezzi di coltura, dopo 3 giorni dalla semina. Si è ritenuto, infatti, che dopo 3 giorni le cellule fossero già ben adattate al nuovo ambiente di coltura e quindi le immagini potessero essere rappresentative degli effetti (negativi o positivi) esplicati dal mezzo di congelamento. Le cellule mostrate nella Figura 4.2 sono state colorate seguendo il protocollo per la visualizzazione dell'actina cellulare (Par. 4.3.12). La maggior parte delle cellule congelate con la formulazione A (Fig. 4.2.A), hanno mostrato un aspetto tondeggiantissimo nel primo giorno di coltura. Tuttavia, con il proseguire del tempo, la morfologia di queste cellule ha assunto un aspetto sempre più simile a quello delle Colo-38, fenotipo L (Fig. 4.1.A).

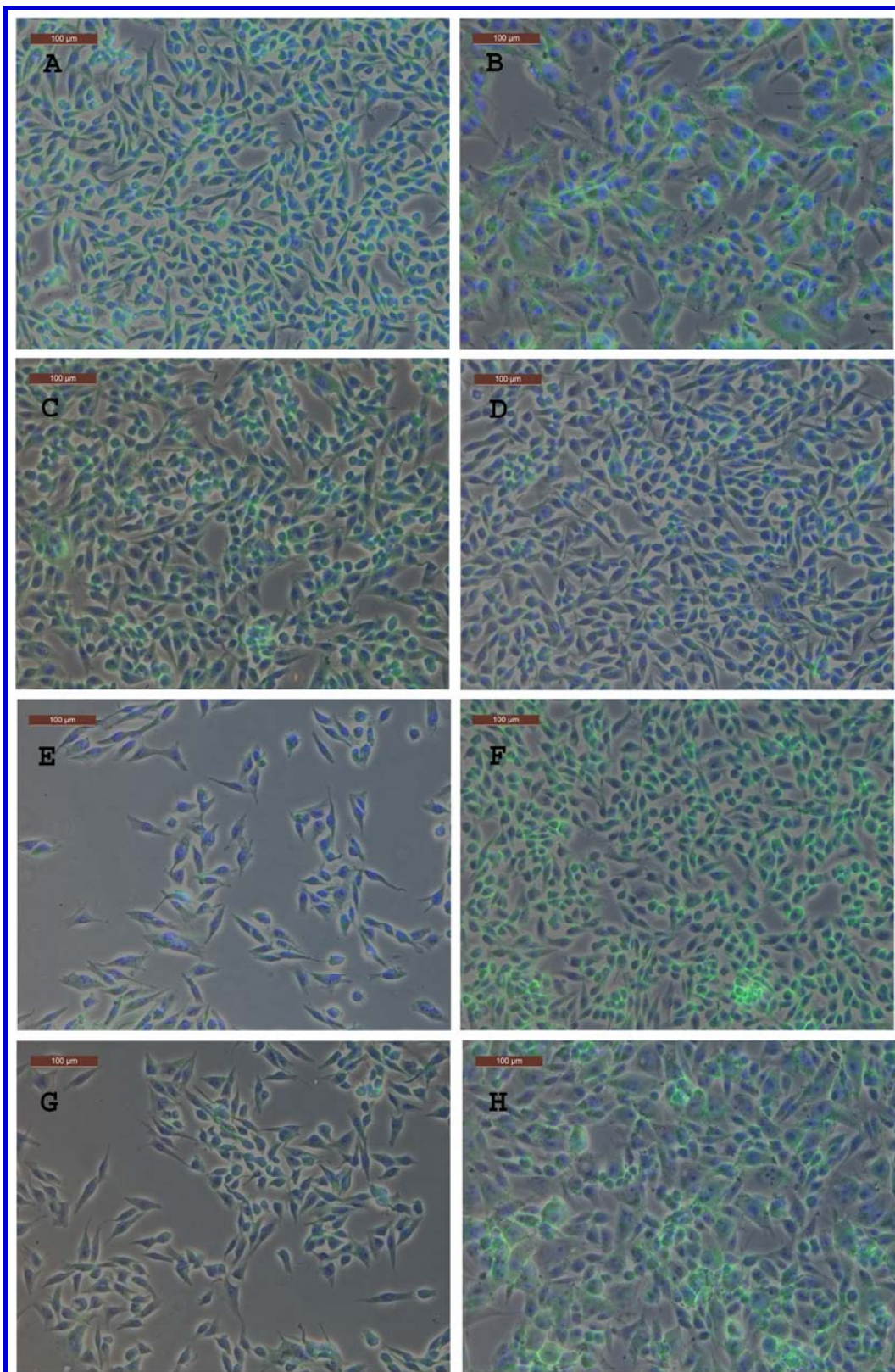


Figura 4.2. Cellule Colo-38 (P21) congelate con diversi mezzi e coltivate sui vetrini a otto camere. (A) mezzo A, (B) mezzo B, (C) mezzo C, (D) mezzo D, (E) mezzo E, (F) mezzo F, (G) mezzo G, (H) mezzo R. Le foto sono state ricostruite sovrapponendo una immagine in contrasto di fase, una in fluorescenza blu, ed una in fluorescenza verde. Obiettivo 20 \times .

In Figura 4.2.A, non sono osservabili, né così facilmente distinguibili, le cellule del fenotipo T. Si ritiene che, sebbene le cellule siano state fissate con formalina, i lavaggi effettuati durante il protocollo di colorazione (Par. 4.3.11), siano stati sufficienti ad eliminare le cellule debolmente adese.

La coltura delle cellule congelate con il mezzo B (Fig. 4.2.B) è stata caratterizzata dalla presenza, fin dal primo giorno, di cellule dalla forma tondeggiate. Con il trascorrere dei giorni, nella coltura è stato osservato un aumento di cellule allungate.

Le cellule congelate con il mezzo di congelamento C (Fig. 4.2.C) hanno mostrato le caratteristiche delle Colo-38 fin dal primo giorno di coltura. Con il proseguire dei giorni, le cellule sono cresciute bene, ed in coltura erano presenti sia cellule allungate che cellule tondeggianti, adese alla fiasca o in sospensione.

La Figura 4.2.D mostra una coltura di Colo-38, derivante da congelamento con la formazione D, dopo scongelamento e semina. Nonostante l'immagine ritragga le cellule con caratteristiche morfologiche normali, inizialmente (nei primi due giorni) la crescita è stata lenta ed in coltura era presente soprattutto il fenotipo tondeggiate. Proprio per questo motivo, in Tabella 4.8 la crescita è stata indicata con il simbolo “-”.

Nella coltura delle cellule congelate con il mezzo E (Fig. 4.2.E) è stata osservata una crescita molto lenta. Inoltre, durante il primo giorno di coltura, le cellule avevano una morfologia tondeggiate, e sembravano sofferenti, data la presenza di numerosi vacuoli al loro interno.

In Figura 4.2.F sono mostrate, invece, le cellule derivanti dal congelamento con il mezzo F. Sebbene esse sembrino più numerose, rispetto a quelle riportate in Figura 4.2.E, la crescita è stata lenta e le cellule si sono mostrate, per la maggior parte, di forma tondeggiate e apparivano sofferenti. Inoltre, l'inadeguatezza di questo mezzo al congelamento delle Colo-38 ci è stata confermata dalla bassa %V/M (i.e., 43 %, la più bassa tra tutti i trial riportati in Tabella 4.8).

Il mezzo G ha determinato una crescita lenta nei primi giorni di coltura (Fig. 4.2.G), ma, con il trascorrere dei giorni le cellule hanno assunto una morfologia del tutto simile a quella delle Colo-38.

Infine, le cellule mostrate in Figura 4.2.H derivano da congelamento con il mezzo R. Le cellule non hanno mai mostrato segni di sofferenza nei 7 giorni di coltura.

Osservando attentamente la Figura 4.2 è possibile notare che la fluorescenza verde dell'actina è ben visibile nelle immagini A, B, C, F ed H, essa è uniformemente distribuita tra le cellule solo nelle immagini A ed F, mentre nelle immagini B, C, F e G si notano zone in cui è molto evidente nei confini delle cellule. Inoltre, le cellule presenti nelle immagini B ed H sembrano leggermente più grandi, meno simili tra loro, e contenenti numerosi granuli, che non sembrano essere presenti nelle altre immagini.

In sintesi, in base alla %V/M ed alla morfologia delle cellule dopo scongelamento e semina, sono stati scelti tre mezzi di congelamento: C, G, ed R. Tra questi mezzi, il primo ed il terzo contengono siero e DMSO, mentre il secondo è privo di siero ma è formulato con il 10% di DMSO. È riportato che il mezzo di congelamento G non sia adatto ai melanociti umani [26], anche se dai dati ottenuti è sembrato, tuttavia, che esso sia adatto all'utilizzo con cellule di melanoma umano.

È significativo che, tra i mezzi di congelamento scelti, due su tre contengano, nelle loro formulazioni, siero, mentre tutti e tre contengono DMSO. Ciò conferma l'importanza di questi componenti per il congelamento delle cellule tumorali.

I mezzi di congelamento con i quali è stata ottenuta una %V/M bassa e una crescita lenta sono E ed F: questi non contengono siero, e solo uno di essi (i.e., E) contiene DMSO. È possibile, quindi, che la mancanza di siero abbia determinato una non idoneità all'utilizzo con le Colo-38. A parte questi casi e quello del Trial 4, in cui, nonostante la %V/M sia stata alta, la crescita si è rivelata lenta, gli altri mezzi di congelamento non hanno mostrato di danneggiare o inibire la crescita delle cellule. Tuttavia, si sono scelti i tre mezzi di congelamento con cui si è osservato il giusto equilibrio tra una buona percentuale di recupero delle cellule vive, dopo scongelamento, una crescita regolare ed una morfologia cellulare tipica delle cellule di melanoma umano.

Ai fini pratici poi è stato usato il mezzo R perché permetteva di congelare le cellule in meno tempo e meno passaggi operativi.

Come per i cheratinociti ed i melanociti, sono stati anche esaminati i dati derivanti dal congelamento con la formulazione prescelta. Nella Tabella 4.9 vengono presi in esame i seguenti dati: il numero totale di cellule vitali congelate (Cell. Cong.), il numero totale di cellule vitali recuperate dopo lo scongelamento della crio-vial (Cell. Scong.), il rapporto in percentuale della quantità di cellule vitali recuperate dopo lo scongelamento, calcolato rispetto al numero di cellule congelate (% Rec.), il numero totale di cellule, vive e morte, scongelate (Tot. V/M), la percentuale di cellule vive e morte scongelate, rispetto al totale di cellule vive e morte scongelate (%V/M), il passaggio a cui appartengono le cellule scongelate (P), il mezzo in cui erano congelate le cellule (M. Cong.), e la percentuale di tempo in cui la crio-vial era immersa in N₂L, piuttosto che nei vapori, rispetto al tempo totale di permanenza nel bidone (N₂L %). Si vuole evidenziare che, relativamente alle vial originali (Trial 1 e 2), i dati presenti nella colonna "Cell. Cong." dovrebbero essere letti come indicato dal fornitore: "quantità di cellule che si dovrebbero recuperare dopo scongelamento".

In seguito allo scongelamento della crio-vial originale sono state recuperate 14.592.000 cellule vitali. Pertanto, nei successivi congelamenti si è operato affinché ciascuna crio-vial contenesse un numero di cellule simile a quello contenuto nella vial CLS. Come è noto, quando le cellule vengono congelate in concentrazioni elevate, esse sopravvivono meglio alle basse temperature [38]; inol-

tre, questo numero è stato scelto affinché, dallo scongelamento di una crio-vial, si potesse usufruire di un numero di cellule tale da allestire un set di esperimenti, e mantenerne una parte in coltura.

Tabella 4.9. Dati riguardanti il processo di congelamento-scongelamento delle Colo-38.

Trial	Cell. Cong.	Cell. Scong.	% Rec.	Tot. V/M	%V/M	P	M. Cong.	N ₂ L%
1	4.000.000	14.592.000	364,8	18.108.000	80,6 / 19,4	P20	CLS	100
2	16.250.000	16.038.000	98,7	19.998.000	80,2 / 19,8	P22	R	85,9
3	16.250.000	11.484.000	70,7	15.048.000	76,3 / 23,7	P22	R	100
4	8.300.000	12.860.000	154,9	14.590.000	86,1 / 13,9	P26	R	100
5	15.660.000	18.060.000	115,3	20.220.000	89,3 / 10,7	P27	R	100
6	15.660.000	13.986.000	89,3	18.942.000	73,8 / 26,2	P27	R	65,9
7	15.660.000	14.520.000	92,7	18.560.000	78,2 / 21,8	P27	R	72
8	15.660.000	16.560.000	105,74	18.440.000	89,8 / 10,2	P27	R	75,4
9	17.190.000	13.820.000	80,4	15.600.000	88,6 / 11,4	P28	R	100
10	17.190.000	12.432.000	72,3	16.548.000	75,1 / 24,9	P28	R	100
11	17.190.000	11.880.000	69,1	15.240.000	78,0 / 22,0	P28	R	58,7
12	16.286.000	12.960.000	79,6	14.700.000	88,2 / 11,8	P29	R	60,9
13	16.286.000	12.000.000	73,7	16.080.000	74,6 / 25,4	P29	R	100
14	16.286.000	11.480.000	70,5	13.880.000	82,7 / 17,3	P29	R	100

CLS: mezzo di congelamento proprietario. Si evidenzia che il numero di Cell. Cong. riportato nel Trial 1 è quello che si dovrebbe trovare dopo scongelamento, come indicato nel protocollo di per la coltura [4].

In Tabella 4.9 si osserva che entrambi i valori %Rec. e %V/M sono sempre stati alti (i.e., superiore al 70 %) in tutti i trial e non sono state osservate variazioni di questa percentuale tra i diversi passaggi. Il tempo di permanenza della crio-vial in N₂L è stato preso in considerazione per valutare la sua influenza sulla percentuale di recupero di cellule vive dopo scongelamento. Confrontando i dati riportati nelle colonne “%V/M” e “N₂L%”, è stato osservato che non sempre una %V/M bassa (relativamente ai valori alti in Tab. 4.9) è corrisposta ad una permanenza breve della crio-vial in N₂L. Si osservino, a tal proposito, i risultati riportati nei Trial 3 e 10: sebbene le crio-vial siano state mantenute per il 100% del tempo coperte dal liquido, il recupero è stato inferiore a quello riportato, e.g., nei Trial 12, in cui si è avuta una %V/M dell’88,2% con una permanenza nel liquido per il 60,9% del tempo, o del Trial 11 (%V/M del 78% e permanenza nel liquido per il 58,7% del tempo). Ciò indicherebbe che la permanenza della crio-vial nel liquido piuttosto che nei vapori dell’azoto non influenzi la %V/M, come osservato anche nei melanociti (Par. 3.5).

4.5. Conclusioni

Nelle nostre colture di cellule di melanoma umano sono osservati 2 fenotipi: L si è mostrato allungato ed aderente alla superficie della fiasca, mentre T, di forma tondeggiante, è stato osservato in sospensione ma anche aderente alle cellule L (Par. 4.4.1). Le Colo-38 hanno mostrato un tempo di coltura di 3-4 giorni, durante i quali viene raggiunta una confluenza del 95% (Par. 4.4.2). La “tripsinizzazione” è avvenuta secondo un metodo messo a punto da noi, in quanto le cellule sono state staccate dalle fiasche mediante l'utilizzo del solo tampone privo di Ca^{2+} ed Mg^{2+} (Par. 4.3.10).

Le Colo-38 hanno mostrato una crescita molto veloce, tanto da ottenere diverse concentrazioni al momento della tripsinizzazione in fiasche con tempi di coltura molto vicini (differenza di poche ore) (Par. 4.4.2).

Per il congelamento delle cellule di melanoma umano sono stati scelti tre mezzi di congelamento differenti, C, G, ed R, scelti in base ai risultati ottenuti da un test preliminare (Tab. 4.8, Fig. 4.2) fra otto diverse formulazioni.

Infine, si può affermare che la coltura delle Colo-38 non ha presentato dei punti critici, in quanto le cellule sono sempre cresciute in modo regolare. Il numero elevato di cellule ottenuto al momento della subcultura, inoltre, ha permesso di crio-preservarne numerosi lotti e di espletare sempre gli esperimenti preposti.

4.6. Bibliografia e note

- [1] Kim, M.J., Lee, Y.J., Nehrbass, U., Song, R., Choi, Y. Detection of melanoma using antibody-conjugated quantum dots in a coculture model for high-throughput screening system. *Analyst* 137(6), 1440-1445 (2012).
- [2] Algazi, A.P., Soon, C.W., Daud, A.I. Treatment of cutaneous melanoma: current approaches and future prospects. *Cancer Manag Res* 17(2), 197-211 (2010).
- [3] Bandarchi, B., Ma, L., Navab, R., Seth, A., Rasty, G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatol Res Pract* 2010, 1-8 (2010).
- [4] Protocollo per la coltura delle cellule di melanoma umano, Colo-38. Il protocollo fu scaricato al momento dell'arrivo delle cellule presso il nostro laboratorio (settembre 2011); attualmente non è più disponibile nel sito CLS, pertanto non si può fornire l'URL.
- [5] Pagina web del sito ATCC, riguardante il terreno ricostituito per la coltura delle cellule di melanoma umano. <<https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-9607.aspx?slp=1#7301B7F956944F8382B6192957C08A3B>> (11 marzo 2013).
- [6] Pagina web del sito ATCC, da cui è possibile scaricare il manuale per la coltura delle cellule di melanoma umano. <<https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-9607.aspx?slp=1#7301B7F956944F8382B6192957C08A3B>> (11 marzo 2013).
- [7] Lu, W., Xiong, C., Zhang, R., Shi, L., Huang, M., Zhang, G., Song, S., Huang, Q., Liu, G.-Y., Li, C. Receptor-mediated transcytosis: a mechanism for active extravascular transport of nanoparticles in solid tumors. *J Control Release* 161(3), 959-966 (2012).

- [8] Zhao, B., Yin, J.-J., Bilski, P.J., Chignell, C.F., Roberts, J.E., He, Y.-Y. Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol* 241(2), 163-172 (2009).
- [9] Huang, X., Teng, X., Chen, D., Tang, F., He, J. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. *Biomaterials* 31(3), 438-448 (2010).
- [10] Huang, X., Zhuang, J., Teng, X., Li, L., Chen, D., Yan, X., Tang, F. The promotion of human malignant melanoma growth by mesoporous silica nanoparticles through decreased reactive oxygen species. *Biomaterials* 31(24), 6142-6153 (2010).
- [11] Zhang, X., Chibli, H., Mielke, R., Nadeau, J. Ultrasmall gold-doxorubicin conjugates rapidly kill apoptosis-resistant cancer cells. *Bioconj Chem* 22(2), 235-243 (2011).
- [12] Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W., Jahnke-Dechent, W. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 3(11), 1941-1949 (2007).
- [13] Harry Reese, S., Hicks, D.J., Amiri, K.I., Wright, D.W. Hairpin DNA coated gold nanoparticles as intracellular mRNA probes for the detection of tyrosinase gene expression in melanoma cells. *Chem Commun (Camb)* 46(30), 5557-5559 (2010).
- [14] McCormack, D.R., Bhattacharyya, K., Kannan, R., Katti, K., Viator, J.A. Enhanced photoacoustic detection of melanoma cells using gold nanoparticles. *Lasers Surg Med* 43(4), 333-338 (2011).
- [15] Tettey, C.O., Nagajyothi, P.C., Lee, S.E., Ocloo, A., Minth An, T.N., Sreekanth, T.V.M., Lee, K.D. Anti-melanoma, tyrosinase inhibitory and anti-microbial activities of gold nanoparticles synthesized from aqueous leaf extracts of *Teraxacum officinale*. *Int J Cosmet Sci* 34(2), 150-154 (2012).
- [16] Ni, Y., Schwaneberg, U., Sun, Z.-H. Arginine deiminase, a potential anti-tumor drug. *Cancer Lett* 261(1), 1-11 (2008).
- [17] Pegoraro, C., Cecchin, D., Gracia, L.S., Warren, N., Madsen, J., Armes, S.P., Lewis, A., MacNeil, S., Battaglia, G. Enhanced drug delivery to melanoma cell using PMPC-PDPA. *Cancer Lett* (doi: 10.1016/j.canlet.2013.02.2007), (2013).
- [18] You, M., Savaraj, N., Wangpaichitr, M., Wu, C., Kuo, M.T., Varona-Santos, J., Nguyen, D.M., Feun, L. The combination of ADI-PEG20 and TRAIL effectively increases cell death in melanoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 394(3), 760-766 (2010).
- [19] Schlesinger, M., Schmitz, P., Zeisig, R., Naggi, A., Torri, G., Casu, B., Bendas, G. The inhibition of the integrin VLA-4 in MV3 melanoma cell binding by non-anticoagulant heparin derivatives. *Thromb Res* 129(5), 603-610 (2012).
- [20] Chalkiadaki, G., Nikitovic, D., Berdiaki, A., Katonis, P., Karamanos, N.K., Tzanakakis, G.N. Heparin plays a key regulatory role via a p53/FAK-dependent signaling in melanoma cell adhesion and migration. *IUBMB Life* 63(2), 109-119 (2011).
- [21] Maduray, K., Karsten, A., Odhav, B., Nyokong, T. In vitro toxicity testing of zinc tetrasulfophthalocyanines in fibroblast and keratinocyte cells for the treatment of melanoma cancer by photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 103(2), 98-104 (2011).
- [22] Il manuale del mezzo di congelamento CFM-1 fu scaricato al momento del suo arrivo; attualmente non è più disponibile nel sito, pertanto non si può fornire l'URL.
- [23] Waymouth, C. and Varnum, D.S. Simple freezing procedure for storage in serum-free media of cultured and tumor cells of mouse. *TCA Manual* 2(1), 311-313 (1976).
- [24] Protocollo di utilizzo del mezzo di congelamento RecoveryTM, scaricabile dal sito Life technologiesTM. <<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/3968%20cell%20culture%20freeze%20media.pdf>> (12 settembre 2012).

- [25] Certificato di analisi scaricabile dal sito Life TechnologiesTM, relativo al lotto di FBS da noi utilizzato. <http://tools.invitrogen.com/Content/SFS/COAPDFs/2010/41Q-6401K_10270.pdf> (4 marzo 2013).
- [26] Protocollo di utilizzo del mezzo di congelamento Synth a Freeze, scaricabile dal sito Life TechnologiesTM. <<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/5040synth-afreeze.pdf>> (12 settembre 2012).
- [27] Protocollo di utilizzo del mezzo di congelamento CFM-2, scaricabile dal sito Sigma-Aldrich[®]. <<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/3/c2639dat.-Par.0001.File.tmp/c2639dat.pdf>> (12 febbraio 2013).
- [28] Protocollo di utilizzo del mezzo GlutaMAXTM, scaricabile dal sito Life TechnologiesTM. <<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/brochures/GlutaMAX-I%20Media%20Supplement-%20-%20Green%20Fact%20Sheet.pdf>> (12 marzo 2013).
- [29] Pagina del sito Life TechnologiesTM riguardante l'RPMI 1640 da noi utilizzato. Il protocollo di utilizzo non è disponibile. <<https://products.invitrogen.com/ivgn/product/-42401018?ICID=search-product>> (12 marzo 2013).
- [30] Protocollo di utilizzo del mezzo RPMI 1640, scaricabile dal sito Lonza. <http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_BenchGuides_RPMI_1640.pdf> (12 marzo 2013).
- [31] Manuale del terreno di coltura per i cheratinociti, scaricabile dal sito Life TechnologiesTM. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/EpiLifeMedium_man.pdf> (4 marzo 2013).
- [32] Manuale del terreno di coltura per i melanociti, scaricabile dal sito Life TechnologiesTM. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/M254_man.pdf> (7 marzo 2013).
- [33] Strober, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*, Appendix 3:Appendix 3B (2001).
- [34] Istruzioni generali per la coltura delle cellule di melanoma umano. Il protocollo fu scaricato al momento dell'arrivo delle cellule presso il nostro laboratorio (settembre 2011); attualmente non è più disponibile nel sito CLS, pertanto non si può fornire l'URL.
- [35] Freshney, R.I. *Culture of animal cells. A manual of basic technique.* (Wiley, quinta edizione, 2005), p. 40.
- [36] Freshney, R.I. *Culture of animal cells. A manual of basic technique.* (Wiley, quinta edizione, 2005), p. 9.
- [37] Freshney, R.I. *Culture of animal cells. A manual of basic technique.* (Wiley, quinta edizione, 2005), p. 41.
- [38] Freshney, R.I. *Culture of animal cells. A manual of basic technique.* (Wiley, quinta edizione, 2005), p. 322.
- [39] Guerrero, M.A., Evans, D.B., Lee, J.E., Bao, R., Bereket, A., Gantela, S., Griffin, G.D., Perrier, N.D. Viability of cryopreserved parathyroid tissue: when is continued storage versus disposal indicated? *World J Surg* 32(5), 836-839 (2008).
- [40] Kleeberger, C.A., Lyles, R.H., Margolick, J.B., Rinaldo, C.R., Phair, J.P., Giorgi, J.V. Viability and recovery of peripheral blood mononuclear cells cryopreserved for up to twelve years in a multicenter study. *Clin Diagn Lab Immunol* 6(1), 14-19 (1999).
- [41] McHenry, C.R., Stenger, D.B., Calandro, N.K. The effect of cryopreservation on parathyroid cell viability and function. *Am J Surg* 174(5), 481-484 (1997).
- [42] Protocollo di utilizzo del colorante Alexa Fluor[®] 488-Phalloidin, scaricabile dal sito Life TechnologiesTM. <<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp00354.pdf>> (3 ottobre 2012).

- [43] Protocollo di utilizzo del colorante Yo-Pro[®], scaricabile dal sito Life Technologies[™]. <<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp03602.pdf>> (3 ottobre 2012).
- [44] Protocollo di utilizzo del colorante PI, scaricabile dal sito Life Technologies[™]. <<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp01304.pdf>> (3 ottobre 2012).
- [45] Protocollo di utilizzo del colorante Hoechst, scaricabile dal sito Life Technologies[™]. <<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp21486.pdf>> (3 ottobre 2012).
- [46] Thong, H.Y., Jee, S.-H., Sun, C.-C., Boissy, R.E. The patterns of melanosome distribution in keratinocytes of human skin as one determining factor of skin colour. *Br J Dermatol* 149(3), 498-505 (2003).
- [47] Freshney, R.I. *Culture of animal cells. A manual of basic technique.* (Wiley, quinta edizione, 2005), p. 34.
- [48] Pagina del sito CLS, riguardante il mezzo di congelamento CM1. Il protocollo non è disponibile. <http://www.cell-lines-service.de/content/e8/e147/e2042/index_eng.html> (12 marzo 2013).
- [49] Lovelock, J.E., Bishop, M.W.H. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphonyde. *Nature* 183(4672), 1394-1395 (1959).

NANOPARTICELLE INORGANICHE

5.1. Introduzione

In questo capitolo è presentata e discussa la sintesi o preparazione e caratterizzazione chimico-fisica di tutte le nanoparticelle (NP) utilizzate per gli studi presentati nel prossimo capitolo.

5.2. Materiali

5.2.1. Reagenti utilizzati per la sintesi

Per i nostri esperimenti abbiamo utilizzato diversi tipi di nanoparticelle. Le NP di silice (NP-Si), le NP d'oro (NP-Au, Nanogap, n. cat. 2305, n. lot. 13.05.2009) [1], ed i due farmaci con azione citotossica (Azl 6 ed Azl 38), sono stati forniti da tre diversi collaboratori.

Le NP d'oro – semini (NP-GS), e le NP di silice con nanoparticelle d'oro adsorbite in superficie (NP-Si)GS sono state sintetizzate e caratterizzate utilizzando i seguenti reagenti: l'acqua deuterata (D_2O ; Sigma-Aldrich[®], n. cat. 293040); l'acido ascorbico (Sigma-Aldrich, n. cat. A7506, 99,3% p/p); l'acido cloridrico (HCl, Sigma-Aldrich, n. cat. 6801, 37,9% v/v); l'acido cloroaurico ($HAuCl_4$, n. cat. 50778, n. lot. 1425361, 49,7% p/p; n. lot. BCBC0485, 49,3% p/p; n. lot. BCBD6024V, 49,7% p/p); l'acido nitrico (HNO_3 , J.T. Baker, n. cat. 6080, 65% v/v); il carbonato di potassio (K_2CO_3 , Fluka Analytcs, n. cat. 205-633-8, 99,9% p/p); l'idrossido di sodio (NaOH, Sigma-Aldrich, n. cat. S0399, 98% p/p); l'isopropanolo (J.T. Baker, n. cat. 8175, 99,5% v/v); il tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium chloride (THPC, Sigma-Aldrich, n. cat. 404861, 80% v/v); il pentaossido di fosforo (P_4O_{10} , Sigma-Aldrich, 99,4% p/p), ed uno standard d'oro per ICP (Fluka analytcs, n. cat. 38168, 1.001 mg/L in HCl, 5% p/p).

Nella sintesi delle NP-Au decorate con molecole citotossiche è stata utilizzata una molecola chiamata “C” (Sigma-Aldrich, n. cat. 672572), il metanolo (MeOH, J.T.Baker, n. cat. 8402), ed il toluene (Carlo Erba, n. cat. 488551). L’etanolo (EtOH, Fluka, n. cat. 02850, 96% v/v) è stato utilizzato per la pulizia dei supporti di alluminio utilizzati per le caratterizzazioni in microscopia a scansione elettronica (di seguito indicati con il termine “*stub*”) (Par. 5.3.3.5). L’acqua distillata e Milli-Q sono state prodotte nel nostro laboratorio (vedi oltre). Le NP-Si, NP-Si)Rhod, NP-Si)Rhod/Hep, Np-Au, l’acido ascorbico, l’HCl, l’HNO₃, il K₂CO₃, l’NaOH, l’isopropanolo, il THPC, il P₄O₁₀, ed il toluene sono stati conservati a temperatura ambiente (RT, i.e., 20-25°C); le molecole Azl 6, Azl 38, e HAuCl₄ sono state conservate sotto vuoto, in presenza di gel di silice e P₄O₁₀, per garantire un ambiente anidro. La D₂O e lo standard d’oro per ICP è stato conservato a 4°C.

5.2.2. Protezione e sicurezza

Gli esperimenti sono stati eseguiti indossando i necessari dispositivi di sicurezza individuali (DPI): camice, e guanti monouso in lattice o nitrile. Le molecole, o soluzioni di, HCl, HNO₃, NaOH, isopropanolo, P₄O₁₀, e toluene sono stati sempre utilizzati sotto cappa, con le dovute precauzioni. Il THPC e l’HAuCl₄, essendo considerati tossici dai fornitori [2, 3] sono stati maneggiati con le opportune precauzioni.

5.2.3. Materiale consumabile utilizzato per la sintesi

Per la sintesi e caratterizzazione delle NP è stato utilizzato il materiale in plastica riportato qui di seguito: dei puntali non sterili, di volume 1000, 200, e 20 µL (Eppendorf o Gilson), le pipette graduate da 10 e 25 mL (Corning), navette da pesata, ed i tubi in plastica, sterili (50 / 15 mL, Corning o TPP) o non sterili (1,5 mL, TPP). Inoltre, è stato utilizzato del materiale consumabile in vetro comprendente: i becher; le bottiglie in vetro Pyrex[®], con tappo a vite, da 20 mL (bottigliette); dei matracci di varie dimensioni; dei palloni in vetro da 100 mL; le pipette graduate da 10 e 25 mL; le pipette Pasteur, non sterili, da 150 mm; e dei vetrini da orologio in vetro. Inoltre, è stata utilizzata della carta da pesata (Wägebapier MN 226, Macherey-Nagel); delle spatole di varie misure (metallo e plastica).

5.2.4. Materiale consumabile utilizzato per la caratterizzazione

Per la caratterizzazione delle NP sono stati utilizzati: una cuvetta in quarzo (Hellma, QS 1000 µL, cammino ottico: 1 cm); una cuvetta in quarzo per piccoli volumi (microcuvetta; Hellma, Z600393, 1 cm cammino ottico); dei dischi adesivi in carbone (Electron Microscopy Sciences, *Conductive*

Carbon Adhesive Tabs, Ø 25 mm); dei retini per microscopia elettronica a trasmissione, in rame, ricoperti con un film di Formvar-carbone (Electron Microscopy Sciences, 400 Mesh), e gli stub in alluminio per la microscopia elettronica a scansione (Electron Microscopy Sciences, Hitachi, S-450).

5.2.5. Strumenti

Per i nostri esperimenti abbiamo utilizzato gli strumenti riportati qui di seguito: un agitatore magnetico (Falc, modello: F60); un bagno a ultrasuoni (Bandelin Sonorex, modello: RK31, 35 kHz); una bilancia analitica sensibile alla quarta cifra decimale (Kern, ABS 120-4); una centrifuga da banco (CFG1; ThermoFisher Scientific, modello: Heraeus Maegafuge 11R); un dynamic light scattering (DLS, Zetasizer Malvern Instruments Ltd, modello: Nano ZS, con Dispersion Technology Software 5.00); un elettrodo per la misurazione della carica superficiale delle particelle (Malvern, modello: Universal Dip Cell); un frigorifero (Indesit, modello: SA300L); un freezer a pozzetto (Ignis, modello: ICF221; -28 - -30°C); una microcentrifuga (CFG2; Eppendorf; modello: Mini Spin Plus 5453); delle micropipette a volume variabile (Eppendorf e Gilson); due microscopi elettronici a scansione (SEM; (i) Hitachi, modello: S-4000, completo di un microanalizzatore a raggi X (EDS; Noran, modello: IFPS, Thermo Noran) e software per acquisizione dei dati (KeveX, modello: Sigma-32, e (ii) Fei, modello: Quanta Feg 250); tre microscopi elettronici a trasmissione (TEM; (i) JEOL, modello: JEM-100S, 80–100 kV, per la visualizzazione dei campioni; (ii) JEOL, modello: JEM-2010, 200 kV, per la visualizzazione e l'acquisizione di immagini, e (iii) Zeiss, modello: Leo 912 Omega, 120 kV, risoluzione 0,5 nm, per la visualizzazione e l'acquisizione di immagini); un sistema per la produzione di acqua ultrapura, con il quale è stata prodotta l'acqua distillata e Milli-Q (Siemens, modello: LaboStar™ TWF UV 7); uno spettrometro al plasma, accoppiato induttivamente, con spettrometria ad emissione ottica (ICP-OES; Varian, modello: 710-ES); uno stereomicroscopio (Optika, modello: SZM-2; ingrandimento 7-45×); uno spettrofotometro UV-visibile (Varian, modello: Cary 50 Scan UV-Vis spectrophotometer); uno spettroscopio per la risonanza magnetica nucleare (NMR; Varian, 400 MHz), una stufa non ventilata (Binder GmbH, E28), ed un vortex (Gilson, modello: GVLab). Tutti gli strumenti in nostro possesso sono stati mantenuti sempre perfettamente puliti e calibrati. Per quanto riguarda quelli da noi utilizzati, nel limite delle nostre osservazioni, sono risultati ben funzionanti.

5.2.6. Analisi dei dati

I dati sperimentali sono stati analizzati, ed opportunamente presentati utilizzando i seguenti programmi: Microsoft Office Excel 2007, Origin 6.0, ed Image Tool 3.00.

5.3. Metodi

5.3.1. Utilizzo e sintesi delle NP

Le NP che sono state sintetizzate o preparate da collaboratori esterni al laboratorio, sono state utilizzate per ulteriori esperimenti come descritto nei prossimi paragrafi. Laddove invece si indica sintesi, preparazione, o coniugazione ci si riferisce alle formulazioni da noi prodotte.

5.3.1.1. Utilizzo delle NP-Au

Le NP-Au sono state gentilmente fornite da un nostro collaboratore spagnolo. Esse sono disperse in toluene. Prima del loro utilizzo, una goccia è stata sempre osservata allo stereomicroscopio, per accertarsi che le particelle fossero ben redisperse nel loro mezzo.

Tuttavia, per alcuni esperimenti è stato necessario diluire le NP, per riportarle alla concentrazione originaria (spettri UV). La diluizione è stata apportata aggiungendo un uguale volume di toluene, all'aliquota presa in considerazione. Nel testo si farà riferimento alle NP-Au "diluite" con l'acronimo "NP 1:2".

5.3.1.2. Utilizzo delle NP-Si)RHOD e NP-Si)RHOD/Hep

Le NP-Si)RHOD e NP-Si)RHOD/Hep sono state gentilmente fornite da un nostro collaboratore della Università di Napoli. Esse sono disperse in acqua distillata. Prima del loro utilizzo, esse sono state sempre redisperse per sonicazione (bagno a ultrasuoni), ed osservate allo stereomicroscopio. Le NP-Si)RHOD tendono a sedimentare nel tempo, mentre la dispersione delle NP-Si)RHOD/Hep è rimasta stabile per un tempo superiore alle 24 h.

Quando è stato necessario ridisperdere queste NP in acqua Milli-Q, esse sono state centrifugate (CFG 1) a 13.523 g, per 11 minuti, ed a 20°C come consigliato dai collaboratori [4].

5.3.1.3. Utilizzo delle NP-Si

Le NP-Si sono state gentilmente fornite da un nostro collaboratore della Università di Napoli. Queste NP sono state sintetizzate secondo il metodo di Stöber e sono originariamente disperse in etanolo. Nei nostri esperimenti si è osservato che le NP-Si (in etanolo), se lasciate a riposo per un tempo superiore a 24 h, tendono a sedimentare, mostrando un pellet bianco ed un surnatante incolore. Tuttavia, la dispersione omogenea appare lattiginosa.

Prima del loro utilizzo, quindi, le NP-Si sono state accuratamente redisperse secondo il metodo che viene descritto di seguito. Inizialmente, si è osservata la dispersione delle NP: in assenza di

precipitato sul fondo del tubo, si è prelevata una goccia della dispersione con una pipetta Pasteur, la si è riposta in un vetrino da orologio, ed infine questa è stata osservata allo stereomicroscopio, con il massimo ingrandimento. Se la goccia è apparsa limpida, senza alcun aggregato visibile, le NP sono state utilizzate. Se l'osservazione macroscopica della dispersione di NP-Si mostrava un precipitato bianco sul fondo della provetta, si è prima smosso il pellet, agitando il tubo in plastica che contiene le NP-Si prima a mano e poi con un vortex (1 minuto). Infine, il tubo con la dispersione di NP è stato riposto nel bagno a ultrasuoni per circa 45 minuti, mantenendo l'acqua distillata a RT. Dopo la sonicazione, si è osservata nuovamente una goccia della dispersione allo stereomicroscopio. Se le NP sono apparse ben disperse, si è proceduto al loro utilizzo. In caso contrario, si è ripetuto il ciclo di sonicazione (per una volta, alle stesse condizioni).

Quando è stato necessario l'utilizzo delle NP-Si disperse in H₂O (Par. 5.3.4), dopo aver sonicate le NP, ed essersi accertati che le queste fossero ben ridisperse, è stata prelevata un'aliquota dal contenitore originale, è stata riposta in un tubo in plastica sterile (15 mL), e centrifugata con i seguenti parametri: 3.026 g, per 10 minuti, e a 20°C (CFG1). Il surnatante ottenuto dopo centrifuga è stato prelevato aseptivamente, ed il pellet redisperso in un uguale volume di H₂O Milli-Q sterile.

5.3.1.4. Sintesi delle NP-GS

Il lavaggio della vetreria necessaria per la sintesi, e la stessa sintesi delle NP-GS sono avvenuti secondo quanto riportato in letteratura [5, 6]. Tuttavia, alla metodica originale sono state apportate alcune modifiche, che sono descritte brevemente nel protocollo che segue.

Protocollo.

- 1- Tutta la vetreria è stata pulita mediante lavaggio con acqua regia (i.e., HCl:HNO₃ in rapporto 3:1), poi con una soluzione acquosa satura di NaOH in isopropanolo, ed infine con abbondante acqua Milli-Q, fino a neutralità (cartina tornasole).
- 2- Essendo l'HAuCl₄ un composto estremamente igroscopico, prima di effettuare le pesate ci si è assicurati che l'umidità relativa del laboratorio fosse tra il 55 ed il 60%; inoltre, durante le pesate, all'interno della bilancia erano presenti due becher con P₄O₁₀.
- 3- In un pallone ad 1 collo (100 mL) sono stati versati inizialmente 45,5 mL di H₂O Milli-Q, e poi sotto agitazione (settaggio 2,5, agitatore Falc, modello: F60) 1,5 mL di NaOH (0,2 M), 1 mL di THPC (12 µL/mL), e, per ultimo, dopo 5 minuti [6], 2 mL di HAuCl₄ (25 mM). Al momento dell'aggiunta di HAuCl₄, la velocità dell'agitatore magnetico è stata aumentata (settaggio 3,5, agitatore Falc, modello: F60) [6]. Questa miscela è stata preparata a RT e al buio.
- 4- La dispersione così ottenuta è stata conservata a 4°C.

5.3.1.5. Preparazione delle NP-Si)GS

Anche la procedura per preparare le NP-Si)GS è stata descritta, anche se non completamente, in letteratura [7]. La metodica, comprese le modifiche apportate da noi, è descritta brevemente nel protocollo che segue.

Protocollo.

- 1- Prima del loro utilizzo, le NP-Si sono state ridisperse come descritto nel Paragrafo 5.3.1.3.
- 2- 1 mL di NP-Si (in etanolo, RT) è stato pipettato nei 50 mL di dispersione di NP-GS (4°C; protette dalla luce).
- 3- La dispersione nanoparticellare così ottenuta è stata lasciata riposare per 3 h a RT, e successivamente essa è stata centrifugata (CFG1; tubi in plastica da 50 mL) 2 volte, secondo i seguenti parametri: 1650 g, a 25°C, per 1 h. Dopo ogni centrifuga, il pellet è stato redisperso in 50 mL di H₂O Milli-Q, e la dispersione sottoposta a sonicazione per 2-3 minuti nel bagno a ultrasuoni.
- 4- Le NP-Si)GS sono state conservate a 4°C.

5.3.1.6. Sintesi delle NP-Si)Au

Le NP-Si)Au sono state sintetizzate seguendo quanto descritto in letteratura [7]. Sono state utilizzate le NP-Si)GS da noi sintetizzate (Par. 5.3.1.4), le quali sono state fatte reagire con l'HAuCl₄, il K₂CO₃, e l'acido ascorbico. Il processo di sintesi è descritto nei dettagli nel protocollo riportato qui di seguito.

Protocollo.

- 1- Una soluzione di HAuCl₄ (1% p/v; H₂O Milli-Q) è stata preparata utilizzando le stesse precauzioni descritte nel Paragrafo 5.3.1.4 (punto 2 del protocollo).
- 2- È stata preparata anche una soluzione di K₂CO₃ (0,25 mg/mL), ed una soluzione di acido ascorbico (100 mM), entrambe in H₂O Milli-Q.
- 3- 2 mL di HAuCl₄ (1% p/v) sono stati aggiunti nel matraccio contenente i 100 mL della soluzione di K₂CO₃. La soluzione è stata agitata per inversione manuale. In questo modo è stata preparata la soluzione di rivestimento delle NP-Si)GS. Questa soluzione viene indicata nel testo con l'acronimo "s-riv".
- 4- 10 mL di s-riv sono stati dispensati in un becher o in una bottiglietta, e la soluzione è stata mantenuta a RT, al buio, ed in costante agitazione moderata (settaggio 2,5, agitatore Falc, modello: F60).

- 5- 2 mL di NP-Si)GS sono stati pipettati nei 10 mL di s-riv, e la dispersione è stata lasciata RT, al buio, ed in agitazione moderata per 10 minuti,.
- 6- 0,6 mL di acido ascorbico 100 mM sono stati aggiunti, infine, alla dispersione nanoparticellare descritta al punto 5, per ottenere le NP-Si)Au. La letteratura [7] riporta che in seguito all'aggiunta dell'acido si ottiene un colore blu.
- 7- La dispersione di NP-Si)Au è stata centrifugata (CFG1 e tubi in plastica da 15 mL) per due volte secondo i seguenti parametri: 1650 g, a 25°C, per 30 minuti, e ridispersa in un uguale volume di H₂O Milli-Q.
- 8- Le NP-Si)Au sono state conservate a 4°C.

5.3.1.7. Preparazione delle DNPC

Per la sintesi delle DNPC sono state utilizzate le NP-Au, le molecole citotossiche Azl 6 o Azl 38 opportunamente modificate con l'aggiunta di uno spaziatore (indicate rispettivamente con gli acronimi s-Azl 6 o s-Azl 38), ed una molecola da noi indicata "C" (coating). Le varie fasi del processo di preparazione sono descritte in modo dettagliato nel protocollo che segue.

Protocollo.

- 1- Sono state preparate le soluzioni madre (10 mg/mL) di s-Azl 6 ed s-Azl 38 in microtubi da centrifuga semplici oppure sterili e provvisti di o-ring . La molecola s-Azl 6 è stata disciolta in toluene, mentre la s-Azl 38 in una miscela toluene:metanolo preparata con 4 volumi di toluene e 1 volume di metanolo, e da noi indicata con l'acronimo "t:m". Le soluzioni madre di s-Azl 6 o s-Azl 38 sono state sottoposte a sonicazione (bagno a ultrasuoni) per 10 minuti, ed è stata accertata la dissoluzione delle molecole mediante osservazione allo stereomicroscopio
- 2- Per ciascuna molecola citotossica utilizzata, a partire dalla soluzione madre sono state preparate delle diluizioni. In particolare, nella Tabella 5.1 sono indicati i campioni preparati (campioni), la diluizione apportata rispetto alla madre (Diluizione), e la corrispondente concentrazione di s-Azl 6, o s-Azl 38, espressa in µg/mL (Conc. farmaco).
- 3- A questo punto, sono stati preparati dei microtubi da centrifuga, in ciascuno dei quali sono stati dispensati 50 µL di NP-Au, e 50 µL di s-Azl 6 o s-Azl 38 (varie diluizioni).
- 4- La dispersione così ottenuta, da noi indicata come DNP, è stata lasciata reagire per 3 h, al buio, e RT. Nell'arco di queste 3 h, i campioni sono stati vortexati per 1 secondo, ogni 30 minuti.
- 5- È stata preparata una soluzione della molecola "C" (densità 1,065 g/mL) in toluene, con concentrazione 1,33 mg/mL.

- 6- Sono stati dispensati 50 μL della soluzione “C” in ogni aliquota di DNP. La dispersione così ottenuta, da noi indicata come DNPC, è stata lasciata reagire per 1 h, al buio e RT, ed i campioni sono stati vortexati per 1 secondo, ogni 30 minuti.

Tabella 5.1. Parametri relativi alla centrifugazione dei campioni di DNPC.

Campioni	Diluizione	Conc. farmaco ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	1:165	60,61
2	1:185	54,05
3	1:220	45,45
4	1:250	40,00
5	1:275	36,36
6	1:350	28,57
7	1:355	28,17
8	1:500	20,00
9	1:625	16,00
10	1:1.100	9,091

Variazioni al protocollo. Le modifiche apportate al protocollo hanno riguardato i volumi delle soluzioni e dispersioni di D (concentrazione 1/250), NP-Au, e C (concentrazione 1,33 mg/mL) aggiunti per preparare le DNPC. In Tabella 5.2 sono riportati i volumi delle soluzioni/dispersioni di D (D 1/250), di NP-Au, e di C (C 1,33 mg/mL) aggiunti per preparare le diverse formulazioni. Nella preparazione di queste formulazioni, le NP-Au sono state sempre utilizzate diluite, come descritto nel Paragrafo 5.4.4 (NP 1:2). Con “S” viene indicata la formulazione standard, cioè quella descritta nel protocollo riportato sopra.

Tabella 5.2. Formulazioni per la preparazione delle DNPC.

Formulazione	D 1/250 (μL)	NP 1:2 (μL)	C 1,33 mg/mL (μL)
S	50	50	50
A	100	50	50
B	100	50	100
C	150	50	50

A questo punto, le DNPC si trovano disperse in toluene, ma necessitano di essere disperse in acqua. Per fare ciò sono stati messi a punto due metodi, che verranno descritti come “Metodo 1” e “Metodo 2”.

Metodo 1.

- 7a- I microtubi contenenti i campioni sono stati lasciati aperti, sotto cappa, in modo che tutto il solvente evaporasse.
- 8a- Successivamente, 100 μL di H_2O Milli-Q sono stati pipettati in ciascun microtubo.
- 9a- I campioni sono stati sonicati per 10 minuti (bagnetto a ultrasuoni), e successivamente sono stati centrifugati secondo i parametri riassunti in Tabella 5.3.

Tabella 5.3. Parametri relativi alla centrifugazione dei campioni di DNPC.

Centrifuga	Forza centrifuga (g)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (min)
CFG1	20.016	4	60
CFG2	14.100	RT	90

- 10a- Nel caso in cui il pellet non si sia mostrato ben separato dal surnatante, i campioni sono stati centrifugati una seconda volta, per un tempo inferiore (i.e., 30 minuti, CFG1 e CFG2).
- 11a- Il surnatante è stato separato dal pellet, riposto in un microtubo da centrifuga, e lasciato essiccare in stufa (60°C).
- 12a- Il surnatante essiccato è stato risospeso in 100 μL di toluene (s-Azl 6) o della soluzione di t:m (s-Azl 38), ed analizzato allo spettrofotometro UV-visibile (190-1100 nm) come descritto nel Paragrafo 5.3.3.1.
- 13a- Il pellet ottenuto al punto 10a è stato risospeso in 100 μL di H_2O Milli-Q.

Metodo 2.

- 7b- I microtubi contenenti i campioni sono stati centrifugati con i parametri descritti in Tabella 5.3 e come indicato al punto 10a.
- 8b- Il surnatante è stato separato dal pellet, ed è stato lasciato seccare in stufa, a 60°C .
- 9b- Successivamente, il surnatante essiccato è stato risospeso in 100 μL di toluene (s-Azl 6) o della soluzione di t:m (s-Azl 38), ed analizzato allo spettrofotometro UV-visibile (190-1100 nm) come descritto nel Paragrafo 5.3.3.1.
- 10b- Il pellet ottenuto al punto 7b è stato risospeso in 100 μL di H_2O Milli-Q.

5.3.2. Calcolo del numero di NP per unità di volume

I calcoli per fornire una stima del numero di NP presente in un'unità di volume sono stati gentilmente suggeriti da un nostro collaboratore spagnolo [8]. Innanzitutto, si è calcolato il volume di una NP (V_p):

$$V_p = (4/3) \times \pi \times r^3$$

dove r è il raggio della NP. Successivamente, è stata calcolata la massa di una NP (M_p):

$$M_p = V_p \times \rho$$

dove ρ è la densità (bulk) del materiale che costituisce la NP. Infine, il numero di particelle (N_p) è stato calcolato nel seguente modo:

$$N_p = M_t / M_p$$

dove M_t è la massa totale, per mL. Sebbene il metodo per il calcolo del numero di particelle per unità di volume sia stato presentato in questo capitolo, i risultati sono riportati nel Paragrafo 5.4.3, in quanto ritenuti utili per la discussione dei dati ottenuti dall'esposizione delle cellule alle NP.

5.3.3. Caratterizzazione chimico-fisica

5.3.3.1. Spettroscopia UV-visibile

Sono stati registrati gli spettri UV-Vis (190-1100 nm) delle soluzioni e dispersioni di HAuCl_4 , THPC, NP-GS, NP-Au, e dei surnatanti di NP-Si)GS, e DNPC. I campioni sono stati analizzati tal quali, oppure diluiti nel veicolo della soluzione o dispersione presa in esame. Per alcune analisi sono stati anche registrati gli spettri delle soluzioni di THPC in D_2O .

5.3.3.2. Analisi all'ICP-OES

Le analisi all'ICP-OES (di seguito solo ICP) sono state condotte sulle soluzioni madre di HAuCl_4 , con lo scopo di confermare che la quantità d'oro presente in soluzione fosse uguale a quella pesata. I campioni da analizzare sono stati preparati secondo il protocollo qui descritto.

Protocollo:

- 1- L' HAuCl_4 è stato pesato come descritto nel Paragrafo 5.3.1.4. Poco prima delle analisi, sono state preparate 2 soluzioni con concentrazione 25 mM, e 2 soluzioni con concentrazione 1% p/v. Entrambe le madri sono state preparate in acqua Milli-Q utilizzando della vetreria precedentemente lavata in acqua regia (Par. 5.3.1.4).

- 2- È stata preparata anche 1 soluzione di HNO₃ 1% v/v in H₂O Milli-Q. La vetreria usata è stata lavata in acqua regia (Par. 5.3.1.4).
- 3- Poco prima dell'analisi, sono state preparate 4 soluzioni (H₂O distillata) con lo standard d'oro per ICP, con concentrazione 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, le quali sono state utilizzate per costruire la curva di calibrazione di riferimento. Come bianco è stata utilizzata la soluzione di HNO₃ 1% (punto 2)
- 4- Tutte e due le soluzioni madre di HAuCl₄, poco prima dell'analisi, sono state diluite in HNO₃ 1% v/v, fino ad ottenere una concentrazione d'oro pari all'1% v/v.
- 5- Dai risultati ottenuti è stata calcolata la percentuale d'oro misurata, rispetto a quella attesa.

Tutte le soluzioni necessarie per l'analisi all'ICP sono state preparate in tubi di plastica, sterili, per evitare l'adsorbimento dell'oro sul vetro dei matracci.

5.3.3.3. *Analisi all'NMR*

Le analisi all'NMR sono state effettuate al fine di approfondire la conoscenza sulla reattività del THPC, e la stabilità delle sue soluzioni nel tempo. Sono stati analizzati diversi campioni, i quali sono stati preparati con acqua Milli-Q e D₂O (contenitori in vetro lavati con acqua regia) secondo le metodiche descritte di seguito.

Campione 1: soluzione di THPC con concentrazione 12 µL/mL, in H₂O Milli-Q.

Campione 2: soluzione di THPC con concentrazione 12 µL/mL, in D₂O.

Campione 3: soluzione di THPC con concentrazione 6 µL/mL, in D₂O.

I Campioni 1-2 sono stati preparati in modo tale che la concentrazione di THPC fosse uguale a quella usata per la sintesi delle NP-GS. Tutte le soluzioni sono state filtrate (0,22 µm) prima dell'analisi.

5.3.3.4. *Analisi al TEM*

Le NP-Si, NP-GS, e NP-Si)GS state osservate al TEM. La preparazione dei campioni è avvenuta secondo due metodiche principali. In un caso, (Metodo 1) quando le particelle sono state osservate nel loro mezzo disperdente originale, il campione è stato preparato semplicemente pipettando 4 µL di dispersione su un retino, e lasciandola asciugare per 6 h all'aria. In un secondo metodo di preparazione (Metodo 2), che ha riguardato solo le NP-Si, un'aliquota di particelle in EtOH è stata centrifugata (CFG2, 14.100 g, 20 minuti, RT) e poi le NP risospese in un uguale volume di H₂O distil-

lata. A questo punto, 4 μL della dispersione sono stati pipettati su un retino. I retini sono stati conservati nella loro apposita scatola, a RT, e maneggiati con delle apposite pinzette a punta sottile, evitando qualsiasi danneggiamento o ripiegamento del retino stesso.

5.3.3.5. *Analisi al SEM*

Le NP-Si, NP-GS, e NP-Si)GS state osservate al SEM. I supporti per i campioni sono stati preparati secondo quanto qui descritto. Prima dell'utilizzo, gli *stub* sono stati lasciati immersi nell'etanolo per 10 minuti, e poi lasciati asciugare sotto cappa. In seguito, sopra ogni *stub* è stato attaccato un disco adesivo in carbone. Questo è stato maneggiato con guanti e pinzette, prestando estrema cura a non rovinarne la copertura di carbone.

La preparazione dei campioni è avvenuta secondo 4 metodiche principali. In un primo caso, (Metodo 1), 30 μL di campione sono stati pipettati sullo *stub*, e poi lasciati asciugare all'aria per 6 h. In un secondo caso (Metodo 2), invece, alcune gocce di NP sono state pipettate su un vetrino da orologio e lasciate asciugare all'aria. A questo punto, con una spatola è stata raschiata e polverizzata la patina che si era formata sul vetrino. La polvere ottenuta è stata poi disposta sul disco adesivo di carbone. Nel terzo caso (Metodo 3), i campioni sono stati liofilizzati e la polvere ottenuta è stata riposta sullo *stub*. Nel Metodo 4, utilizzato solo in DE, alla polvere derivante dalla liofilizzazione è stata aggiunta H_2O distillata, ed una goccia della dispersione è stata pipettata direttamente sullo *stub* non rivestito dal dischetto in carbone. Tutti i campioni, (Metodi 1-3), sono stati conservati sotto vuoto, a RT, fino al momento dell'utilizzo. I campioni osservati in Germania sono stati asciugati in stufa.

5.3.3.6. *Analisi al DLS*

Le dispersioni NP-Si, NP-GS, NP-Si)GS, ed i surnatanti di NP-GS, NP-Si)GS ottenuti nel processo di sintesi, sono stati analizzati al DLS. Il campione da analizzare al DLS è stato riposto in una cuvetta in plastica, con 4 facce ottiche, perfettamente pulita, e priva di impronte, polvere, e fibre naturali o artificiali. Inoltre, prima di procedere all'analisi ci si è assicurati che non vi fossero bolle d'aria adese alle pareti. Ciascun campione, prima di essere analizzato al DLS, è stato diluito secondo quanto indicato in Tabella 5.4.

Come è stato possibile osservare, in Tabella 5.4 sono riportati i volumi utilizzati per operare le diverse diluizioni, ed in particolare: il numero che identifica il tipo di diluizione (Diluizione), il volume di dispersione nanoparticellare (Campione), il volume di acqua (Acqua Milli-Q), ed il volume di idrossido di tetrametilammonio (TMAOH) aggiunti in cuvetta. I campioni di NP-Si (dispersioni)

sono stati preparati secondo le diluizioni 1-7, mentre le altre NP (dispersioni o surnatanti) soltanto con la diluizione 1.

Tabella 5.4. Volumi per la preparazione dei campioni per analisi al DLS.

Diluizione	Volumi aggiunti in cuvetta (μL)		
	Campione	Acqua Milli-Q	TMAOH
1	10	1.000	/
2	1	1.000	/
3	5	1.000	10
4	60	1.000	/
5	5	1.000	20
6	5	1.000	70
7	5	1.000	120

Quando sono state preparate le diluizioni, nella cuvetta è stato dispensato per primo il campione, e poi l'acqua e/o TMAOH, affinché le NP venissero accuratamente disperse.

La cuvetta col campione all'interno è stata posizionata nello strumento e si è proceduto con l'analisi. Le misurazioni per il rilevamento del diametro idrodinamico sono state ripetute da 3 a 5 volte per campione, e registrate prima a 25°C e poi a 37°C. Prima della lettura a 37°C, il campione è stato equilibrato alla temperatura più alta, per 5-10 minuti.

Per la misurazione del diametro delle particelle i campioni sono stati esposti ad un raggio laser rosso con angolazione di 173°. I dati ottenuti sono derivati da 3-5 misurazioni, ciascuna delle quali è consistita in 10 letture, per un tempo totale di 3 minuti. Quindi, per 5 misurazioni sono state effettuate 50 letture, per un tempo totale di 15 minuti.

Per ogni temperatura di lettura, l'analisi dimensionale ha preceduto sempre la misurazione della carica superficiale. Per la misurazione di quest'ultima, è stato introdotto un elettrodo all'interno della cuvetta. I dati ottenuti sono derivati da 3-6 misurazioni, ciascuna delle quali è derivata da 10 letture, per un tempo totale di circa 1 minuto. Quindi, per 6 misurazioni sono state effettuate 60 letture, e per registrarle si sono impiegati circa 6 minuti.

Anche per il DLS, dei dati ottenuti è stata calcolata la media e la deviazione standard.

5.3.3.7. Dimensionamento da microscopia

Una volta ottenute le immagini digitali al SEM e TEM, le particelle in esse presenti sono state misurate mediante l'utilizzo del software Image Tool 3.00. In seguito è stata calcolata la media, la

deviazione standard e la deviazione standard calcolata in percentuale rispetto alla media dei dati ottenuti, ed è stato costruito un grafico con la distribuzione dimensionale (Origin 6.0).

5.3.4. Verifica della stabilità delle NP nei terreni di coltura

Si è ritenuto opportuno osservare la stabilità delle NP nel terreno di coltura, in quanto la presenza di aggregati può portare a conclusioni fuorvianti nell'analisi dei dati dei test di tossicità. Inoltre, la formazione di aggregati determina una minore probabilità di penetrazione all'interno delle cellule.

Le NP per le quali si sono effettuati i test di aggregabilità sono: NP di silice [NP-Si], NP di oro – semini [NP-GS], NP di oro [NP-Au], NP di silice decorate con NP-GS [NP-Si)GS], NP di silice decorate con rodamina [NP-Si-RHOD], NP di silice decorate con rodamina ed eparina [NP-Si-RHOD/Hep]. Inoltre si sono testate delle NP lipidiche più comunemente distinte in nanoemulsione (NE) e nanocapsule (NC) come tali o contenenti diversi farmaci (i.e., Azl 6 ed Azl 38).

Per testare l'aggregabilità delle particelle da noi utilizzate si è proceduto come descritto nel protocollo che si trova qui di seguito. Se non altrimenti indicato, il terreno ricostituito è stato utilizzato previa equilibratura nell'incubatore.

Protocollo.

- 1- Le particelle sono state inizialmente osservate macroscopicamente, nel loro contenitore originale, per verificare la presenza di sedimenti o separazione di fasi. Successivamente sono state osservate allo microscopio (stereomicroscopio), con il massimo ingrandimento (45×).
- 2- Successivamente, una goccia di dispersione nanoparticellare è stata pipettata su un vetrino da orologio, ed osservata allo stereomicroscopio. Nel caso fossero presenti aggregati, si è proceduto alla loro ridispersione secondo le modalità indicate dal fornitore per ciascuna nanoparticella.
- 3- Sono state preparate due serie (Serie 1 e Serie 2) di microtubi da centrifuga, in plastica, sterili per ciascun tipo di nanoparticelle da testare.
- 4- In seguito, 100 µL di dispersione nanoparticellare sono stati pipettati in ciascun microtubo della Serie 1 e della Serie 2.
- 5- I microtubi della Serie 1 sono stati centrifugati per due volte, in CFG2, a 14.000 g, e per 20 minuti, RT.
- 6- Quando si è osservata la formazione del pellet, il surnatante è stato aspirato sterilmente, e sono stati aggiunti 500 µL di terreno ricostituito. Quando il pellet non si è formato, si sono aggiunti 400 µL di terreno ai 100 µL di dispersione.
- 7- Nei microtubi della Serie 2 sono stati aggiunti, sterilmente, 400 µL di terreno ricostituito.

- 8- Tutti i campioni (Serie 1 e Serie 2) sono stati sistemati nell'incubatore, ed i tappi sono stati svitati leggermente per permettere l'ingresso della CO₂.
- 9- I campioni sono stati incubati per 30 minuti; tuttavia, ogni 10 minuti è stata verificata la presenza di precipitato (prima a livello macroscopico, poi allo stereomicroscopio).
- 10- I campioni sono stati lasciati nell'incubatore per 24 h. Al termine di questo periodo di tempo, è stata controllata nuovamente la presenza di precipitato nelle vial.

5.4. Presentazione e discussione dei risultati

In questo paragrafo sono descritti i risultati ottenuti dalle analisi effettuate su ciascun tipo di NP. Come precedentemente accennato, non sempre la strumentazione utilizzata era presente presso il laboratorio di afferenza, pertanto, nella Tabella 5.5 sono elencate le strutture dove è stata effettuata la caratterizzazione, ed il corrispondente acronimo utilizzato nel testo. Se nessun acronimo è indicato, si intenderà che l'analisi è stata effettuata presso il laboratorio di afferenza.

Tabella 5.5. Laboratori presso i quali è stata effettuata la caratterizzazione delle NP.

Acronimo	Denominazione laboratorio
CA-1	Laboratorio di microscopia elettronica – Dip. Scienze Biomediche - UniCa
CA-2	Dipartimento di Chimica – UniCa
DE	Istituto di chimica macromolecolare e centro di ricerca dei materiali “Albert Ludwings” – Università di Friburgo – DE
ES	Dipartimento di Chimica Fisica – Università di Santiago de Compostela – ES
NA	Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica – Università Federico II – Napoli
ECO	Laboratorio Ecoserdiana, Serdiana (CA)

5.4.1. Sintesi di NP-GS

Le NP-GS sono state sintetizzate seguendo il protocollo riportato in letteratura [5]. Questa metodica di preparazione è apparentemente molto semplice, infatti è sufficiente miscelare dei reagenti sotto agitazione, per ottenere una dispersione finale color coca-cola. Tuttavia, già dalle prime volte si è notato che questa colorazione non sempre veniva ottenuta: al momento di ripetere l'esperimento per accertarsi della sua riproducibilità, sono state ottenute colorazioni che variavano dal viola, al rosso-porpora, al marrone scuro. Il colore della dispersione finale è di fondamentale importanza in quanto, come è noto [9], rispecchia le dimensioni delle NP d'oro. In particolare, secondo gli autori, con un colore coca-cola si sarebbero dovute ottenere delle NP-GS del diametro di 1-3 nm [5].

Si sono valutati, quindi, tutti i parametri che avessero potuto influire sul diametro delle NP, da cui dipendeva il colore finale della dispersione.

Innanzitutto, si sono osservati eventuali cambiamenti macroscopici della soluzione di HAuCl_4 , in quanto, secondo gli autori [5], questa si sarebbe dovuta scurire nel corso dei mesi, fino a diventare rossa. Noi non abbiamo osservato nessun cambiamento nella colorazione. Ciononostante, sono stati registrati gli spettri UV-Vis di diverse soluzioni di HAuCl_4 , alcune appena preparate (nuove), ed altre preparate almeno tre mesi prima (vecchie). I risultati sono riportati nel grafico in Figura 5.1.

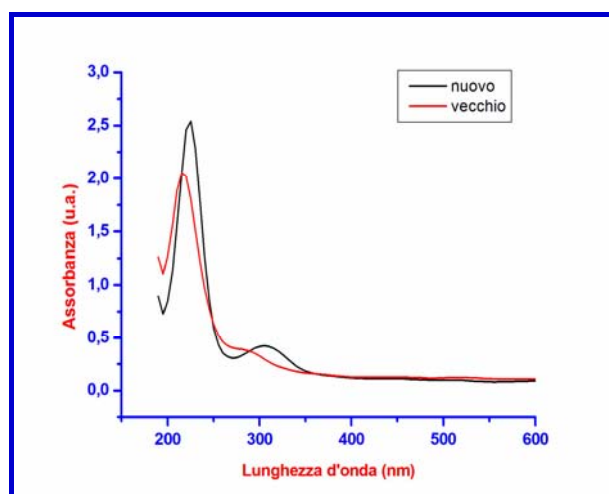


Figura 5.1. Spettri UV-Vis di due soluzioni di HAuCl_4 .

Come si può notare gli spettri nuovi e vecchi differiscono tra loro. In particolare, lo spettro “vecchio” non presenta il picco a 310 nm, presente, invece, nell’altro spettro. Pertanto, abbiamo concluso che la soluzione di acido cloro-aurico subisce delle modificazioni seppur non visibili come cambiamento di colore. Data questa diversità, si è deciso di utilizzare, per ogni esperimento, delle soluzioni di HAuCl_4 preparate in giornata.

Inoltre, successivamente uno degli autori [6] ha affermato, tuttavia, che le soluzioni di HAuCl_4 sono stabili per almeno 3 mesi. Questa affermazione contrasta sia con quanto pubblicato sia con i nostri risultati.

Per valutare se l’utilizzo di reagenti freschi o vecchi potesse influenzare la colorazione finale delle NP-GS sono state preparate delle dispersioni di NP-GS utilizzando sia reagenti appena preparati, che vecchi (specifiche in Tab. 5.6). Queste sono state chiamate soluzioni “miste” (A-F in Tab. 5.6). Si precisa che con il termine “vecchio”, si intende un reagente preparato 13-14 giorni prima, mentre con “nuovo”, si intende preparato in giornata.

Tabella 5.6. Reagenti utilizzati nella preparazione delle soluzioni "miste".

Soluzioni Miste	NaOH	THPC	HAuCl ₄
A	nuovo	vecchio	vecchio
B	vecchio	nuovo	vecchio
C	vecchio	vecchio	nuovo
D	nuovo	nuovo	vecchio
E	vecchio	nuovo	nuovo
F	nuovo	vecchio	nuovo

Le dispersioni di NP-GS ottenute si sono mostrate tutte dello stesso colore coca-cola. Per verificare se ci potessero essere delle differenze non visibili macroscopicamente, le dispersioni NP-GS ottenute dalle soluzioni miste A-F sono state analizzate per spettroscopia UV-Vis (Fig. 5.2).

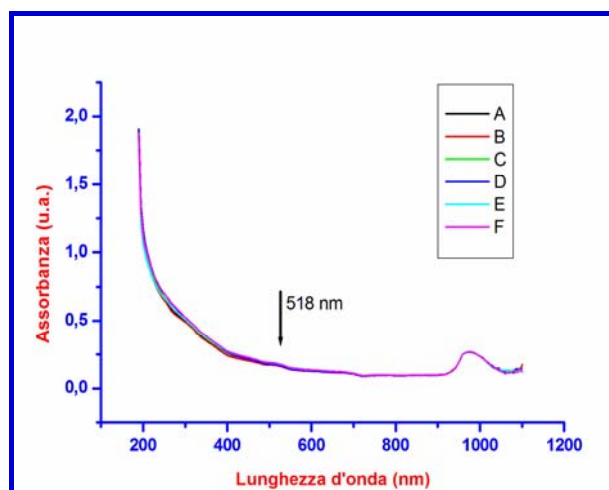


Figura 5.2. Spettri UV-Vis delle NP-GS ottenute dalle soluzioni miste.

Come si può osservare, gli spettri UV-Vis si sono mostrati sovrapponibili, ed inoltre l'assenza del picco plasmonico intorno ai 500 nm induce ad ipotizzare che le NP-GS abbiano dimensioni di pochi nanometri [5]. Inoltre, il fatto che le diverse dispersioni abbiano lo stesso spettro, e la stessa colorazione, induce ad ipotizzare che l'utilizzo di reagenti freschi o vecchi (13-14 gg) non è influente nella determinazione della colorazione finale, e quindi delle dimensioni delle NP. Pertanto, il motivo per cui abbiamo ottenuto anche dispersioni differentemente colorate rimane incompreso.

Tre dispersioni di diverso colore (violaceo, arancione, marrone) sono state caratterizzate allo spettrofotometro mostrando spettri di assorbimento differenti (Fig. 5.3).

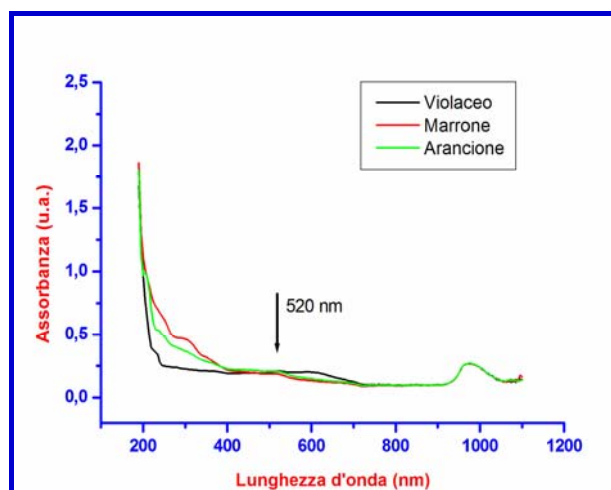


Figura 5.3. Spettri UV-Vis di NP-GS di diverso colore.

Dalla Figura 5.3 emerge che dispersioni di diverso colore mostrano spettri differenti. In particolare, le dispersioni violacea e marrone sono state preparate il 3 maggio 2010, mentre quella arancione, il 4 maggio 2010, giorno in cui sono stati acquisiti anche gli spettri UV-Vis. Queste ultime due dispersioni mostrano spettri di assorbimento simili, soprattutto nella regione dei 500 nm, in cui è visibile una spalla a 520 nm. Invece, la dispersione violacea ha mostrato un picco spostato nella zona dei 600 nm. La presenza di un picco di assorbimento ben visibile permette di ipotizzare che le NP-GS della dispersione violacea abbiano un diametro superiore a quelle marrone-arancione [9]. Questo esperimento ha confermato, quindi, che il colore della dispersione risulta fondamentale al fine di ottenere NP dello stesso diametro.

È stata considerata, come possibile parametro influente sulla colorazione finale delle NP-GS, la quantità d'oro presente nella soluzione di HAuCl_4 . Infatti, data l'elevata igroscopicità di questo composto, si è pensato che, di volta in volta, la pesata venisse influenzata dalla quantità di acqua assorbita dai cristalli del composto, determinando la presenza di una quantità d'oro sempre diversa nella soluzione finale.

Questa ipotesi è stata verificata mediante l'analisi all'ICP. Nella Tabella 5.7 sono riportati i risultati delle analisi effettuate presso i laboratori ECO. In particolare, sono state analizzate due soluzioni 25 mM, e due 1% p/v, di HAuCl_4 (campione) preparate come descritto nel Paragrafo 5.3.1.4 e 5.3.3.2. L'analisi è stata condotta alle 4 diverse lunghezze d'onda dell'oro. Inoltre, per ogni campione è riportata la quantità d'oro sperimentale (mg/L), e la quantità teorica (mg/mL). In grassetto, inoltre, sono messe in evidenza i risultati espressi in percentuale rispetto alla quantità teorica.

La Tabella 5.7 mostra che le pesate hanno avuto uno scarto medio del 10% in meno rispetto alla quantità teorica. Questo può essere attribuito indubbiamente alla umidità dell'aria in quanto le soluzioni erano state preparate in contenitori di plastica sterili, onde evitare l'eventuale adsorbi-

mento dell'oro al vetro. Inoltre, essendo lo scarto sufficientemente costante e ripetibile, si ritiene che questo non dovrebbe avere influenzato il processo di formazione delle NP-GS.

Tabella 5.7. Quantità d'oro presente nelle soluzioni di HAuCl₄ analizzate all'ICP.

campione	Quantità Sperimentale (mg/L)				Quantità Teorica (mg/L)
	Recovery (%)				
	197,7 nm	208,2 nm	242,8 nm	267,6 nm	
1 (25 mM)	80,50	80,94	81,12	81,62	92,88
	86,67	87,14	87,34	87,88	100,00
2 (25 mM)	82,20	83,05	82,78	83,10	92,14
	89,21	90,13	89,84	90,19	100,00
3 (1%, p/v)	105,29	106,53	105,02	104,89	113,29
	92,94	94,03	92,70	92,55	100,00
4 (1%, p/v)	100,35	101,97	100,85	100,73	113,29
	88,58	90,01	89,02	88,91	100,00

Un'altra variabile considerata come possibile fattore di influenza sulla colorazione finale di NP-GS, è stata la stabilità delle soluzioni di THPC. Il THPC si trova in soluzione acquosa nella confezione originale (80% v/v), e, per l'esperimento di sintesi delle NP-GS è stata preparata una soluzione in H₂O Milli-Q, con concentrazione 12 µL/mL. Sebbene gli autori asseriscano che questa soluzione sia stabile per anni [6], il confronto tra gli spettri UV-Vis di due soluzioni di THPC, preparate a tre mesi di distanza, smentisce questa affermazione. I risultati sono mostrati in Figura 5.4. La soluzione indicata come "nuova" presenta un picco che, invece, è assente nello spettro del THPC "nuovo". Di conseguenza si è deciso di utilizzare sempre soluzioni di THPC fresche.

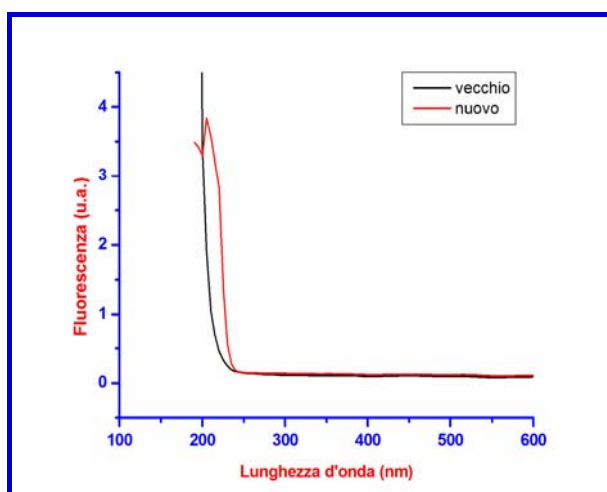


Figura 5.4. Spettri UV-Vis di due soluzioni di THPC preparate a tre mesi di distanza.

Per confermare i dati ottenuti allo spettrofotometro, si è ritenuto opportuno analizzare all'NMR (^1H NMR e ^{31}P NMR, rispettivamente Figura 5.5 e 5.6) delle soluzioni di THPC fresche (Tempo 0), o vecchie di 15 e 60 giorni. In particolare, gli esperimenti condotti sono stati finalizzati alla verifica della dichiarazione degli autori, secondo i quali le soluzioni di THPC alcaline erano da usarsi dopo 2 [5] – 5 [6] minuti dalla preparazione in quanto era necessario che si formasse un intermedio reattivo di parziale idrolisi del THPC.

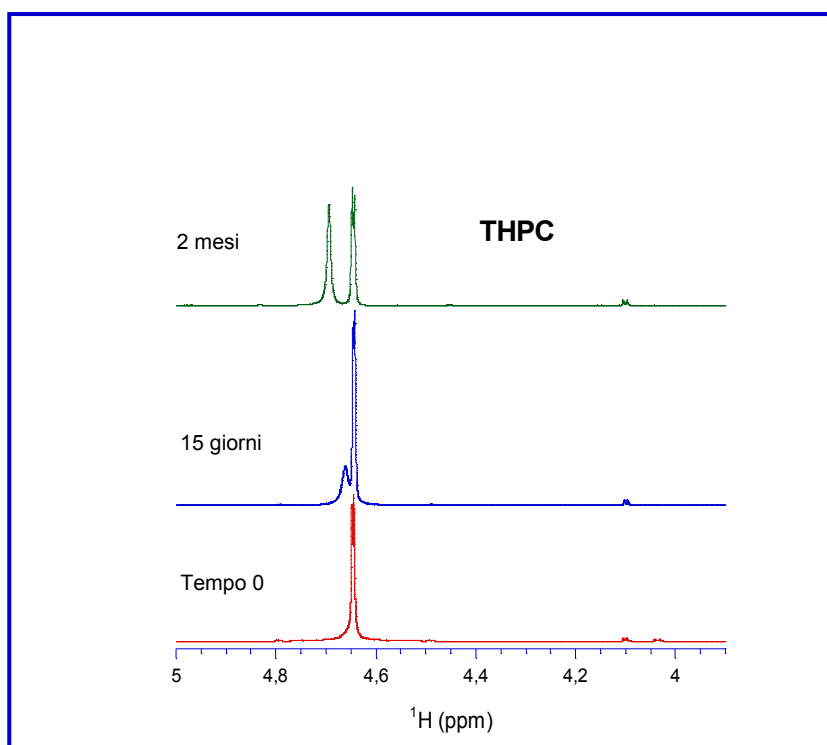


Figura 5.5. Spettri ^1H NMR THPC in D_2O

Mediante i nostri studi abbiamo osservato come il THPC, presenta inizialmente un singolo segnale (Fig. 5.6) negli spettri ^{31}P NMR a indicare che nonostante il grado tecnico il sale di fosfonio è l'unico derivato fosforato presente nel composto. Lo spettro al fosforo è stato registrato sia in modalità accoppiata (non mostrato) che disaccoppiata (Fig. 5.6) onde evitare che si potessero perdere dei segnali per eccesso di prossimità con quelli derivanti dallo splitting delle linee conseguente all'accoppiamento ^1H - ^{31}P (i.e., si vede un unico segnale per il fosforo invece di un segnale multiplo).

Gli spettri al protone delle soluzioni acquose (Fig. 5.5) sono stati di difficile lettura, in quanto la viscosità della soluzione (il THPC è viscoso), i protoni mobili (i.e., gli -OH del THPC che nel tempo possono diventare -OD, e conseguentemente la D_2O diventa HOD) e la preparazione dei

campioni in D₂O rendono complicata l'identificazione dei segnali del THPC che possono scomparire sotto i vari e forti segnali dei gruppi –OH / HOD / H₂O del THPC.

Si è osservato che negli spettri in D₂O (Fig. 5.5) il segnale principale sia quello a ca. 4,64 ppm (segnale dell'HOD) con un evidente accoppiamento ¹H-D (i.e. picco sdoppiato, sempre a tutti i tempi). Con il passare del tempo, si è visto che compare un secondo segnale a ca. 4,67 ppm (15 giorni) e a 4,7 ppm (60 gg) con il classico aspetto del segnale da protone mobile (i.e., segnale largo), che potrebbe essere imputabile allo stabilizzarsi dell'equilibrio fra le tre specie di protoni mobili. Lo spostamento nel tempo di alcuni ppm potrebbe essere ragionevolmente dovuto all'instaurarsi di un equilibrio stabile nelle concentrazioni delle varie specie che quindi daranno ognuna un segnale.

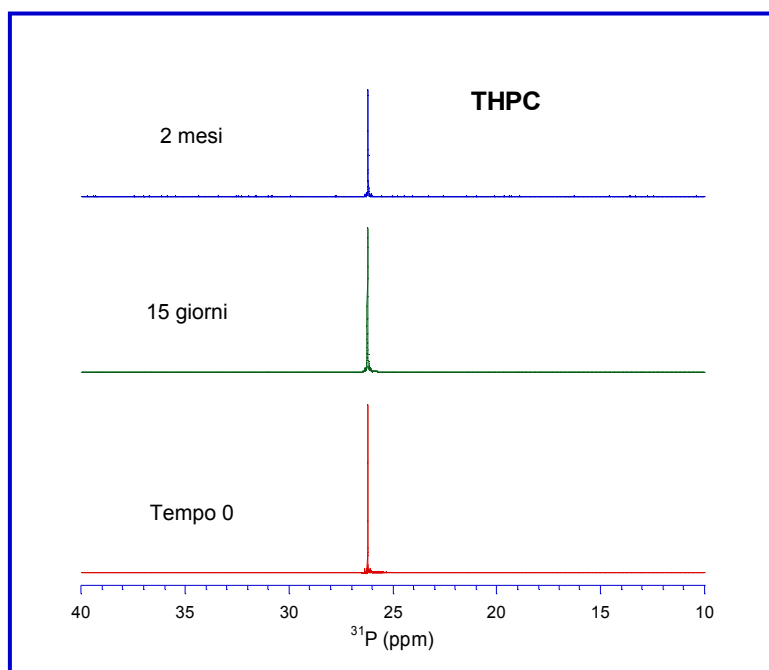


Figura 5.6. Spettri ³¹P NMR del THPC in D₂O

L'esame degli spettri ³¹P NMR (Fig. 5.6) mostrano come sia sempre e solo presente la specie THPC testimoniando come il processo visibile al protone sia quindi correlabile ai protoni mobili e non ai protoni legati ai gruppi metilenici presenti tra i gruppi oh ed il fosforo.

Il calo della reattività evidenziato quindi con le soluzioni non preparate di fresco potrebbe essere legato o ad una graduale carbonatazione della soluzione che quindi porta a degradazione parziale del prodotto (che però sarebbe dovuta essere visibile almeno negli spettri al fosforo) o alla formazione graduale di addotti da interazione idrogeno o di scambio (–OH vs. –OD) che rendono indisponibile il THPC per la coniugazione alle NP-GS.

In una seconda serie di esperimenti, dopo l'aggiunta di soda (soluzione a pH circa 9) è stato osservato come i segnali al protone e al fosforo cambiano. Per esempio, gli spettri al fosforo non presentano un unico segnale (Tab. 5.8). In Tabella 5.8 vediamo riportati tra parentesi i rapporti di intensità rapportati al picco di maggiore intensità (dati espressi in percentuale). Dopo 15 giorni vediamo come i segnali nello spettro rimangano sostanzialmente due ma con intensità di segnale invertite ad indicare che in accordo con la letteratura l'ambiente alcalino innesca un processo di idrolisi che conduce alla formazione di intermedi ossidati.

Tutto quanto risulta quindi coerente con la letteratura sui sali di fosfonio e sulla reazione del THPC confermando quindi che la reazione ha luogo attraverso un intermedio ossidato e che chiave per la riuscita della reazione risulta essere il rispetto dei tempi che intercorrono fra aggiunta della soda e aggiunta dell'acido cloroaurico [10, 11].

Tabella 5.8. Segnali presenti negli spettri ^{31}P NMR di soluzioni THPC alcaline.

	ppm	ppm	ppm
Primo set	26 (100%)	49 (<2%)	n.d.
Secondo set dopo alcalinizzazione	26 (1%)	51 (45%)	74 (100%)
Terzo set dopo 15 gg	25 (< 0,5%)	50 (100%)	74 (10%)

Tabella 5.9. Segnali presenti negli spettri ^1H NMR di soluzioni THPC alcaline.

	ppm	ppm	ppm	ppm
Primo set	4,08	4,21	4,63	n.d.
Secondo set dopo alcalinizzazione	n.d.	4,19	4,64	4,73
Terzo set dopo 15 gg	n.d.	4,20	4,65	4,81

L'ottenimento delle NP-GS è stato confermato dalla caratterizzazione al TEM (Par. 5.4.5.3), ed al SEM (Par. 5.4.6.3).

5.4.2. Preparazione delle NP-Si)GS

Le NP-Si)GS sono state ottenute come riportato nel protocollo del Paragrafo 5.3.1.5, e descritto dettagliatamente in letteratura [7]. È stato commentato precedentemente che la dispersione iniziale delle NP-Si)GS è stata centrifugata per 2 volte, e ridispersa in 50 mL di H₂O Milli-Q. Il surnatante della prima centrifuga si è mostrato del medesimo colore delle NP-GS (indicare), mentre quello de-

rivante dalla seconda centrifuga era arancio-rosa chiaro. La certezza che il processo di coniugazione fosse avvenuto ci è stata data, macroscopicamente, dal fatto che il pellet ottenuto dopo la seconda centrifuga era marrone, mentre il pellet delle NP-Si è bianco. Inoltre, considerando che le centrifughe presenti nel nostro laboratorio (Par. 5.2.5) non hanno una sufficiente forza centrifuga per formare un pellet delle NP-GS, si può dedurre che il pellet di color marrone ottenuto durante questa preparazione non può che essere costituito dalle NP-Si)GS.

Sono stati registrati degli spettri UV-Vis dei surnatanti ottenuti dalla prima (Surnatante1; Fig. 5.7) e seconda (Surnatante2; Fig. 5.8) centrifugazione per verificare che nei surnatanti erano rimaste le NP-GS in eccesso.

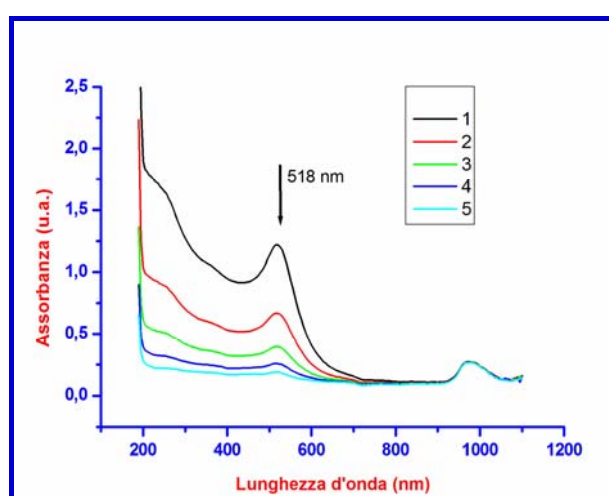


Figura 5.7. Surnatante1 a diverse diluizioni seriali.

In Figura 5.7, il picco visibile a 518 nm rivela la presenza delle NP-GS di dimensioni superiori a 2 nm [5, 12]. In Figura 5.8, non è presente il picco plasmonico ma si è osservata invece una spalla a 489 nm. Inoltre, gli spettri in Figura 5.8 sono diversi da quelli mostrati in Figura 5.2. Pertanto si può concludere che il colore rosato del surnatante sia dovuto al permanere di poche particelle di piccole dimensioni (intrappolate durante la formazione del primo pellet, oppure coniugate debolmente alle NP-Si).

I surnatanti sono stati analizzati anche al DLS (presso ES). Queste analisi hanno evidenziato che nel Surnatante1 sono presenti delle NP (n=4) con diametro da $3,17 \pm 1,89$ a $4,57 \pm 1,33$ nm (25°C; modalità Numero), e con diametro dai $3,44 \pm 1,82$ a $4,43 \pm 1,26$ nm (37°C; modalità Numero).

Per quanto riguarda, invece, il Surnatante2, le analisi al DLS dimostrano che in tutti i campioni analizzati (n=4), è stata riscontrata la presenza di particelle con diametro compreso tra i $285,10 \pm 63,46$ ed i $446,60 \pm 57,25$ nm (25°C; modalità Numero), e con diametro dai $141,69 \pm 138,15$ ai

354,03 ± 118,01 nm (37°C, modalità Numero). Avendo appurato, dagli spettri in Figura 5.8, che le NP-GS sono assenti, si ipotizza che le NP rivelate dall'analisi al DLS possano essere NP-Si.

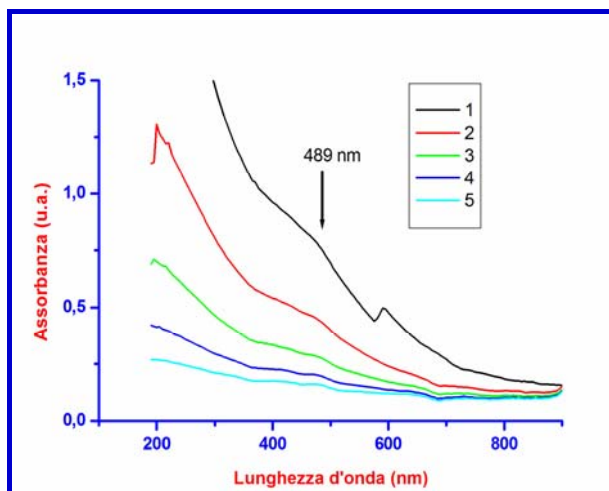


Figura 5.8. Surnatante2 a diverse diluizioni.

L'ottenimento delle NP-Si)GS è stato confermato dalla caratterizzazione al TEM (Par. 5.4.5.3), ed al SEM (Par. 5.4.6.3).

5.4.3. Sintesi delle NP-Si)Au

Per la sintesi delle NP-Si)Au è stato seguito fedelmente il protocollo riportato in letteratura [7]. Le NP-Si)GS, sono state sottoposte ad una reazione di ossidoriduzione, per fare in modo che le NP-GS adsorbite sulla superficie delle NP-Si crescessero di dimensioni e formassero un rivestimento completo. Pertanto, come descritto nel protocollo al Paragrafo 5.3.1.6, la dispersione di NP-Si)GS è stata miscelata, sotto agitazione, con una serie di reattivi in soluzione acquosa. Subito dopo l'aggiunta dell'ultima sostanza (i.e., acido ascorbico), la colorazione della dispersione dovrebbe assumere un colore blu [7]. Infine, la dispersione è stata centrifugata e redispersa in un uguale volume di H₂O Milli-Q per due volte.

Nei nostri esperimenti, la dispersione di NP-Si)Au, subito dopo l'aggiunta di acido ascorbico, ha mostrato una colorazione che è variata dal blu intenso, al blu-violetto, fino al viola. Si potrebbe ipotizzare che tali colorazioni siano indice delle dimensioni delle NP-Si)Au formatesi, così come riportato anche in letteratura [7]. Dopo le centrifughe che dovrebbero permettere di ottenere le NP ripulite dalle sostanze di reazione, si sono ottenuti dei surnatanti colorati tra il lilla-celeste-violetto (colori predominanti dopo la prima centrifuga), e il grigio-celeste chiaro (colori predominanti dopo la seconda centrifuga), ed è stato osservato un pellet molto scuro, quasi nero. Nonostante le colorazioni delle dispersioni ottenute corrispondano a quelle riportate in letteratura, i risultati di caratte-

rizzazione al TEM (Par. 5.4.5.4), ed al SEM (Par. 5.4.6.4) hanno mostrato che, in realtà, non si è ottenuto il risultato sperato.

Si ipotizza, pertanto, che nelle NP-Si di tipo “a mimosa” (vedi oltre), quali sono quelle da noi utilizzate, il rivestimento d’oro agisca come un “velcro”, aderendo alla NP-Si, e poi distaccandosi, lasciando cavità e buchi osservati nelle immagini al TEM (Par. 5.4.5.4).

5.4.4. Preparazione delle DNPC

Le NP-Au utilizzate per la sintesi delle DNPC sono delle particelle d’oro ricoperte di oleilammina, e disperse in toluene. Sono stati registrati gli spettri di assorbimento UV-Vis di 5 diluizioni di NP-Au, e si è osservato sempre un picco a 520 nm (Fig. 5.10).

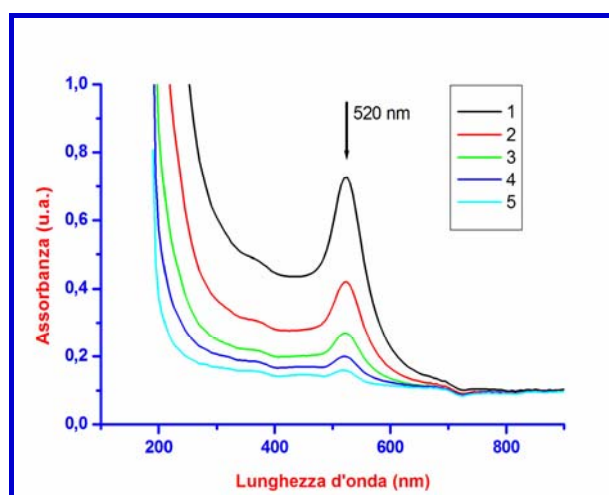


Figura 5.9. Spettri di assorbimento UV-Vis di diverse diluizioni seriali di NP-Au in toluene.

Con il tempo si è osservato che le NP-Au risultavano di difficile ridispersione. Questo poteva essere dovuto, in parte, all’evaporazione del toluene dal contenitore originale. Avendo, infatti, confrontato lo spettro UV-Vis presente nel certificato di analisi delle NP-Au [1], ed uno spettro da noi registrato, per lo stesso lotto, il 28.05.2012, ci si è resi conto che le particelle risultano più concentrate rispetto al campione originale. Pertanto, la diluizione da apportare è stata calcolata utilizzando la concentrazione di oro (mg/L) e di particelle/L riportata nel certificato di analisi (Tab 5.10), ed una curva di calibrazione ottenuta precedentemente. Da questa curva di calibrazione è stata poi ottenuta la concentrazione di oro e di particelle nel campione in nostro possesso. In effetti, abbiamo notato che nel campione analizzato nel maggio 2012 le concentrazioni sono più alte. I dati sono riassunti in Tabella 5.10, ed in particolare sono riportati la concentrazione di Au⁰, in mg/L, ed in numero di particelle per litro, riportati nel certificato di analisi, e calcolati da noi. In Tabella 5.10 è riportato anche il rapporto fra le concentrazioni ottenute nei due campioni.

Tabella 5.10. Concentrazione dell'oro e numero di particelle presenti nelle NP-Au.

	Au ⁰ (mg/L)	n. particelle/L
Certificato di Analisi	260	$7,7 \times 10^{15}$
28 maggio 2012	514,62	$15,2 \times 10^{15}$
rapporto	1,98	1,97

Dal rapporto fra le concentrazioni ottenute, emerge che al momento della registrazione del nostro spettro UV, il campione aveva una concentrazione d'oro di 1,98 volte superiore a quella originale, ed una concentrazione di particelle di 1,97 volte superiore. Pertanto, è stato necessario diluire la dispersione nanoparticellare.

Per una maggiore semplicità di calcolo, la dispersione è stata diluita in un uguale volume di toluene, sebbene si sarebbe dovuto diluire di 1,97 volte, per ottenere il numero di particelle riportato nel certificato di analisi. Nella Tabella 5.11 si riportano, pertanto, la concentrazione d'oro per L, la concentrazione di particelle/L, e per alcune discussioni presenti nei prossimi paragrafi si riportano inoltre il numero di particelle in 50 μ L, ed in 1,6 mL, ottenuta dopo diluizione.

Tabella 5.11. Concentrazione d'oro e di particelle nelle NP-Au, dopo diluizione.

mg/L Au ⁰	n. particelle/L	n. particelle/50 μ L	n. particelle/1,6 mL
257,31	$7,6 \times 10^{15}$	$3,8 \times 10^{11}$	$1,216 \times 10^{13}$

Si precisa che il numero di NP-Au in 50 μ L riguarda il numero di particelle nelle prove di coniugazione i cui risultati sono riportati in Tabella 5.12, 5.13, e 5.14. Una sola prova, il Trial 7 in Tabella 5.12, è stato preparato con 1,6 mL di NP-Au.

Le due molecole citotossiche s-Azl 6 ed s-Azl 38 sono state sintetizzate dalla Dr.ssa Onnis (UniCa). Queste sono due derivati delle molecole eterocicliche Azl 6 ed Azl 38 che sono risultate tossiche su diverse linee tumorali [13].

Pertanto, si è pensato di utilizzare tali molecole per studiare la possibilità di legare molecole altamente lipofile (e quindi con problemi per la veicolazione nel sangue) ad un trasportatore che fosse in grado di trasformare il complesso in una struttura disperdibile in acqua e fluidi biologici.

Per poter legare queste molecole citotossiche alle NP-Au è stato necessario legare ad esse uno spaziatore, che è composto da una catena etilenica, alle cui estremità sono presenti, da una parte un gruppo -SH (che permette il legame alle NP-Au) e dall'altra un gruppo funzionale che lega lo spaziatore alle molecole citotossiche con un legame biodegradabile.

Le molecole s-Azl 6 ed s-Azl 38 utilizzate per la coniugazione con NP-Au presentano una configurazione sterica differente. In particolare, s-Azl 6 risulta perpendicolare allo spaziatore, mentre s-Azl 38 presenta solo una porzione della stessa orientata perpendicolarmente allo spaziatore. Lo stesso spaziatore, per reazione con la molecola Azl 6 forma un derivato ammidico, mentre con Azl 38 un derivato estereo. Le molecole s-Azl 6 ed s-Azl 38 sono state caratterizzate dai colleghi chimici per analisi elementare e spettrometria MS e spettroscopia IR. Inoltre, la molecola s-Azl 6 si presenta come un olietto giallo, solubile in toluene, mentre s-Azl 38 come una polvere bianca solubile in toluene addizionato di MeOH (soluzione t:m). Inoltre, mediante modellizzazione della struttura delle molecole per minimizzazione energetica, si è giunti alla conclusione che s-Azl 6 presenta un maggior ingombro sterico.

Le molecole s-Azl 6 e s-Azl 38 sono state legate alle NP-Au mediante il gruppo -SH. Le proprietà idrofiliche dello spaziatore legato alle molecole citotossiche non sono bastate a conferire sufficiente idrofilicità al sistema, pertanto il complesso NP-Au - s-Azl 6/38 non è risultato disperdibile in acqua.

Si è pertanto aggiunta una seconda molecola anfifilica, da noi indicata come "C" da coating. Questa seconda molecola, essendo più lunga di s-Azl 6 ed s-Azl 38, maschera s-Azl 6 ed s-Azl 38 (lipofile), e rende il complesso finalmente idrofilo. Infatti, per ripartizione toluene-acqua, si è osservato che il complesso passa in acqua (l'acqua prende il colore delle NP-Au).

È stato osservato che i rapporti di queste due molecole (s-Azl-x e C), come anche il tempo per cui si fanno reagire le due molecole con le NP-Au, e la successione di interazione non è indifferente.

In seguito a numerose prove (dati non mostrati) in cui sono stati fatti reagire, in diverse concentrazioni e con diversi tempi, NP-Au, s-Azl 6/38, e la molecola C, si è giunti alla stesura di un protocollo definitivo per la preparazione delle DNPC.

Come prima ricordato, entrambe le molecole citotossiche sono insolubili in acqua, e solubili in solventi organici. Per entrambi i farmaci sono state preparate le rispettive curve di calibrazione (Fig. 5.10). A partire dalle soluzioni madre (10 mg/mL), sono state ottenute dieci diverse diluizioni (in toluene per s-Azl 6, o soluzione "t:m" per s-Azl 38), che sono state analizzate allo spettrofotometro UV-visibile con microcuvetta (315 nm per entrambe le molecole), ottenendo gli spettri di assorbimento da cui poi sono state ottenute le rette di calibrazione riportate nei grafici qui sotto.

Le curve di calibrazione (n =3) riportate in Figura 5.10 presentano un andamento differente, e precisamente lineare per s-Azl 6, e polinomiale di secondo grado per s-AzL 38. Le due curve sono state prese come riferimento per la quantificazione di s-Azl 6 e s-Azl 38 libero, e quindi, per differenza, della quantità coniugata.

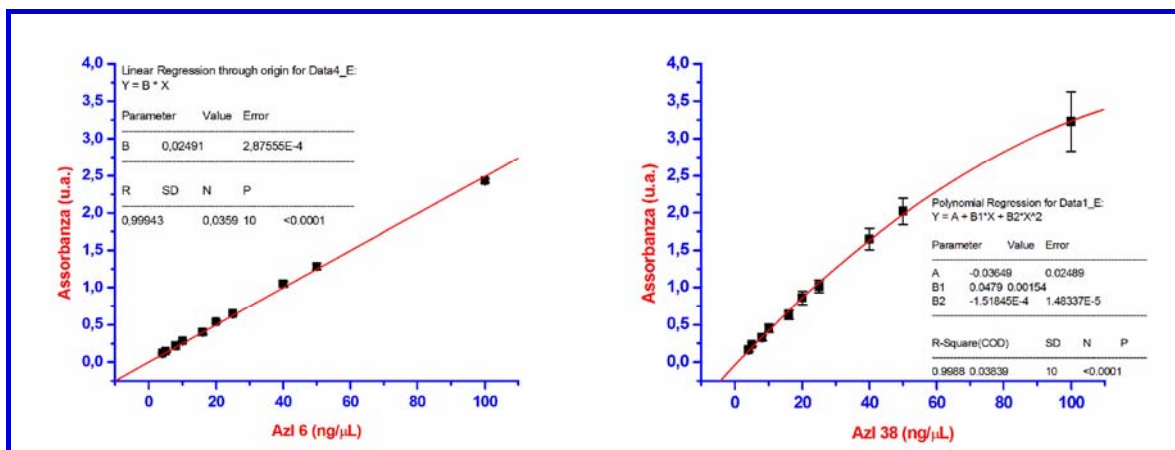


Figura 5.10. Curve di calibrazione di s-Azl 6, ed s-Azl 38.

I metodi per la quantificazione del farmaco coniugato sono riportati nel Paragrafo 5.3.1.7. Sebbene essi sembrano di facile esecuzione, non sempre si sono ottenuti gli stessi risultati. In particolare, inizialmente le prove di coniugazione sono state effettuate secondo il protocollo al Paragrafo 5.3.1.7.

Si è constatato che con una concentrazione di farmaco di 40 $\mu\text{g/mL}$ (Campione 4, in Tab. 5.1, e Formulazione S in Tab. 5.2), utilizzando NP-Au (TQ), ed utilizzando il Metodo 1, si sono avute percentuali di coniugazione più alte, rispetto alle prove in cui venivano utilizzate le altre diluizioni riportate in Tab. 5.1. Questi risultati sono riassunti in Tabella 5.12.

È necessario precisare che è stata utilizzata la molecola C proveniente da 6 diverse provette. In particolare, sono stati utilizzati due lotti differenti: le provette 16-20 appartengono al lotto BCBB8762, e 21 al lotto BCBF7080V. In Tabella 5.12 sono riportate le prove effettuate (Trial), il metodo di preparazione delle DNPC: Metodo 1 (M1), e Metodo 2 (M2), e la numerazione relative alla molecola C proveniente da differenti provette (16-21). La quantità di molecola coniugata è espressa in percentuale, rispetto alla quantità disponibile, ed in μg totali, tra parentesi, presenti nei 100 mL finali (dispersione in acqua). Sono riportati, inoltre, anche i risultati relativi alle prove in cui sono state usate NP 1:2 (Trial 6 e 7, numeri in grassetto).

Dalla Tabella 5.12 si evince che le percentuali di coniugazione più alte si sono ottenute con il Metodo 1, e con C proveniente dalle provette 16 e 21. Tuttavia, si può notare che le percentuali di coniugazione, anche in questi casi, non sono costanti.

Evidentemente, ci sono delle variabili che non siamo riusciti ancora ad identificare e che influenzano la coniugazione. Si precisa che il Trial 7 è stato preparato con volumi maggiori, ma con stesse proporzioni. Pertanto, per questa prova sono stati utilizzati 1,6 mL di NP-Au, di s-Azl 6, e della soluzione della molecola C.

Tabella 5.12. Percentuali e µg totali di Azl 6 coniugato nelle DNPC.

Trial		C					
		16	17	18	19	20	21
1	M1		49,9 (1,0)				
	M2		4,3 (0,1)				
2	M1		83,1 (1,7)				
	M2		39,7 (0,8)				
3	M1		78,6 (1,6)				
	M2						
4	M1	68,4 (1,4)		19,9 (0,4)	17,0 (0,3)	29,8 (0,6)	
	M2						
5	M1	47,4 (1,0)					25,5 (0,5)
	M2						
6	M1	50,8 (1,0)					84,7 (1,7)
	M2	55,5 (1,1)					55,9 (1,1)
7	M1	30,2 (0,6)	19,4 (0,4)				17,0 (0,3)
	M2	2,1 (0,0)	8,2 (0,2)				1,2 (0,0)

Laddove è presente il valore “(0,0)”, significa che la prima cifra utile era presente alla seconda cifra decimale.

In Tabella 5.13 sono riportati i risultati della prova di coniugazione delle NP-Au con la molecola s-Azl 38. Questa prova è stata ripetuta una volta, ed è stato testato il farmaco con concentrazione pari a 40 µg/mL, e C 16 e 21. Per questa prova, sono state utilizzate le NP 1:2. In Tabella 5.13 sono riportati il metodo di quantificazione del farmaco (n=3): Metodo 1 (M1), e Metodo 2 (M2), e la numerazione relative alla molecola C proveniente da differenti provette (16-21). La quantità di coniugazione di farmaco è espressa in percentuale, rispetto alla quantità di farmaco atteso, ed in µg totali, tra parentesi.

Tabella 5.13. Percentuali e µg totali di Azl 38 coniugato nelle DNPC.

Trial		C	
		16	21
1	M1	15,4 ± 5,5 (0,3)	14,2 ± 17,9 (0,3)
	M2	18,1 ± 4,8 (0,4)	29,1 ± 16,0 (0,6)

Da questi risultati si evince che tra le due molecole C, quella con cui si è ottenuta la percentuale di coniugazione più alta proviene dalla provetta 21. Inoltre, le deviazioni standard sono abbastanza importanti e rendono la valutazione di quale metodo funzioni meglio praticamente impossibile.

Sono state eseguite ulteriori prove di coniugazione sia per s-Azl 6, che s-Azl 38, in triplo, con i metodi di coniugazione 1 e 2, e variando le proporzioni di s-Azl-x, NP-Au, e C, secondo lo schema riportato in Tabella 5.2 (risultati in Tab. 5.14).

Tabella 5.14. Percentuali e μg di s-Azl 6 ed s-Azl 38 coniugati nelle DNPC, formulazioni A, B, e C.

F		s-Azl 6		s-Azl 38	
		16	21	16	21
A	M1	36,9 ± 13,9 (1,7)	31,2 ± 8,0 (1,4)	33,3 ± 5,5 (1,6)	35,9 ± 2,7 (1,7)
	M2	14,7 ± 9,2 (0,7)	14,3 ± 12,8 (0,7)	33,7 ± 0,8 (1,6)	34,6 ± 5,5 (1,7)
B	M1	41,7 ± 1,7 (1,9)	33,3 ± 9,2 (1,5)	20,2 ± 8,4 (1,0)	22,4 ± 9,4 (1,1)
	M2	1,5 ± 6,3 (0,1)	/	26,4 ± 7,1 (1,3)	21,9 ± 5,6 (1,1)
C	M1	36,5 ± 1,1 (2,5)	25,5 ± 8,7 (1,8)	47,2 ± 19,8 (3,5)	41,8 ± 17,8 (3,1)
	M2	/	/	19,7 ± 3,1 (1,4)	15,9 ± 10,9 (1,2)

Laddove in tabella sia presente “(0,0)”, significa che la prima cifra utile era presente alla seconda cifra decimale. Il simbolo “/” indica un valore negativo.

Per queste prove supplementari, sono state utilizzate sempre le NP 1:2. Inoltre, sono state utilizzate le molecole C provenienti dalle provette 16 e 21. In Tabella 5.14 sono riassunti i risultati ottenuti, e viene indicato le sigle della formulazione utilizzata (F; come in Tab. 5.2), il metodo di coniugazione (Metodo 1 (M1), e Metodo 2 (M2)), e la numerazione relative alla molecola C proveniente da differenti provette (16-21). La quantità di molecola coniugata è espressa in percentuale, rispetto alla quantità di teorica disponibile, ed in μg totali, tra parentesi. I dati riportati in Tabella 5.14 dimostrano che, il Metodo 1 risulta più promettente per la molecola s-Azl 6 nelle tre combinazioni (A-C). Per contro osservando i risultati ottenuti con la molecola s-Azl 38, si sono ottenuti risultati comparabili per le formulazioni A e B con entrambi i metodi, mentre il metodo 1 risulta ancora una volta migliore per la formulazione C. Per quanto riguarda la molecola C, infine, le differenze tra l'utilizzo di 16, o di 21, risultano essere minime.

5.4.5. Analisi al TEM

5.4.5.1. Caratterizzazione delle NP-Si

Le NP-Si si sono mostrate come particelle sferiche, dai bordi frastagliati e poco elettron-dense tanto da sembrare un po' trasparenti (Fig. 5.10, e 5.11). Ad un'analisi più attenta, esse appaiono costituite da tante particelle più piccole. Quando le NP-Si sono ancora disperse nel mezzo originario (etanolo) è possibile osservare, nello spazio tra le NP-Si, delle particelle ancora più piccole (Fig. 5.11, preparazione: metodo 1). Queste ultime non sono invece presenti dopo ridispersione in acqua distillata (Fig. 5.11; preparazione: metodo 2)

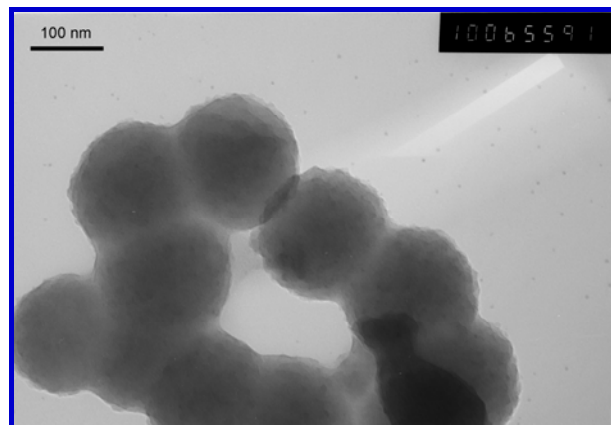


Figura 5.11. NP-Si in etanolo, fotografate a CA-2.

Inoltre, in Figura 5.12 è possibile osservare che i contorni delle NP-Si sembrano essere più definiti, più nitidi, e non avvolti in una patina che si osserva per contro nella Figura 5.11.

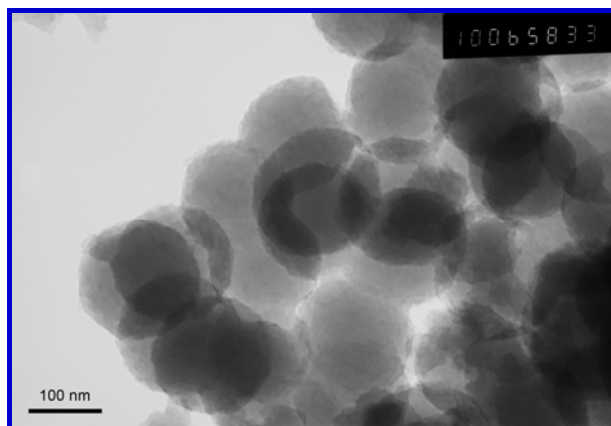


Figura 5.12. NP-Si in acqua distillata, fotografate a CA-2.

In Tabella 5.15 sono riassunti i dati dimensionali riguardanti le NP-Si osservate al TEM. In particolare, sono riportate gli acronimi (B7 e C8) indicanti i campioni esaminati (Campione). In questa colonna si trovano anche tre sigle: “NP” indica le NP-Si, “NP in NP” si riferisce alle NP che formano la struttura a mimosa delle NP-Si, mentre “NP out NP” si riferisce alle NP che si vedono nello sfondo della Figura 5.11. In Tabella 5.15 sono ancora indicati le dimensioni medie di tutte queste NP (Media), la deviazione standard (SD), e la percentuale di deviazione standard rispetto alla media (%SD). Inoltre, sono riportati anche il numero di foto esaminate (n. foto) ed il numero di misurazioni effettuate (n. NP).

Tabella 5.15. Analisi dimensionale delle NP-Si al TEM.

Campione		Media (nm)	SD	%SD	n. foto	n. NP
B7	NP	174,17	26,68	14,17	8	168
	P in NP	9,00	2,41	26,74	5	160
	P out NP	5,54	1,60	28,88	8	177
C8	NP	175,70	18,80	10,29	8	54
	P in NP	9,46	2,41	25,48	4	153
	P out NP	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.

B7: campione in etanolo, CA-2; C8: campione in acqua distillata, CA-2. n.p. non presenti

Sebbene B7 sia un campione in etanolo, e C8 sia in acqua distillata, le dimensioni medie delle NP misurate presentano uno scarto soltanto di $2,3 \pm 7,88$ nm. Anche le dimensioni medie di “P in NP” sono simili tra i due campioni ($9,00 \pm 2,41$ nm per B7, e $9,46 \pm 2,41$ nm per C8), mentre le “NP out NP” sono risultate più piccole di “NP in P” (rispettivamente $5,54 \pm 1,60$ nm vs. $9,00 \pm 2,41$ nm).

Il grafico che viene riportato in Figura 5.13 mostra la distribuzione dimensionale delle NP-Si (B7 e C8) misurate. Sebbene la dimensione media sia molto simile tra i due campioni (Tab. 5.15, NP), la distribuzione dimensionale evidenzia che nel campione B7 sono state riscontrate anche particelle con dimensioni inferiori a 110 nm, non presenti nel campione C8, molto probabilmente a causa della centrifugazione che permette la ridispersione in acqua.

In Figura 5.14, invece, è riportato il grafico della distribuzione dimensionale delle “P in NP”.

Dall’osservazione della Figura 5.14 si evince che i campioni di NP-Si analizzati al TEM presentano una distribuzione dimensionale molto simile delle “P in NP” nonostante i due mezzi disperdenti. La classe dimensionale maggiormente rappresentata risulta essere compresa nel range 7,01-10 nm. Poche “P in NP” del campione B7 hanno dimensioni di 1-4 nm, mentre sono state misurate alcune “P in NP” di C8 con dimensioni tra i 16 ed i 19 nm.

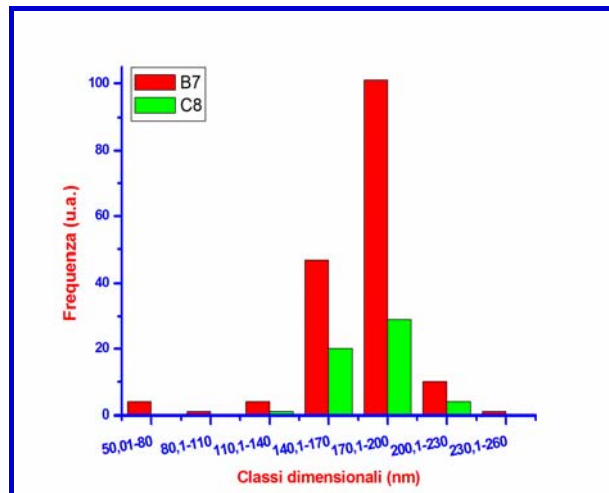


Figura 5.13. Distribuzione dimensionale delle NP-Si.

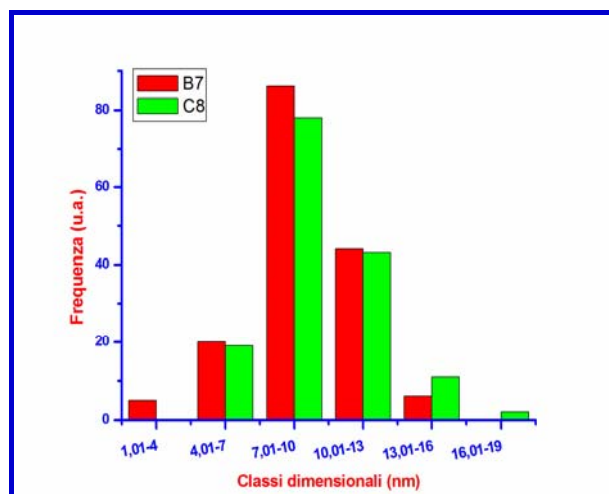


Figura 5.14. Distribuzione dimensionale delle P in NP.

Infine, in Figura 5.15 è riportata la distribuzione dimensionale di “P out NP”, osservate solo per il campione B7 dove si può osservare che queste particelle hanno dimensioni che oscillano tra 0,5 e 9 nm, ma la maggior parte di esse misurano 3-7 nm anche se è evidente un andamento bi-modale. Questo conferma anche quanto riportato in Tabella 5.15, cioè che le dimensioni medie delle “P out NP” sono inferiori a quelle delle “P in NP”.

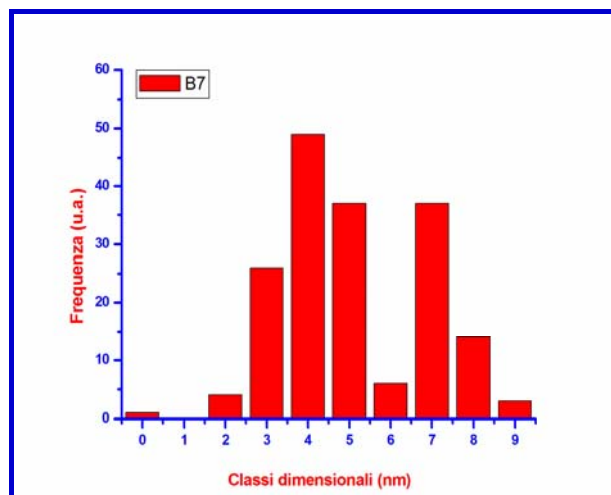


Figura 5.15. Distribuzione dimensionale delle “P out NP”.

5.4.5.2. Caratterizzazione delle NP-GS

Le NP-GS sono state osservate al TEM. Il campione è stato preparato secondo il Metodo 1 (Par. 5.3.3.4). Esse sono delle particelle piccole, dense al fascio elettronico, e sono state osservate sia a CA-2, che a DE. Sono state osservate due popolazioni distinte di NP-GS: esse sono state identificate come “NP-g” (grandi) e “NP-p” (piccole), date le differenze dimensionali osservate. In Figura 5.16 sono mostrate le NP-g, in primo piano, e le NP-p, identificabili come puntini neri sullo sfondo.

Nel campione osservato a CA-2 le NP-g hanno mostrato una forma ovoidale, mentre le NP-p appaiono circolari. Questa differenza morfologica è maggiormente apprezzabile nella Figura 5.17, in cui sono mostrate solo le NP-p dove si nota come la loro forma sia regolare e le dimensioni siano simili tra loro.

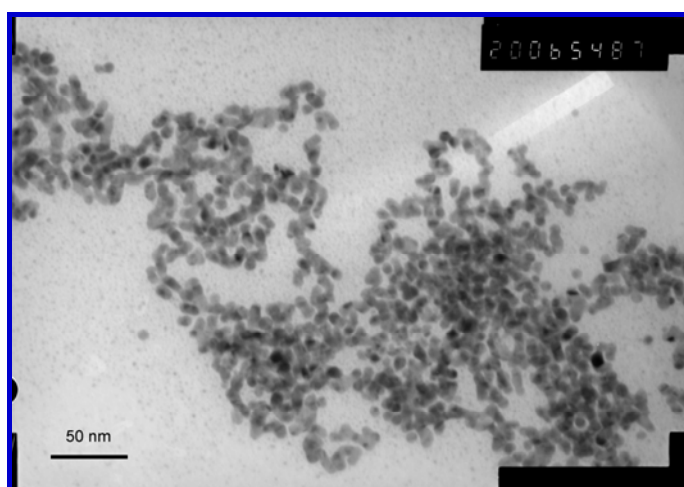


Figura 5.16. NP-GS fotografate a CA-2.

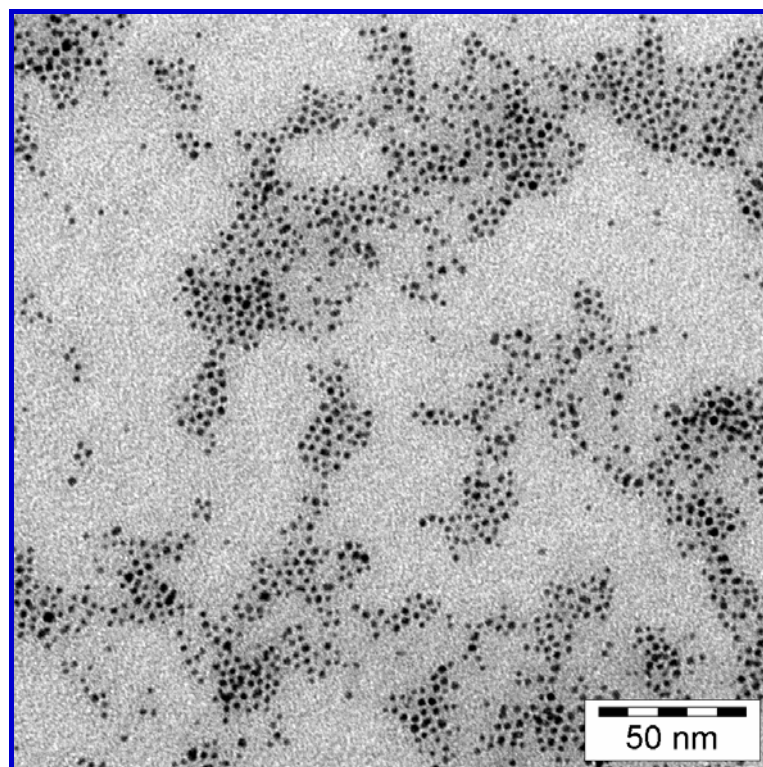


Figura 5.17. NP-p, fotografate a DE.

Le dimensioni delle NP-GS (NP-g ed NP-p) sono state misurate con Image Tool 3.0. e in Tabella 5.16 sono riportate la media delle dimensioni, in nm (Media), la deviazione standard (SD), e la percentuale di deviazione standard rispetto alla media (%SD). Inoltre, sono indicate anche il numero di foto analizzate (n. foto), ed il numero di misurazioni effettuate (n. NP).

Tabella 5.16. Analisi dimensionale delle NP-GS al TEM.

Campione		Media (nm)	SD	%SD	n. foto	n. NP.
D1	NP-p	2,46	0,48	19,58	4	86
	NP-g	8,54	2,15	25,23	4	114
L2	NP-p	3,02	0,93	30,97	5	332
	NP-g	/	/	/	/	/
L3	NP-p	2,21	0,39	17,75	2	246
	NP-g	/	/	/	/	/

In Tabella 5.16 sono riportati i dati riguardanti 3 lotti di NP-GS, i quali sono stati analizzati a CA-2 (D1), e a DE (L2 ed L3). Le NP-g sono state osservate solo nel campione D1; essendo queste particelle ovoidali (Fig. 5.16), la misurazione è stata effettuata considerando la distanza tra i due punti più lontani della NP. Le dimensioni medie ottenute sono di $8,54 \pm 2,15$ nm. Le NP-p sono state

osservate, invece, in tutti i campioni analizzati. Le dimensioni maggiori sono state ottenute per L2 ($3,2 \pm 0,93$ nm), mentre per D1 ed L3 le medie calcolate sono state simili (rispettivamente, $2,46 \pm 0,48$ e $2,21 \pm 0,39$ nm). Tuttavia, non vi è nessuna differenza statistica fra queste misure.

Nella Figura 5.18 è mostrata la distribuzione dimensionale di NP-p, comprensiva di tutte le misurazioni riportate in Tabella 5.16. Qui è possibile osservare che sebbene le dimensioni delle particelle oscillano da 1 a 6 nm, la classe dimensionale più rappresentata è 2,01-3 nm, e le tre distribuzioni formano curve distributive differenti in ampiezza e frequenza.

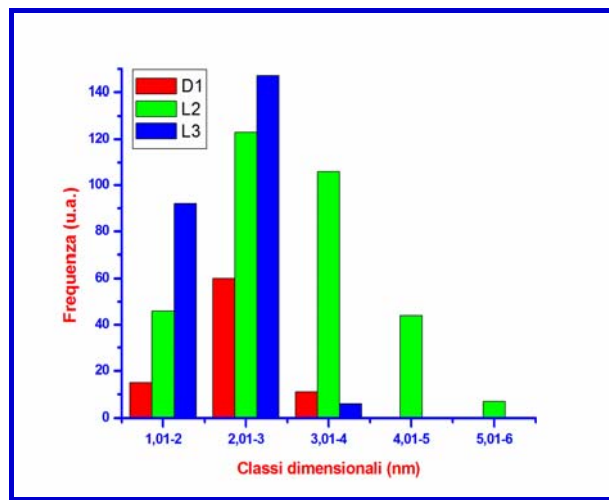


Figura 5.18. Distribuzione dimensionale di NP-p.

Per quanto riguarda, invece, le NP-g, presenti solo nel campione D1, la loro distribuzione dimensionale è riportata in Figura 5.19.

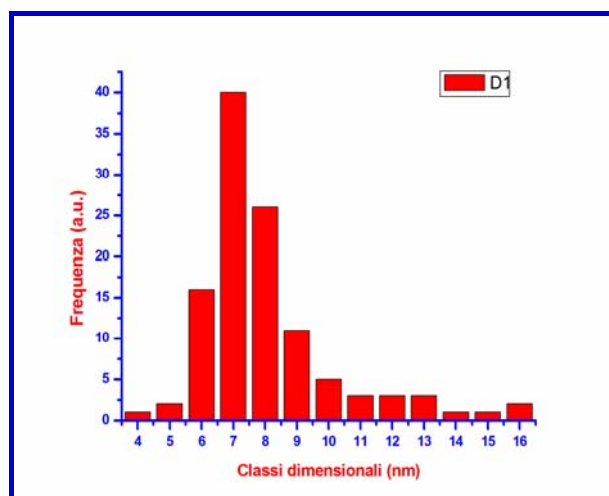


Figura 5.19. Distribuzione dimensionale di NP-g

Dall'osservazione della Figura 5.19 si evince che la classe dimensionale maggiormente rappresentata è quella dei 7 nm, e, a seguire, quella di 8, 6, e 9 nm. Di conseguenza si può affermare che le NP-g sono mediamente più grandi delle NP-p, come riportato anche in Tabella 5.16, e le loro dimensioni oscillano tra i 4 ed i 16 nm.

5.4.5.3. Caratterizzazione delle NP-Si)GS

Le NP-Si)GS sono state osservate al TEM e fotografate a DE (Fig. 5.19) e a CA-2 (Fig. 5.20). Il campione da osservare è stato sempre preparato secondo il Metodo 1 (Par. 5.3.3.4). Il confronto delle due immagini (Fig. 5.19 vs. Fig. 5.20) evidenzia che la struttura morfologica aspettata è visibile solo nel campione osservato in Germania (NP-Si)GS, campione A5). In Figura 5.20 è infatti possibile distinguere tre NP-Si su cui sono adsorbite numerosissime NP-GS che appaiono come puntini fortemente elettrone-densi. Questa differenza nella proprietà di densità al fascio elettronico dimostrano inequivocabilmente la presenza delle NP-GS. Nel campione A5, non sono state osservate "P out NP" ed infatti lo sfondo dell'immagine appare privo di qualsiasi particella.

Le NP-GS-g, invece, sono state osservate in un campione fotografato a CA-2 (E4). Esse sono visibili in Figura 5.20.

In Figura 5.20 sono mostrate le NPg osservate nel campione E4. Esse appaiono simili, come forma a quelle presenti nel campione D1 (Fig. 5.15). Tuttavia, al contrario del campione D1, le NP osservate in E4 sembrano meno uniformi dal punto di vista dimensionale.

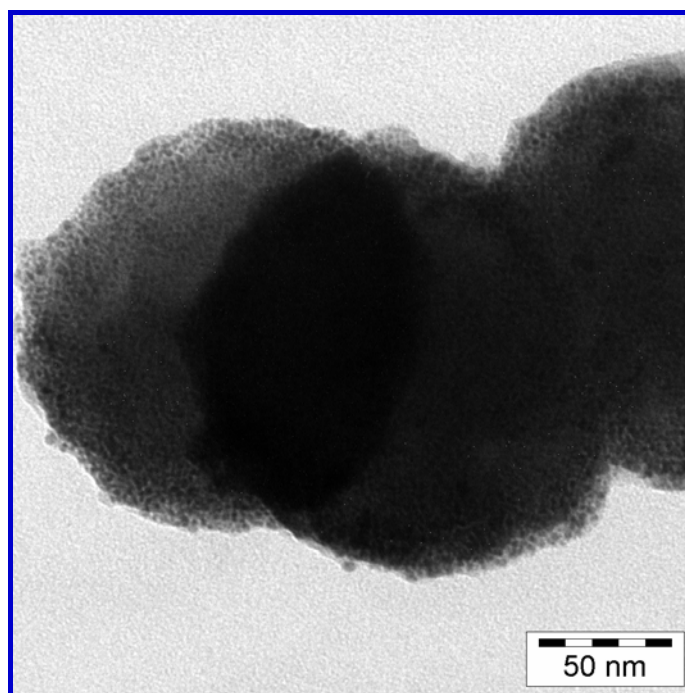


Figura 5.20. NP-Si)GS fotografate a DE.

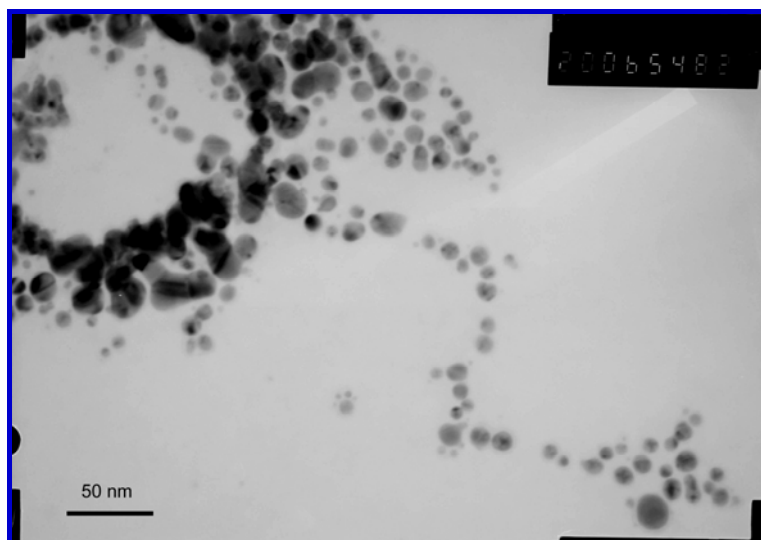


Figura 5.21. NP-Si)GS fotografate a CA-2.

Il dimensionamento è stato effettuato anche per NP-Si)GS. In Tabella 5.17 sono riportate le sigle che indicano ciascun campione esaminato (Campione), le dimensioni medie delle NP, in nm, (Media), la deviazione standard (SD), la percentuale di deviazione standard rispetto alla media, il numero di foto analizzate (n. foto), ed il numero di misurazioni effettuate (n. NP). Inoltre, per ogni campione, sono state misurate le NP-Si (NP), NP-GS adsorbite sulla superficie delle NP-Si (P_{Au} in NP), e le NP-GS non adsorbite sulle NP-Si (P_{Au} out NP).

Tabella 5.17. Analisi dimensionale delle NP-Si)GS al TEM.

Campione	Media (nm)	SD	%SD	n. foto	n. NP	
A5	NP	164,80	24,60	14,92	10	71
	P_{Au} in NP	2,79	1,11	39,55	10	202
	P_{Au} out NP	/	/	/	/	/
A1	NP	179,37	64,23	35,81	4	15
	P_{Au} in NP	5,09	1,49	29,37	4	172
	P_{Au} out NP	/	/	/	/	/
E4	NP	/	/	/	/	/
	P_{Au} in NP	/	/	/	/	/
	P_{Au} out NP	7,58	2,21	29,17	5	255

In Tabella 5.17 sono riportate le analisi dimensionali. Dei tre campioni esaminati, due dei quali sono stati fotografati a CA-2 (A1 ed E4), mentre A5 è stato fotografato a DE. In A5 ed A1 sono state misurate sia NP-Si)GS che le “ P_{Au} in NP”, mentre in E4 soltanto le “ P_{Au} out NP”.

Le NP-Si)GS misurate in A5 ($164,80 \pm 24,60$ nm) si sono mostrate di dimensioni mediamente inferiori alle NP-Si (Tab. 5.15), mentre A1 ha riportato dimensioni medie di $179,37 \pm 64,23$ nm, superiori a quelle riportate in Tabella 5.15. Tuttavia, se queste dimensioni (NP in Tab. 5.15 e NP in Tab. 5.17) sono analizzate dal punto di vista statistico, non si riscontrano differenze.

Per quanto riguarda, invece, le “P_{Au} in NP”, quelle misurate nel campione A5 si sono mostrate di dimensioni molto vicine a tutte le NP-GS (NP-p) presenti in Tabella 5.16, mentre quelle misurate in A1 si sono rivelate mediamente più grandi ($5,09 \pm 1,49$ nm) solo delle NP-GS-p dei campioni D1 e L3.

La distribuzione dimensionale delle NP-Si)GS, delle “P_{Au} in NP”, e delle “P_{Au} out NP” è mostrata, rispettivamente, nei grafici delle Figure 5.22, 5.23, e 5.24.

Dalla Figura 5.22 si evince che per il campione A5, la classe dimensionale maggiormente rappresentata è quella comprendente NP-Si)GS dai 160,01 ai 180 nm. Invece, il campione A1 non ha mostrato la predominanza di una classe dimensionale sulle altre; infatti, sembra che la maggior parte delle NP-Si)GS abbia dimensioni tra i 100 ed i 140 nm, ma sono state osservate delle particelle anche di circa 300 nm di diametro.

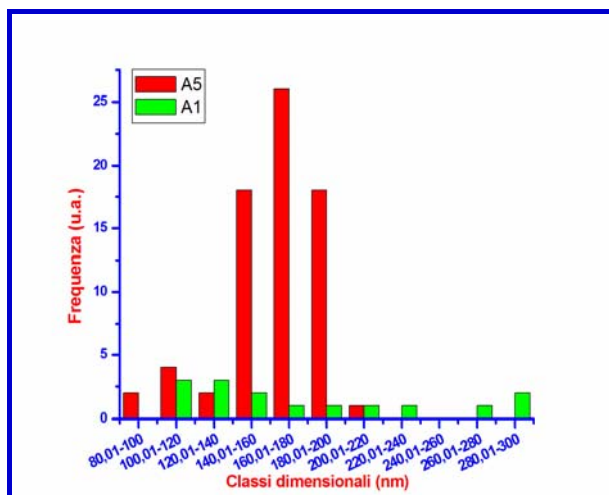


Figura 5.22. Distribuzione dimensionale delle NP-Si)GS.

Il grafico della distribuzione dimensionale delle “P_{Au} in NP”, misurate nei campioni A5 ed A1, è riportato in Figura 5.23 dove si nota che per il campione A5, la classe dimensionale maggiormente rappresentata è quella dai 2 ai 3 nm, mentre A1 risulta costituito soprattutto da particelle di dimensioni tra i 4 e i 5 nm, sebbene siano ben rappresentate anche le classi dimensionali dei 3 e 5 nm.

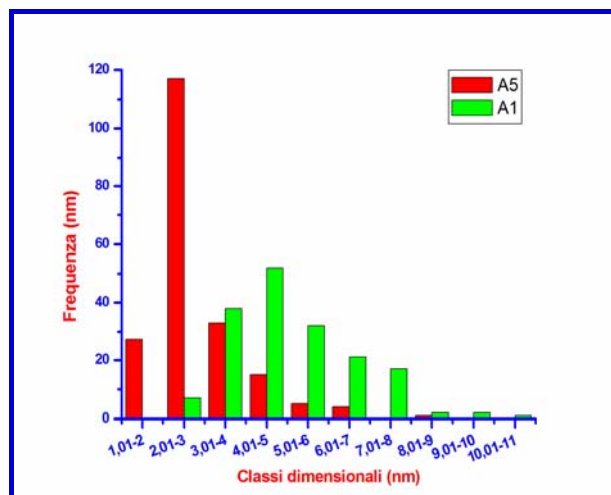


Figura 5.23. Distribuzione dimensionale delle NP-Si)GS (P_{Au} in NP).

Infine, in Figura 5.24 viene riportato il grafico della distribuzione dimensionale delle P_{Au} out NP misurate in E4 (Tab. 5.17).

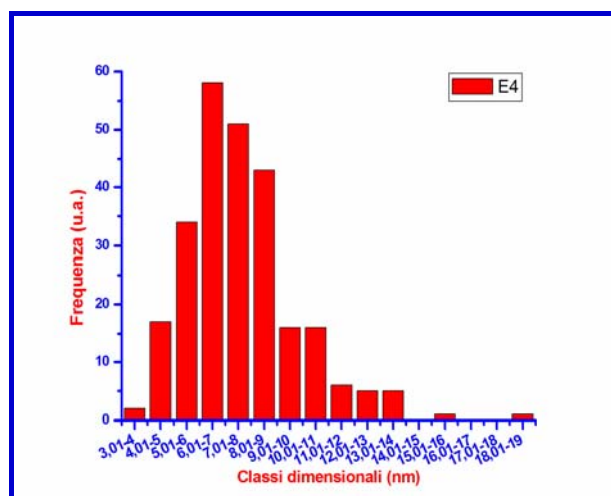


Figura 5.24. Distribuzione dimensionale delle NP-Si)GS (P_{Au} out NP).

In Figura 5.24 è riportata la distribuzione dimensionale delle P_{Au} out NP (Tab. 5.17). La classe dimensionale maggiormente rappresentata è quella dai 7 ai 9 nm. Se si confrontano le dimensioni di queste NP con quelle riportate in Tabella 5.16, ed in Figura 5.16, si nota che la distribuzione dimensionale delle P_{Au} out NP (Fig. 5.24) è simile a quella delle NP-g (Fig. 5.19): nelle prime, la classe dimensionale più rappresentata è quella dei 6 nm, mentre, nelle seconde, quella dei 7 nm.

5.4.5.4. Caratterizzazione delle NP-Si)Au

Le NP-Si)Au sono state osservate al TEM. Il campione è stato preparato secondo il Metodo 1 (Par. 5.3.3.4). Le NP-Si)Au sono state osservate bene solo in DE. I campioni mostrano la presenza contemporanea di un residuo delle NP-Si (strutture cave poco elettrondense in Fig. 5.24) circondate da particelle per lo più sferoidali, ma anche dalle forme irregolari, elettrondense (Fig. 5.24) ma con una struttura interna non omogenea (maggiormente visibile in Fig. 5.25). Queste ultime sembrano abbastanza simili a quelle visualizzate nello step precedente (Fig. 5.20).

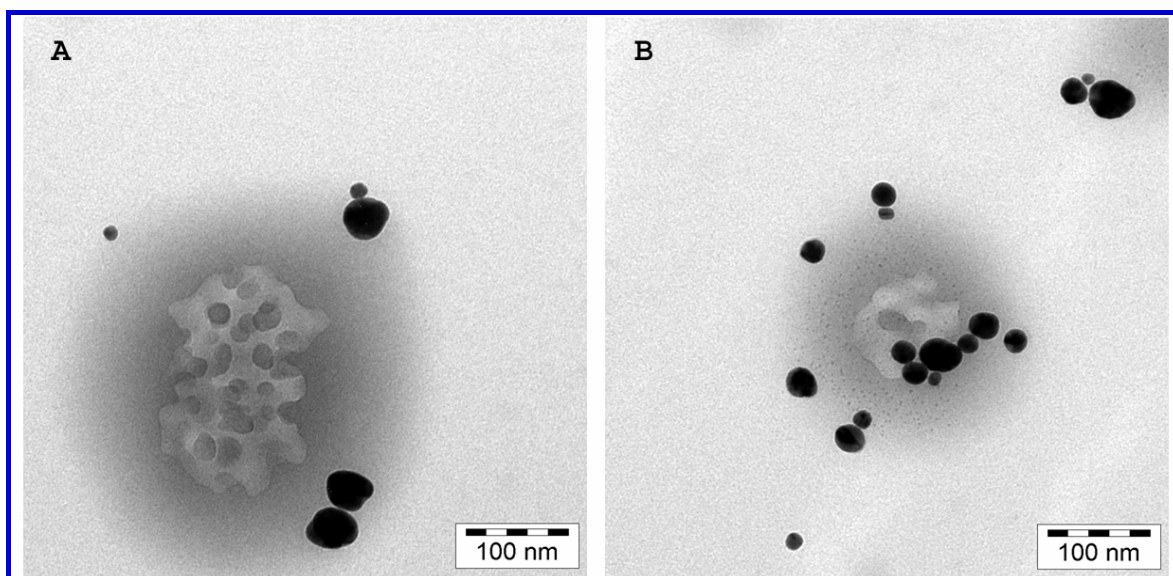


Figura 5.25. NP-Si)Au fotografate a DE.

Il dimensionamento delle NP-Si)Au (risultati in Tab. 5.18) che si presentano in Figura 5.25 come dei corpi biancastri, è stato effettuato considerando il diametro del cerchio che le potrebbe contenere (Figura 5.25.B) oppure misurando sia la lunghezza che la larghezza (Fig. 5.25.A). Inoltre, sempre in Figura 5.25 sono presenti dei corpi scuri, di diverse dimensioni. Anche per questi è stato effettuato il dimensionamento con gli stessi accorgimenti appena descritti.

Talvolta, nelle immagini acquisite a DE sono stati osservati anche dei piccoli residui di silice, che appaiono come dei frammenti biancastri e vicini ai corpuscoli sferoidali elettrondensi (Fig. 5.26).

In Tabella 5.18 sono riassunti i dati derivanti dal dimensionamento dei campioni di NP-Si)Au. In particolare, sono riportati i campioni analizzati (Campione), le dimensioni medie, in nm, delle particelle misurate (Media), la deviazione standard (SD), la percentuale di deviazione standard rispetto alla media (%SD), il numero di foto esaminate (n. foto), ed il numero di misurazioni effettuate (n. NP).

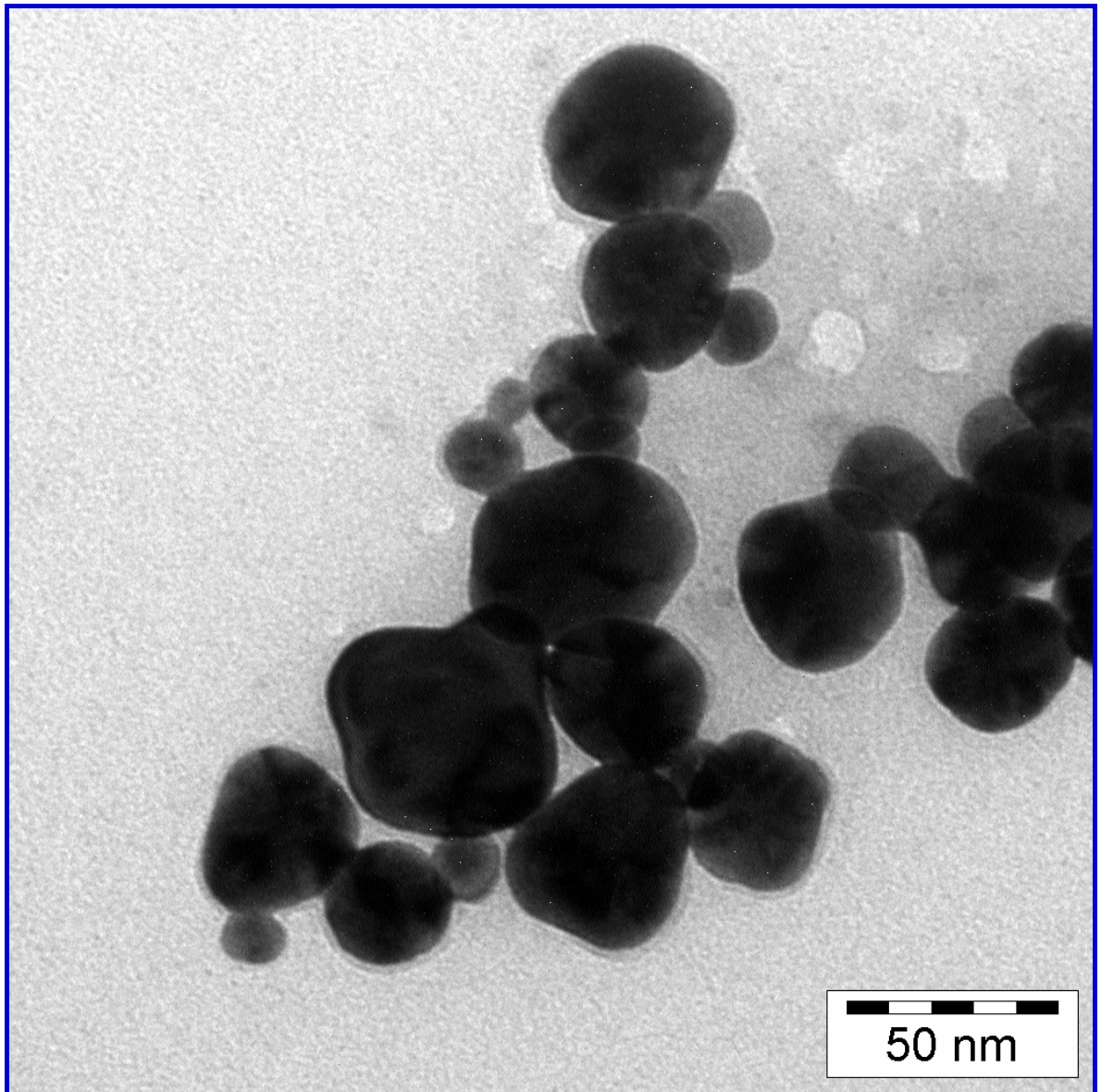


Figura 5.26. NP-Si)Au fotografate a DE.

Inoltre, occorre precisare che, per il dimensionamento, sono state prese in considerazione non solo le NP-Si)Au (NP), ma anche le NP d'oro adese alle NP-Si (P_{Au} in NP), le NP d'oro separate dalle NP-Si (P_{Au} out NP), e le cavità osservate nelle NP-Si (CavNP).

Tabella 5.18. Analisi dimensionale delle NP-Si)Au al TEM.

Campione	Media (nm)	SD	%SD	n. foto	n. NP.	
B3	NP	138,54	22,93	14,26	9	4
	P_{Au} in NP	20,90	3,41	16,31	9	7
	P_{Au} out NP	29,21	12,18	41,71	9	206
	CavNP	27,98	9,43	33,70	3	28
B4	NP	/	/	/	/	/
	P_{Au} in NP	/	/	/	/	/
	P_{Au} out NP	27,43	12,60	45,94	5	216
	CavNP	/	/	/	/	/
A2	NP	/	/	/	/	/
	P_{Au} in NP	/	/	/	/	/
	P_{Au} out NP	24,87	6,37	25,61	1	36
	CavNP	/	/	/	/	/
A10	NP	/	/	/	/	/
	P_{Au} in NP	/	/	/	/	/
	P_{Au} out NP	29,76	10,69	35,93	3	122
	CavNP	/	/	/	/	/
D4	NP	/	/	/	/	/
	P_{Au} in NP	/	/	/	/	/
	P_{Au} out NP	21,68	14,55	67,10	4	84
	CavNP	/	/	/	/	/

Nonostante siano stati analizzati al TEM cinque campioni (i.e., B3 e B4, a DE; A2, A10, e D4, A CA-2), soltanto in uno di essi è stato possibile osservare le NP. Negli altri casi, sono state osservate solo le P_{Au} out NP. Per le NP sono state registrate delle dimensioni medie di 138,54 nm, quindi esse risultano di dimensioni inferiori rispetto alle NP-Si (Tab. 5.15) e alle NP-Si)GS (Tab. 5.17). Questo fenomeno potrebbe essere dovuto al fatto che le NP-Si)Au sono apparse disgregate, erose, e numerosi frammenti sono stati osservati nei campioni (Fig. 5.26).

Le “ P_{Au} in NP” sono state osservate solo in B3, ed hanno mostrato un diametro mediamente inferiore alle “ P_{Au} out NP”, osservate, invece, in tutti i campioni. In Figura 5.27 è riportata la distribuzione dimensionale delle “ P_{Au} out NP”.

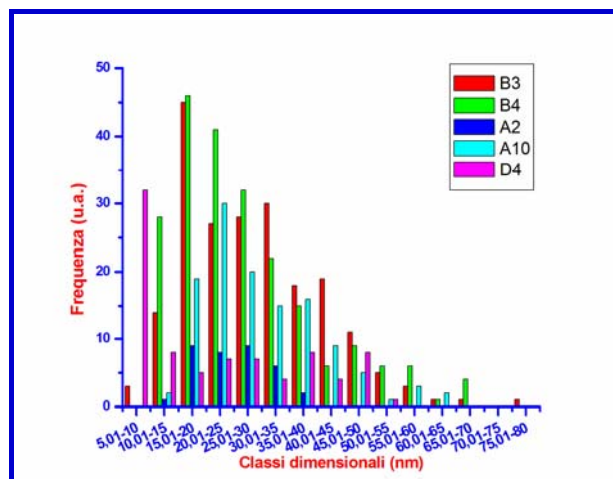


Figura 5.27. P_{Au} out NP.

In Figura 5.27 è riportata la distribuzione dimensionale delle P_{Au} out NP. Esse sono distribuite in classi dimensionali che vanno dai 5 agli 80 nm. Tuttavia, la maggior parte di esse si trova nella classe 10,01-15 nm.

5.4.6. Analisi al SEM

5.4.6.1. Caratterizzazione delle NP-Si

Le NP-Si sono state osservate al SEM presso il laboratorio CA-1. I metodi utilizzati per la preparazione del campione sono sia il Metodo 1 che il Metodo 2 (Par. 5.3.3.5). Con il Metodo 1, tuttavia, le NP-Si sono risultate come entità poco distinguibili l'una dall'altra. Pertanto, è stato messo a punto il Metodo 2, in cui il campione, polverizzato e riposto sullo *stub*, è risultato nitido e, quindi, le singole NP-Si più facilmente misurabili. La Figura 5.28 mostra un campione di NP-Si preparato con Metodo 2.

In particolare, si può notare che sono presenti NP-Si di diverse dimensioni (Fig. 5.28.A). Le NP-Si, inoltre, appaiono costituite da tante particelle più piccole, come si può apprezzare nell'ingrandimento in Figura 5.28.B. questa struttura morfologica è chiamata in diverse parti di questa tesi: struttura a mimosa.

In Tabella 5.19 sono riportati i dati derivanti dall'analisi dimensionale delle NP-Si. In particolare, è stata calcolata la media, in nm, delle misurazioni effettuate (Media), la deviazione standard (SD), la percentuale di deviazione standard rispetto alla media (%SD), il numero di foto esaminate (n. foto), ed il numero di misurazioni effettuate (n. NP). Inoltre, sono state misurate non solo le NP-Si (NP), ma anche le particelle che compongono le NP-Si (P in NP).

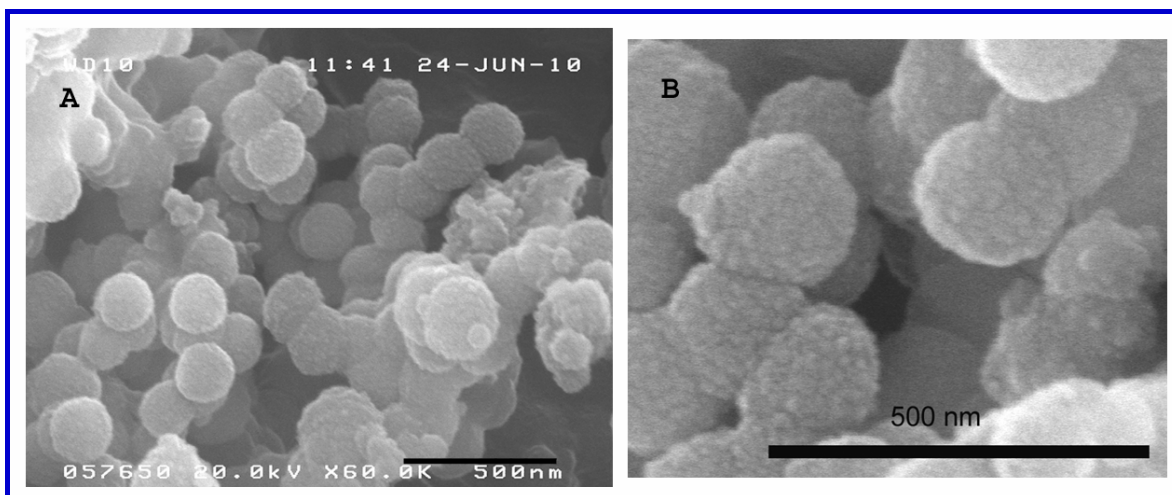


Figura 5.28. NP-Si in etanolo, fotografate a CA-1.

In Tabella 5.19 sono riportati soltanto i dati del campione preparato con il Metodo 2, in quanto si sono ottenute delle immagini nitide ed i contorni delle NP sono risultati ben delineati. Nei campioni di NP-Si caratterizzati al SEM non sono mai state osservate le “P out NP” (Fig 5.11 e Tab. 5.15), probabilmente perché durante l’asciugatura del campione e la sua successiva polverizzazione le “P out NP” sono state rimosse o accorpate alle NP-Si, tanto da non essere visibili come entità separate.

Tabella 5.19. Analisi dimensionale delle NP-Si al SEM.

Campione	Media (nm)	SD	%SD	n. foto	n. NP
NP-Si NP	205,52	39,06	19,01	14	451
NP-Si P in NP	22,64	5,26	23,24	14	114

In media, le dimensioni delle NP-Si risultano lievemente maggiori di quelle ottenute al TEM (Tab 5.15). Questa differenza può essere dovuta al fatto che la diversa prospettiva con cui le immagini vengono catturate (in 2 dimensioni al TEM e in 3 dimensioni al SEM) può portare anche a differenze minime nei risultati raccolti. In effetti, sia i campioni per il TEM che quelli per il SEM subiscono un processo di asciugatura all’aria, prima di essere osservati, quindi non si può affermare che la differenza dimensionale sia dovuta ad un diverso processo di preparazione del campione. È vero che, per il SEM, il campione, dopo asciugatura, subisce anche la polverizzazione: tutt’al più questo dovrebbe portare ad una frantumazione delle particelle, cosa che non si è verificata. Occorre precisare, inoltre, che i campioni osservati al SEM subiscono un processo di metallizzazione, che determina la stesura di una patina sopra le particelle, con conseguente aumento delle dimensioni del diametro di circa 6 nm.

Di conseguenza, siamo portati a concludere che le misurazioni al SEM abbiano confermato quelle ottenute al TEM, con differenze minime dovute ai diversi strumenti utilizzati per le analisi.

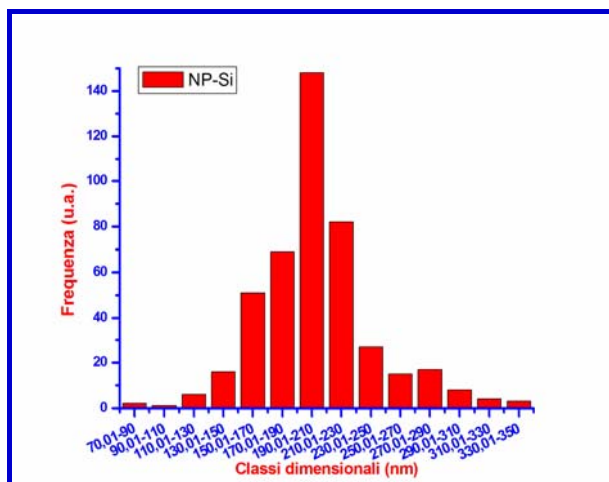


Figura 5.29. Distribuzione dimensionale delle NP-Si misurate al SEM.

Dal grafico riportato in Figura 5.29, risulta che la maggioranza delle NP-Si ha dimensioni che oscillano tra i 190 e i 210 nm. Sono state misurate anche alcune particelle con dimensioni al di sotto dei 100 nm, come visto anche nei dati ottenuti al TEM, e alcune al di sopra dei 300 nm. I casi estremi sono comunque isolati e sono da attribuire, nel primo caso a parti di NP-Si che si separano, nel secondo caso, probabilmente, ad aggregati.

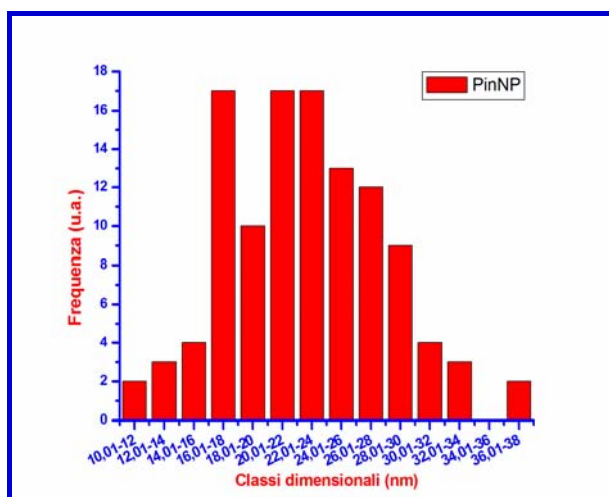


Figura 5.30. Distribuzione dimensionale delle "P in NP" misurate al SEM.

Dal grafico riportato in Figura 5.30 si può notare che le "P in NP" si ritrovano soprattutto nelle classi dimensionali dai 16 ai 18 nm, e dai 20 ai 24 nm. Dal confronto di queste dimensioni con

quelle ottenute dal dimensionamento al TEM (Tab. 5.15), si evince che la misurazione al SEM ha restituito diametri maggiori rispetto alle particelle osservate al TEM, molto probabilmente per le questioni prima riportate relative alla preparazione del campione da osservare.

5.4.6.2. Caratterizzazione delle NP-GS

Le NP-GS sono state osservate al SEM, sia a CA-1 che a DE. Il campione è stato preparato secondo il Metodo 1 (Par. 5.3.3.5). Il dimensionamento non è stato semplice, in quanto le NP sono apparse con contorni poco delineati. In Figura 5.31 sono mostrate le NP-GS fotografate a CA-1 (5.31, A) e a DE (5.31, B).

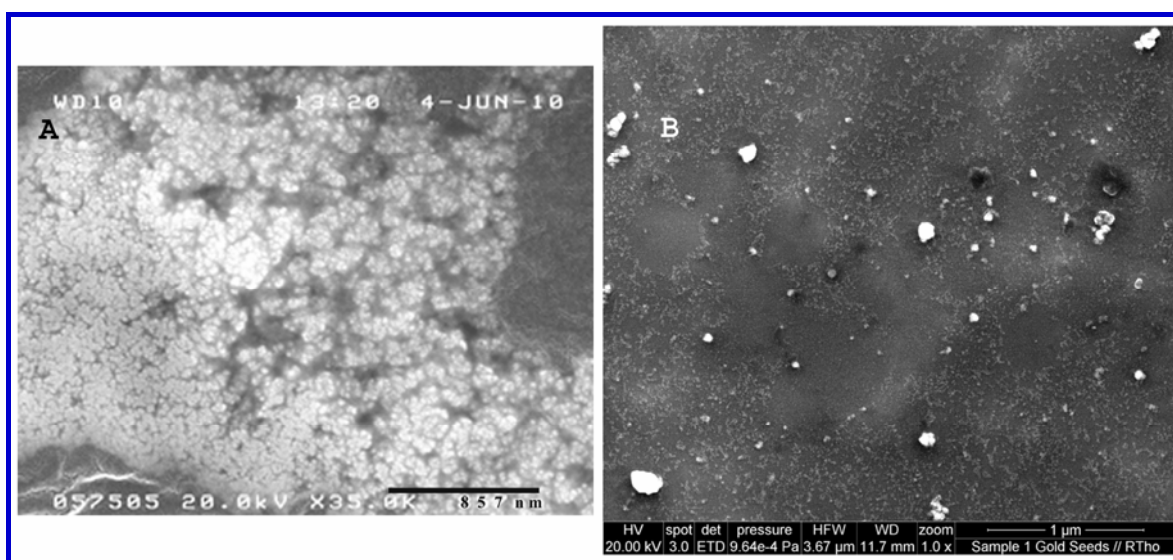


Figura 5.31. NP-GS fotografate a CA-1 (A), e a DE (B).

Le NP-GS mostrate in Figura 5.31 appaiono come delle particelle aggregate tra loro. Il dimensionamento è stato effettuato prendendo in considerazione immagini acquisite a CA-1 (Fig. 5.31.A), mentre le NP-GS in Figura 5.31.B non sono state misurate in quanto l'immagine non permette di distinguere tra una particella singola ed un aggregato, pertanto si sarebbero ottenuti dei risultati fuorvianti.

In Tabella 5.20 sono riportati i dati relativi al dimensionamento delle NP-GS. In particolare, è stata calcolata la media delle misurazioni effettuate, in nm (Media), la deviazione standard (SD), la percentuale di deviazione standard rispetto alla media (%SD), il numero di foto esaminate (n. foto), ed il numero di misurazioni effettuate (n. NP).

Tabella 5.20. Analisi dimensionale delle NP-GS al SEM.

Campione	Media (nm)	SD	%SD	n. foto	n. NP
NP-GS	21,96	5,14	23,40	2	100

È stato calcolato che le NP-GS hanno un diametro medio di $21,96 \pm 5,14$ nm. La loro dimensione, quindi, risulta superiore rispetto alle NP-GS osservate al TEM (Tab. 5.16). Questo potrebbe essere dovuto al fatto che non è stato semplice discernere tra le singole particelle, pertanto è possibile che sia stata considerata più di una NP-GS al momento della misurazione.

In Figura 5.32, è riportata la distribuzione dimensionale delle NP-GS osservate a CA-1.

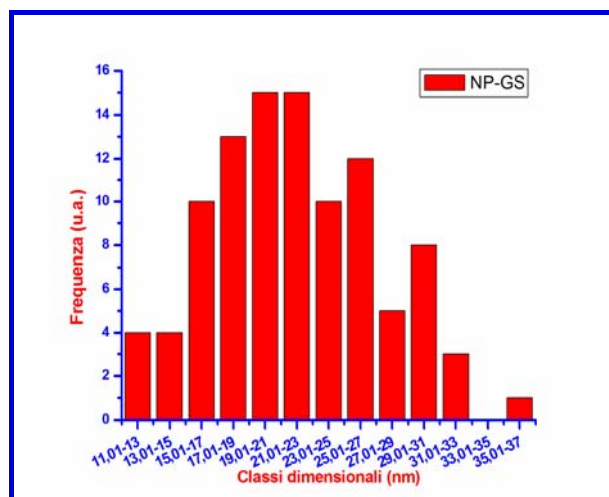


Figura 5.32. Distribuzione dimensionale di NP-GS.

Dal grafico in Figura 5.32 si osserva che le NP-GS hanno dimensioni che variano tra gli 11 ed i 37 nm, ma la maggior parte delle NP si ritrova nelle classi dimensionale tra i 19 ed i 23 nm.

5.4.6.3. Caratterizzazione delle NP-Si)GS

Le NP-Si)GS sono state osservate al SEM a DE, ed il campione è stato preparato secondo il Metodo 2 e 4 (Par. 5.3.3.5). Un campione di NP-Si)GS è stato osservato anche a CA-1, ma non è stato osservato niente che potesse essere riconducibile alla struttura morfologica delle NP attese.

Nella caratterizzazione effettuata a DE, sono stati osservati due campioni di NP-Si)GS. Le NP sono mostrate in Figura 5.33.

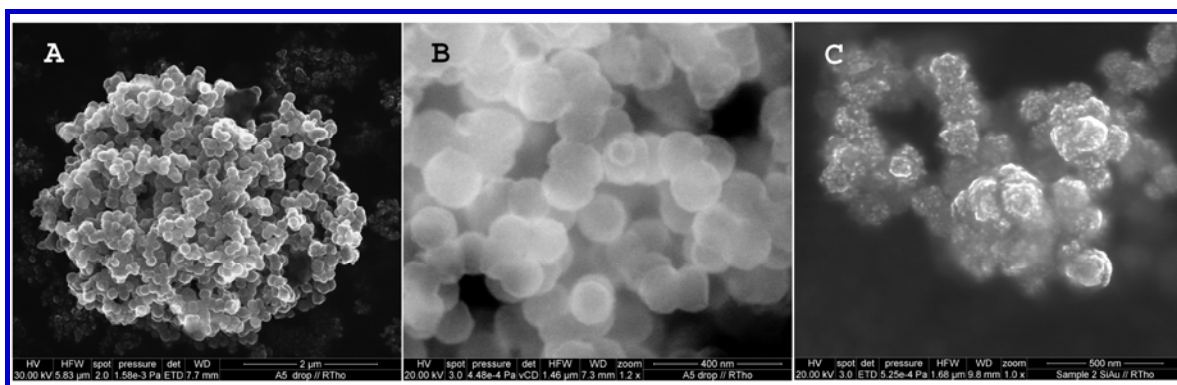


Figura 5.33. NP-Si)GS fotografate a DE.

Le NP mostrate in Figura 5.33.A e 5.33.B, sono state preparate con il Metodo 4, mentre quelle mostrate in Figura 5.33.C, derivano da un campione preparato con il Metodo 2. In particolare, in Figura 5.33.A e 5.33.C le NP sono state fotografate in backscattering [14], pertanto le aree in cui sono presenti le NP-GS sono risultate più luminose rispetto a quelle in cui è presente solo la silice (ben evidente in Fig. 5.32.C). Infatti, alcune NP risultano essere più chiare di altre, ad indicare che le NP-GS non si dispongono uniformemente sulle NP-Si. Le NP-Si)GS sono mostrate, in Figura 5.33.A e 5.33.C, a due diversi ingrandimenti. In particolare, nella Figura 5.33.C sono mostrate anche le piccole NP che compongono le NP-Si. Inoltre, mediante una sonda EDS è stata accertata la presenza di silice e d'oro nei campioni analizzati, come mostrato in Figura 5.34, A e B.

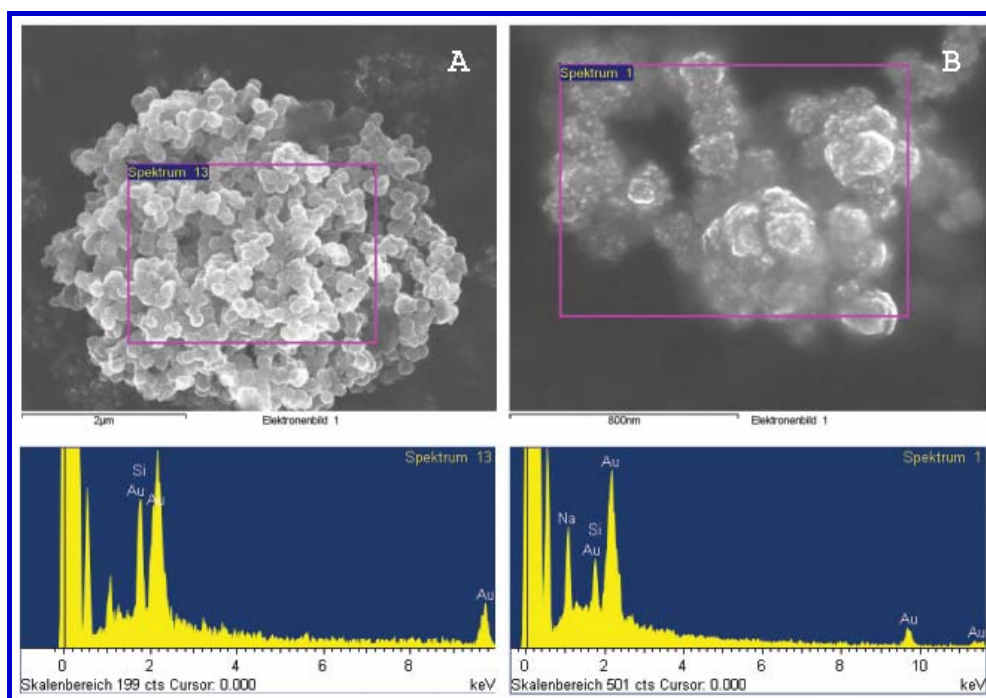


Figura 5.34. NP-Si)GS fotografate a DE ed analizzate all'EDS.

In Figura 5.34.A, è mostrato il campione preparato con Metodo 4, mentre, in 5.34.B il campione preparato con Metodo 2. In entrambi i casi, come è possibile notare dagli spettri EDS era presente sia la silice che l'oro. Grazie all'analisi EDS è stato possibile anche stimare le percentuali di ciascun elemento presenti nel campione: questi risultati sono riassunti in Tabella 5.21. In particolare, sono riportate le percentuali di silice (Si), d'oro (Au) e di altri elementi (altro). Tra i campioni considerati, uno è stato preparato con il Metodo 4 (L1), mentre l'altro è stato preparato con il Metodo 2 (L2). Inoltre, per ogni elemento è stata calcolata la percentuale della massa (% Massa), e del numero di atomi presente (% Atomi) rispetto all'intero campione.

Tabella 5.21. Composizione dei campioni di NP-Si)GS analizzati al SEM.

Campione		Si	Au	altro
L1	% Massa	21,96	78,04	/
	% Atomi	66,36	33,64	/
L2	% Massa	13,33	59,69	26,98
	% Atomi	24,33	15,53	60,14

I dati riportati in Tabella 5.21 mostrano che, nei due campioni esaminati, vi sono diverse percentuali degli elementi presenti. In particolare, in L1 è presente soltanto silice ed oro (Fig. 5.34.A), mentre in L2 è stata riscontrata la presenza anche di altri elementi (Fig. 5.34.B).

In Tabella 5.22, infine, sono riportati i dati riguardanti il dimensionamento delle NP-Si)GS. In particolare, sono riportate le dimensioni medie delle NP-Si)GS, in nm (Media), la deviazione standard (SD), la percentuale di deviazione standard rispetto alla media (%SD), il numero di foto esaminate (n. foto), ed il numero di misurazioni effettuate (n. NP). I campioni esaminati sono stati preparati col Metodo 4 (A5, A5_BS), o col Metodo 2 (L1). Inoltre, il campione A5 è stato fotografato anche in backscattering, e le misurazioni effettuate sono indicate con A5_BS.

Nelle immagini acquisite è stata verificata la presenza, oltre che delle NP-Si)GS (NP), delle particelle che compongono le NP-Si (P_{Si} in NP), delle NP-GS adese sulla superficie delle NP-Si (P_{Au} in NP), o separate dalle NP-Si (P_{Au} out NP), ed anche delle particelle di silice separate dalle NP-Si (P_{Si} out NP).

Dall'analisi della Tabella 5.22 si evince che la misurazione delle NP ha portato a risultati differenti, nei diversi campioni. Anche A5, ed A5_BS, stesso campione ma immagini acquisite con metodiche differenti, hanno restituito delle dimensioni differenti, con A5 maggiore di A5_BS. Infine, il dimensionamento di L1 ha dato delle dimensioni medie di NP ancora inferiori ($135,39 \pm 23,34$ nm). Se questi dati vengono confrontati con quelli riportati in Tabella 5.17, si nota che, al TEM, il diametro delle NP-Si)GS è superiore rispetto a quello delle NP osservate al SEM. Un'altra diffe-

renza riscontrata è che, mentre nelle NP-Si)GS osservate al TEM, non è stato possibile osservare “P_{Si} in NP”, ma sono state osservate “P_{Au} in NP”, viceversa al SEM le ultime non sono state osservate, mentre è stato possibile dimensionare le prime (Tab. 5.22).

Tabella 5.22. Analisi dimensionale delle NP-Si)GS al SEM.

Campione	Media (nm)	SD	%SD	n. foto	n. NP	
A5	NP	178,66	37,79	21,15	4	137
	P _{Si} in NP	15,70	3,05	19,44	2	40
	P _{Au} in NP	/	/	/	/	/
	P _{Au} out NP	/	/	/	/	/
	P _{Si} out NP	/	/	/	/	/
A5_BS	NP	149,89	19,85	13,24	2	48
	P _{Si} in NP	/	/	/	/	/
	P _{Au} in NP	/	/	/	/	/
	P _{Au} out NP	/	/	/	/	/
	P _{Si} out NP	/	/	/	/	/
L1	NP	135,39	23,34	17,24	5	215
	P _{Si} in NP	16,36	3,00	18,36	5	228
	P _{Au} in NP	/	/	/	/	/
	P _{Au} out NP	/	/	/	/	/
	P _{Si} out NP	/	/	/	/	/

Infine, in Figura 5.35 e 5.36 sono riportati i grafici della distribuzione dimensionale di NP-Si)GS, e di “P_{Si} in NP”.

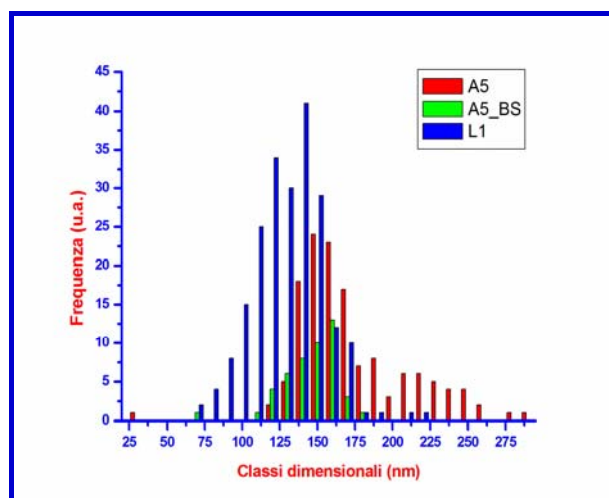


Figura 5.35. Distribuzione dimensionale di NP-Si)GS.

Dalla Figura 5.35 emerge che le NP-Si)GS hanno un diametro che varia dai 30 ai 295 nm, ma la maggior parte delle NP si trova distribuita in un intervallo che va dai 110 ai 175 nm circa.

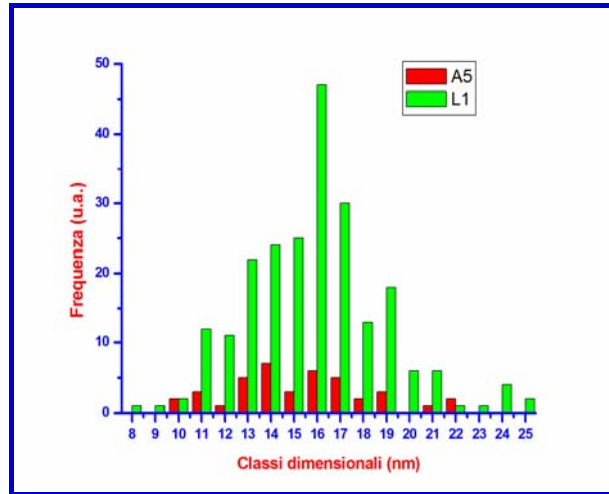


Figura 5.36. Distribuzione dimensionale di “P_{Si} in NP”.

Per quanto riguarda, invece, la distribuzione dimensionale di P_{Si} in NP, nel campione A5 sono state misurate particelle con il diametro che varia tra 10 e 22 nm, sebbene la maggior parte delle NP si ritrovi nell’intervallo tra 13 e 17 nm; per il campione L1, invece, la classe dimensionale maggiormente rappresentata è stata quella dei 16 nm. Questi dati rispecchiano le dimensioni riportate in Tabella 5.22.

5.4.6.4 Caratterizzazione delle NP-Si)Au

Le NP-Si)Au sono state fotografate a CA-1 e a DE. Il campione è stato preparato secondo il Metodo 1 (Par. 5.3.3.5). Le immagini acquisite hanno mostrato le NP-Si)Au aggregate tra loro, tanto da renderne difficile il dimensionamento. In Figura 5.37 è mostrato il campione fotografato a CA-1.

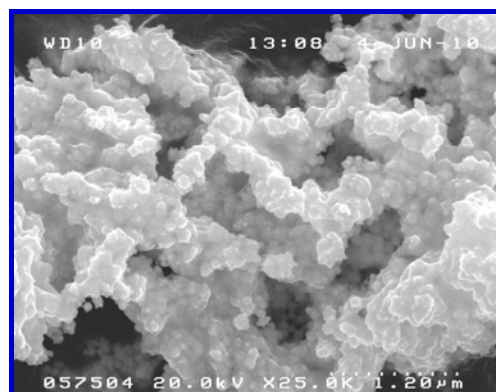


Figura 5.37. NP-Si)Au fotografate a CA-1.

Nonostante il campione fotografato abbia restituito delle immagini in cui era difficile distinguere le diverse particelle, è stato comunque effettuato il dimensionamento. Nella Tabella 5.23 sono riportati, infatti, i dati relativi al diametro medio delle particelle, in nm (Media), la deviazione standard (SD), la percentuale di deviazione standard rispetto alla media (%SD), il numero di foto esaminate (n. foto), ed il numero di misurazioni effettuate (n. NP). È stato possibile effettuare il dimensionamento solo per il lotto (L1) analizzato a CA-1. Sono state misurate le NP-Si)Au (NP), mentre non sono state osservate altre particelle (i.e., “P_{Au} in NP”, “P_{Au} out NP”, e “P_{Si} out NP”).

Tabella 5.23. Analisi dimensionale delle NP-Si)Au al SEM.

Campione	Media (nm)	SD	%SD	n. foto	n. NP
L1 NP	91,13	19,38	21,27	4	132
L1 P _{Au} in NP	/	/	/	/	/
L1 P _{Au} out NP	/	/	/	/	/
L1 P _{Si} out NP	/	/	/	/	/

La dimensione media delle NP-Si)Au è risultata essere di $91,13 \pm 19,38$ nm (Tab. 5.23), quindi inferiore a quella delle NP-Si)Au misurate al TEM (Tab. 5.18). Inoltre, se al TEM erano state osservate delle particelle con particolari cavità ed erosioni (Fig. 5.25), queste non sono state osservate al SEM.

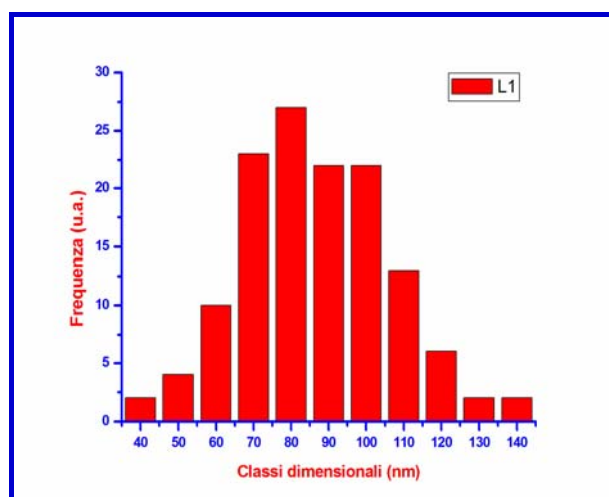


Figura 5.38. Distribuzione dimensionale di NP-Si)Au.

In Figura 5.38 è riportata la distribuzione dimensionale delle NP-Si)Au, osservate al SEM. Le classi dimensionali maggiormente rappresentate sono quelle dai 50 ai 100 nm.

5.4.7. Analisi al DLS

Si è ritenuto opportuno effettuare le analisi al DLS per ottenere delle ulteriori informazioni sulle dimensioni delle particelle. A differenza di TEM e SEM, infatti, il DLS tiene conto anche della nube di ioni che interagisce elettrostaticamente con la particella, e si muove con essa. Il diametro misurato viene chiamato diametro idrodinamico [15], ed è un dato importante soprattutto quando si pensa alla veicolazione di tali particelle all'interno dell'organismo umano, in cui si troverebbero ad interagire con molecole cariche che possono aderire alla loro superficie. Lo strumento misura, oltre al diametro idrodinamico, anche la carica superficiale della particella, e l'indice di polidispersione. Quest'ultimo dà informazioni su quanto sia omogenea la popolazione di particelle che si sta analizzando. Più il risultato è basso, più le particelle hanno valori simili tra loro. Le analisi sono state effettuate a 25 ed a 37°C. La prima analisi rispecchia la temperatura dell'ambiente, la seconda mima, invece, la temperatura corporea. In questo modo è stato valutato ogni eventuale variazione nella dispersione nanoparticellare che potesse essere legato al variare della temperatura.

La Tabella 5.24 riassume i risultati ottenuti dalle misurazioni delle NP-Si in etanolo. In particolare, sono riportate le diverse diluizioni con le quali sono stati preparati i campioni di NP-Si (Dil.), come descritto in Tabella 5.24, la temperatura alla quale sono state eseguite le misurazioni (T°C), il diametro idrodinamico (Z-Av), l'indice di polidispersione (PDI), ovvero il potenziale Z (ZP), i valori riportati in intensità (Int. Pk), ed in numero (Num. Pk).

Tabella 5.24. Analisi dimensionali di NP-Si ottenute al DLS.

Dil.	T°C	Z-Av (nm)	PDI	ZP	Int. Pk (nm)	Num. Pk (nm)
1	25	805,7 ± 36,8	0,5 ± 0,1	1,8 ± 1,8	612,5 ± 47,4	584,7 ± 52,4
	37	722,9 ± 78,8	0,4 ± 0,0	0,6 ± 1,3	482,2 ± 70,8	521,9 ± 63,3
2	25	996,2 ± 136,3	0,6 ± 0,1	-9,2 ± 1,1	525,3 ± 51,6	511,8 ± 53,2
	37	1.816,5 ± 159,5	0,9 ± 0,0	-5,4 ± 1,2	381,5 ± 23,5	376,8 ± 22,8
3	25	690,6 ± 66,9	0,4 ± 0,0	6,6 ± 1,4	812,7 ± 200,1	595,5 ± 307,1
	37	/	/	/	/	/
4	25	939,3 ± 65,8	0,2 ± 0,1	-28,6 ± 1,0	986,9 ± 87,4	940,2 ± 58,0
	37	1.503,5 ± 80,9	0,3 ± 0,0	16,7 ± 3,6	2.017,5 ± 143,8	1.279,5 ± 88,0
5	25	547,3 ± 33,1	0,4 ± 0,1	-7,5 ± 1,0	645,5 ± 47,8	269,2 ± 260,6
	37	/	/	/	/	/
6	25	727,3 ± 67,1	0,5 ± 0,1	-14,6 ± 0,9	639,9 ± 83,0	608,4 ± 81,7
	37	/	/	/	/	/
7	25	577,6 ± 57,2	0,4 ± 0,1	-23,0 ± 1,2	477,8 ± 107,5	367,1 ± 196,5
	37	/	/	/	/	/

La diluizione indicata con 1 è quella che normalmente viene utilizzata per tutte le misurazioni: 10 μL di campione vengono redispersi in 1000 μL di H_2O . Questa misurazione non ha dato i risultati sperati, infatti il diametro idrodinamico si è mostrato decisamente superiore a quello che era stato visto con TEM e SEM.

Si è pensato che il problema potesse essere l'aggregazione di più particelle, al punto che i risultati restituiti dallo strumento fossero le dimensioni di più particelle unite tra loro. D'altronde, era già stato visto al TEM e SEM che è difficile osservarle come entità separate. Pertanto, si è pensato che si potessero avere dei risultati migliori apportando una maggiore diluizione al campione. Questo è stato fatto, appunto, con la diluizione 2, in cui soltanto 1 μL di campione è stato diluito in 1000 di μL di H_2O . Tuttavia, i risultati sono stati molto lontani da quelli attesi.

Come prova contraria, abbiamo aumentato la concentrazione del campione (diluizione 4), ottenendo risultati a quelli ottenuti con le diluizioni 1 e 2.

Come ulteriore prova, infine, si è aggiunto, alla diluizione del campione, il TMAOH, in diverse quantità. Il TMAOH è un composto in cui sono presenti 4 gruppi amminici, pertanto è carico positivamente: tale carica è controbilanciata dalla presenza del gruppo ossidrilico, carico negativamente. Con l'aggiunta di questo composto alla diluizione si è voluta promuovere la variazione del pH della soluzione, per far sì che le particelle assumessero una carica superficiale e quindi si respingessero a vicenda, disperdendosi omogeneamente nella soluzione. In effetti, il dimensionamento delle particelle in presenza di TMAOH ha portato all'ottenimento di dimensioni inferiori rispetto a quelle ottenute nelle precedenti misurazioni: analizzando, infatti, sempre i dati nella colonna Z-Av, si nota che con le diluizioni 3, 5, 6 e 7 si ha una notevole diminuzione delle dimensioni delle particelle. Infatti, mentre in presenza del campione diluito in acqua, si erano ottenuti dei diametri idrodinamici mai inferiori a 800 nm, in presenza di TMAOH si arriva fino ad un minimo di 547 nm per la diluizione 5.

Fin'ora si è tenuto conto solamente del raggio idrodinamico. Tuttavia, dalle misurazioni al DLS si ottengono anche altre informazioni molto importanti. Per esempio, un altro indice delle dimensioni delle nanoparticelle è Num. Pk, che riporta il diametro idrodinamico della classe dimensionale più numerosa. Se osserviamo i dati riportati in questa colonna, notiamo, innanzitutto, che i valori sono sempre inferiori a quelli ottenuti con lo Z-Av. Il diametro più piccolo si è ottenuto in presenza della diluizione 5: 269 nm, a 25°C. Con la stessa diluizione, lo Z-Av era di 547 nm, ad indicare la presenza di NP-Si di dimensioni maggiori. Ciò significa che all'interno della popolazione di NP-Si sono presenti particelle più grandi, o forse aggregati di particelle, che vengono lette dallo strumento come un'unica entità. I valori Num. Pk, invece, tengono conto solamente delle dimensioni delle particelle che si trovano in numero maggiore. Sebbene questa può apparire una

interpretazione dei dati più vicina alla realtà, occorre analizzare sia i valori di Z-Av sia quelli di Num. Pk contemporaneamente.

Un altro dato estremamente importante, che deve essere analizzato di pari passo con lo Z-Av ed il Num. Pk, è il PDI. Se il valore di PDI è uguale o inferiore a 0,1, il campione è monodisperso, cioè costituito da un'unica popolazione particellare. Al contrario, se il PDI ha un valore superiore o uguale a 0,5, la popolazione è polidispersa [15]. Nel caso delle NP-Si, osserviamo in Tabella 5.24 che i PDI sono tutti inferiori a 0,5, tranne che per la diluizione 2. Pertanto, secondo quanto riportato nel manuale dello strumento [15] possiamo dire che la popolazione è monodispersa.

In Tabella 5.25 sono riportati, invece, i dati riguardanti le analisi al DLS delle NP-GS. Le NP sono state analizzate per tutti i parametri riportati in Tabella 5.24, ma i campioni sono stati preparati sempre secondo la diluizione 1 (Tab. 5.4). Sono stati analizzati 6 diversi campioni (C.). Per una maggiore comodità di lettura, ad ogni prova è stato assegnato un numero (T).

Dalla Tabella 5.25 si evince che l'analisi del campione 1 è stata ripetuta 6 volte, e lo stesso campione ha restituito dei risultati molto differenti tra le diverse ripetizioni. Questa aliquota è stata sintetizzata il 12 settembre 2011. Tra una ripetizione e l'altra, non è stata apportata nessuna modifica nella preparazione del campione. Per due volte sono stati ottenuti dei risultati di Num.Pk. elevati: questo è stato osservato nel Trial 1 e nel Trial 7. Negli altri casi, invece, le dimensioni si sono mostrate vicine a quelle ottenute al TEM (Tab. 5.16).

Per quanto riguarda, invece, il campione 2, questo è stato sintetizzato il 3 dicembre 2010, ed è stato il campione utilizzato per tutti gli esperimenti di tossicità (Cap. 6). Le dimensioni delle particelle, riportate nella colonna (Number Pk) sono di $2,3 \pm 1,5$ nm.

Nel campione 3 (Trial 8), le dimensioni si sono rivelate superiori al micrometro. La sintesi di quest'aliquota di NP è avvenuta secondo il protocollo descritto precedentemente (Par. 5.3.1.4).

Infine, i campioni 9, 10, e 11, sono stati preparati come precedentemente descritto (Par. 5.3.1.4), ma utilizzando reagenti sia appena preparati (freschi), sia vecchi di circa 10 giorni. Tutti e 3 i campioni sono stati sintetizzati il 3 maggio 2010. In particolare: il campione 9 è stato preparato con NaOH e HAuCl₄ vecchi, e THPC freschi; il campione 10 è stato preparato con NaOH vecchio, e HAuCl₄ e THPC freschi. Infine, il campione 11, è stato sintetizzato con NaOH e THPC vecchi, e HAuCl₄ appena preparato. Nonostante queste differenze, le dimensioni riportate nella colonna Number Pk si sono mostrate simili tra loro, e non molto distanti da quelle del campione 2, utilizzato per i test di tossicità.

Tabella 5.25. Analisi dimensionali di NP-GS ottenute al DLS.

T	C	T°C	Z-Av (nm)	PDI	ZP	Int. Pk (nm)	Num. Pk (nm)
1	1	25	1.298,3 ± 300,7	0,8 ± 0,4	-12,2 ± 1,7	1.240,8 ± 510,0	953,8 ± 331,2
		37	1.461,0 ± 212,0	0,6 ± 0,1	-11,9 ± 0,9	559,3 ± 146,6	524,7 ± 144,9
2	1	25	992,9 ± 463,7	0,6 ± 0,2	-17,7 ± 3,7	444,8 ± 240,1	5,1 ± 2,6
		37	1.232,9 ± 737,3	0,6 ± 0,2	-11,9 ± 0,9	555,8 ± 225,8	7,9 ± 3,3
3	1	25	830,3 ± 99,3	0,4 ± 0,1	-13,1 ± 2,4	617,5 ± 175,1	588,6 ± 172,4
		37	2.073,4 ± 301,9	0,9 ± 0,1	-10,40 ± 1,4	374,5 ± 132,4	367,4 ± 127,8
4	1	25	447,9 ± 96,9	0,4 ± 0,1	-15,0 ± 2,2	353,5 ± 50,3	6,2 ± 1,6
		37	935,1 ± 198,5	0,7 ± 0,1	-17,7 ± 2,8	407,5 ± 210,4	6,5 ± 3,5
5	1	25	426,8 ± 121,2	0,5 ± 0,1	/	495,9 ± 202,7	6,9 ± 2,1
		37	/	/	/	/	/
6	1	25	376,2 ± 72,3	0,5 ± 0,1	-17,5 ± 2,6	382,6 ± 70,5	4,7 ± 2,0
		37	567,8 ± 129,4	0,4 ± 0,1	-19,3 ± 1,3	333,5 ± 50,0	5,7 ± 2,9
7	2	25	623,5 ± 91,2	0,6 ± 0,1	-11,3 ± 1,8	396,8 ± 43,0	2,3 ± 1,5
		37	712,7 ± 45,6	0,5 ± 0,0	-10,2 ± 1,4	436,4 ± 112,4	3,7 ± 1,3
8	3	25	2.235,3 ± 164,1	0,5 ± 0,1	-18,0 ± 2,6	1.143,7 ± 42,9	1.133,7 ± 3 8,6
		37	1.905,3 ± 252,0	0,8 ± 0,0	-17,0 ± 0,7	564,7 ± 81,2	564,3 ± 82,4
9	4	25	485,1 ± 117,3	0,5 ± 0,1	-17,1 ± 1,6	289,8 ± 104,3	5,1 ± 0,8
		37	289,9 ± 169,5	0,5 ± 0,3	-13,6 ± 0,5	305,5 ± 217,2	4,5 ± 1,6
10	5	25	325,9 ± 24,6	0,4 ± 0,1	-22,8 ± 3,2	339,2 ± 78,7	4,9 ± 1,2
		37	139,5 ± 23,1	0,2 ± 0,1	-21,5 ± 2,4	144,4 ± 13,5	59,90 ± 46,9
11	6	25	174,9 ± 79,6	0,5 ± 0,2	-16,6 ± 1,5	458,5 ± 563,0	4,2 ± 1,3
		37	239,5 ± 95,1	0,3 ± 0,1	-15,3 ± 1,1	133,1 ± 27,5	3,2 ± 2,2

In Tabella 5.26 sono riportati, invece, i risultati delle analisi dimensionali delle NP-Si)GS, al DLS. Anche in questo caso, per facilità di comprensione, dato che la lettura del campione 1 è stata ripetuta 4 volte, si è abbinato ai campioni (C) un numero progressivo, che indica il trial (T).

Per quanto riguarda le NP-Si)GS, sono stati analizzati 5 diversi campioni. L'analisi del campione 1 è stata ripetuta 4 volte (Trial 1-4). Il campione 1 è stato sintetizzato il 16 settembre 2011, pochi giorni prima dell'analisi al DLS. Le dimensioni nelle NP si sono mostrate diverse nelle 4 ripetizioni. Considerando i valori riportati nella colonna "Number Pk", nei Trial 1-2 il diametro medio delle NP si è rivelato superiore ai 400 nm, mentre nel Trial 3 inferiore ai 100 nm, ed infine, nel Trial 4, è stato misurato un diametro medio di $143,3 \pm 45,8$ nm, a 25°C. Quest'ultima dimensione

risulta simile a quella ottenuta nella caratterizzazione al TEM (Tab. 5.17), e al SEM (Tab. 5.21). Nel Trial 3, invece, il diametro medio ottenuto a 25°C è di soli $45,5 \pm 52,4$ nm. Questo valore non risulta simile al dimensionamento effettuato al TEM, né al SEM, ma è possibile che siano state misurate delle particelle di silice distaccatesi dalla NP-Si.

I campioni 2-5 hanno riportato dimensioni medie superiori a quelle osservate al TEM, e al SEM, pertanto è probabile che si siano formati degli aggregati. I campioni 2-5 sono stati tutti sintetizzati secondo il protocollo riportato al Paragrafo 5.3.1.5. Soltanto il Trial 5 rappresenta un'aliquota delle NP-Si)GS in cui non sono state effettuate le centrifughe e le ridispersioni in acqua. Proprio nel Trial 5 è stato il campione che ha restituito il diametro maggiore rispetto a tutti i campioni analizzati.

Tabella 5.26. Analisi dimensionali di NP-Si)GS ottenute al DLS.

T	C	T°C	Z-Av (nm)	PDI	ZP	Int. Pk (nm)	Num. Pk (nm)
1	1	25	$892,5 \pm 217,9$	$79,0 \pm 175,5$	$-8,3 \pm 1,5$	$448,0 \pm 88,2$	$417,4 \pm 94,8$
		37	$1.069,4 \pm 181,6$	$0,7 \pm 0,3$	$-10,4 \pm 0,8$	$395,1 \pm 69,8$	$362,8 \pm 63,0$
2	1	25	$752,8 \pm 139,0$	$0,5 \pm 0,1$	$-13,4 \pm 2,0$	$502,6 \pm 62,2$	$481,4 \pm 578,0$
		37	$1.556,9 \pm 348,1$	$0,5 \pm 0,1$	$-10,0 \pm 0,3$	$810,7 \pm 266,5$	$811,3 \pm 264,5$
3	1	25	$186,7 \pm 25,5$	$0,3 \pm 0,0$	$-24,6 \pm 2,4$	$209,0 \pm 25,9$	$45,5 \pm 52,4$
		37	$418,4 \pm 43,6$	$0,2 \pm 0,0$	$-8,1 \pm 1,1$	$415,0 \pm 50,4$	$328,7 \pm 42,7$
4	1	25	$154,7 \pm 145,1$	$0,7 \pm 0,3$	$160,6 \pm 51,2$	$160,6 \pm 51,2$	$143,3 \pm 45,8$
		37	$1.1142,7 \pm 301,4$	$0,5 \pm 0,1$	$-16,4 \pm 1,0$	$680,0 \pm 187,8$	$674,4 \pm 190,0$
5	2	25	$1115,0 \pm 9,5$	$0,5 \pm 0,1$	$-19,9 \pm 1,3$	$600,3 \pm 112,4$	$593,4 \pm 109,7$
		37	$1076,6 \pm 102,3$	$0,7 \pm 0,1$	$-18,1 \pm 1,9$	$421,8 \pm 136,3$	$416,3 \pm 133,8$
6	3	25	$881,3 \pm 122,0$	$0,5 \pm 0,3$	$-7,2 \pm 0,5$	$419,2 \pm 86,8$	$388,2 \pm 71,5$
		37	$2027,3 \pm 705,9$	$0,9 \pm 0,1$	$-11,0 \pm 4,9$	$281,8 \pm 144,2$	$268,6 \pm 129,7$
7	4	25	$692,7 \pm 27,2$	$0,4 \pm 0,1$	$-16,1 \pm 5,5$	$621,8 \pm 148,0$	$579,4 \pm 130,0$
		37	$604,8 \pm 16,2$	$0,5 \pm 0,0$	$-17,4 \pm 0,4$	$373,5 \pm 52,6$	$364,6 \pm 48,6$
8	5	25	$658,4 \pm 14,9$	$0,3 \pm 0,0$	$-30,3 \pm 0,0$	$538,6 \pm 47,2$	$501,5 \pm 34,5$
		37	$631,0 \pm 21,7$	$0,4 \pm 0,0$	$-32,9 \pm 10,1$	$381,5 \pm 24,0$	$370,5 \pm 21,5$

In Tabella 5.27, infine, sono riportati i dati dell'analisi al DLS della dispersione di NP-Si)Au. Queste particelle sono state sintetizzate secondo il protocollo riportato al Paragrafo 5.3.1.6. Sono stati analizzati 6 campioni, l'analisi di ciascun campione è stata ripetuta una sola volta.

I campioni 1 e 2 sono stati sintetizzati, rispettivamente, il 16 settembre 2011, ed il 7 giugno 2011 e, per la sintesi, è stato seguito il protocollo riportato nel Paragrafo 5.3.1.6, ma non sono state effettuate le centrifughe e la ridispersione in acqua. Per queste NP, è stato misurato un diametro di $19,1 \pm 18,7$ nm (campione 1), e di $4,0 \pm 0,7$ nm (campione 2), a 25 °C. Sebbene i due campioni siano stati preparati nella stessa maniera, le NP in essi disperse hanno riportato delle dimensioni differenti. Inoltre, a 37°C, le dimensioni del campione 1 aumentano, mentre quelle del campione 2 rimangono costanti. Per quanto riguarda, invece, il campione 3, questo appartiene allo stesso lotto del campione 2, ma la differenza risiede nel fatto che il campione 3 ha subito due centrifughe e due ridispersioni in acqua. Occorre specificare che la seconda centrifuga è stata effettuata a distanza di 10 giorni dalla prima. Nonostante questa differenza nella preparazione dei campioni 2 e 3, le dimensioni sono risultate simili, sia a 25 che a 37°C. Le dimensioni ottenute sono nettamente inferiori rispetto a quelle calcolate nella caratterizzazione al TEM (Tab. 5.18), ed al SEM (Tab. 5.23). Infatti, se in Tabella 5.18 sono state misurate NP della dimensione di pochi nm, per i campioni 1-3, al TEM era stata calcolata una media di $138,5 \pm 22,9$ nm (Tab. 5.18), e al SEM di $91,1 \pm 19,4$ nm (Tab.5.23). Di conseguenza è possibile che le NP analizzate al DLS siano frammenti di NP-Si o aggregati d'oro distaccatisi dalle NP-Si)Au.

Tabella 5.27. Analisi dimensionali di NP-Si)Au ottenute al DLS.

C	T°C	Z-Av (nm)	PDI	ZP	Int. Pk (nm)	Num. Pk (nm)
1	25	$62,6 \pm 2,5$	$0,3 \pm 0,0$	$-22,9 \pm 1,1$	$85,7 \pm 21,7$	$19,1 \pm 18,7$
	37	$66,3 \pm 1,5$	$0,4 \pm 0,0$	$-19,9 \pm 0,5$	$101,8 \pm 1,7$	$27,3 \pm 20,8$
2	25	$40,2 \pm 1,2$	$0,5 \pm 0,0$	$-25,2 \pm 0,9$	$69,9 \pm 3,5$	$4,0 \pm 0,7$
	37	$42,6 \pm 0,7$	$0,4 \pm 0,0$	$-24,4 \pm 0,8$	$69,1 \pm 1,9$	$4,3 \pm 1,0$
3	25	$48,1 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,0$	$-19,7 \pm 2,8$	$84,6 \pm 1,4$	$4,5 \pm 0,5$
	37	$54,2 \pm 0,8$	$0,5 \pm 0,0$	$-17,2 \pm 0,5$	$92,6 \pm 2,8$	$4,6 \pm 0,6$
4	25	$625,1 \pm 127,9$	$0,6 \pm 0,1$	$-15,6 \pm 4,5$	$238,6 \pm 50,0$	$210,4 \pm 39,6$
	37	$731,9 \pm 156,0$	$0,7 \pm 0,2$	$-10,9 \pm 1,4$	$1.140,5 \pm 1872,0$	$125,7 \pm 125,1$
5	25	$1391,0 \pm 31,2$	$0,3 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,1$	$1132,7 \pm 31,4$	$1065,7 \pm 26,6$
	37	$1321,3 \pm 102,2$	$0,6 \pm 0,0$	$4,1 \pm 2,0$	$691,9 \pm 66,6$	$688,4 \pm 62,8$
6	25	$1401,3 \pm 59,7$	$0,2 \pm 0,1$	$10,6 \pm 0,4$	$1287,7 \pm 40,4$	$1203,0 \pm 13,9$
	37	$1278,0 \pm 230,5$	$0,4 \pm 0,1$	$10,1 \pm 0,8$	$961,8 \pm 214,6$	$946,5 \pm 197,2$

Il campione 4 appartiene allo stesso lotto del campione 2 e 3, ma in questo caso le due centrifughe e le ridispersioni in acqua sono state operate nel medesimo giorno, subito dopo il termine del processo di sintesi. Nonostante questo, le dimensioni appaiono nettamente superiori a quelle osservate nei campioni 1-3, e più simili al diametro delle NP-Si)Au osservate al TEM (Tab. 5.18).

Infine, i campioni 5 e 6 derivano dallo stesso lotto, sintetizzato il 27 aprile 2010. Le dimensioni ottenute dall'analisi al DLS, a 25°C risultano essere superiore al micrometro, mentre a 37°C si osserva una diminuzione del diametro. Queste dimensioni sono risultate essere superiori, sia a 25 che a 37°C, a quelle ottenute al TEM (Tab. 5.18), ed al SEM (Tab. 5.23). È probabile che si siano formati degli aggregati tra le particelle, i quali hanno determinato l'ottenimento di diametri (in colonna Number Pk) molto superiori rispetto a quelli ottenuti dalla caratterizzazione con microscopia elettronica.

5.4.8. Stabilità delle NP nei terreni di coltura

Le NP testate si sono mostrate stabili nel terreno di coltura per 24 h, ad eccezione delle NP-Si)RHOD, le quali sono precipitate sul fondo del microtubo entro pochi minuti dalla ridispersione. Questo, peraltro, ci era già stato anticipato dai collaboratori che hanno effettuato la sintesi di tali particelle [16].

5.5. Conclusioni

In sintesi, in questo capitolo è stato descritto il metodo di sintesi, di utilizzo, e di caratterizzazione di diversi tipi di NP inorganiche. Tutte le NP si sono mostrate stabili sia nel loro mezzo di dispersione originario, sia nei terreni di coltura utilizzati (Par. 2.2.1, 3.2.1, 4.2.1), eccezione fatta per le NP-Si)RHOD (Par. 5.3.4). Nei nostri laboratori sono state sintetizzate le NP-GS, le NP-Si)GS, e le NP-Si)Au, seguendo un protocollo presente in letteratura [5, 7], ed apportando qualche modifica per rendere ripetibile l'esperimento (Par. 5.4.1, 5.4.2, 5.4.3). Tuttavia, se l'ottenimento di NP-GS e di NP-Si)GS è stato confermato dalla caratterizzazione al TEM, SEM-EDS, e DLS (Par. 5.4.5.2, 5.4.5.3, 5.4.6.2, 5.4.6.3, 5.4.7), non si può affermare altrettanto per la sintesi delle NP-Si)Au. Infatti, le immagini ottenute al TEM (Par. 5.4.5.4), ed al SEM (Par. 5.4.6.4), rivelano che il campione di NP è rovinato, con buchi e cavità, e dall'analisi all'EDS non compare né la presenza dell'oro, né della silice (dati non mostrati). Infine, è stato messo a punto un protocollo per la coniugazione di molecole citotossiche, altamente lipofile, ad un complesso che permette la loro veicolazione in mezzi acquosi. Questo complesso, da noi indicato con l'acronimo DNPC, è stato sintetizzato con due diverse molecole citotossiche (Par. 5.4.4), e sebbene siano stati ottenute delle percentuali di coniugazione promettenti, sono ancora in corso gli esperimenti per creare un protocollo che permetta la ripetibilità dei risultati ottenuti.

5.6. Bibliografia e note

- [1] Certificati di analisi del lotto di NP-Au utilizzate dei nostri esperimenti. Questo certificato è presente, in forma cartacea, presso il nostro laboratorio, ma attualmente non è più possibile scaricarlo dal sito della Nanogap.
- [2] Scheda di sicurezza del THPC, scaricabile dal sito Sigma-Aldrich®. <<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=IT&language=it&productNumber=404861&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F404861%3Flang%3Dit>> (22 marzo 2013).
- [3] Scheda di sicurezza dell'HAuCl₄, scaricabile dal sito Sigma-Aldrich®. <<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/PleaseWaitMSDSPage.do?language=&country=IT&brand=SIAL&productNumber=50778&PageToGoToURL=http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/50778?lang=it®ion=IT>> (22 marzo 2013).
- [4] Comunicazione personale della Dr.ssa Brigida Silvestri, 16 giugno, 2012.
- [5] Duff, D.G., Baiker, A. A new hydrosol of gold clusters. 1. Formation and particle size variation. *Langmuir* 9(9), 2301-2309 (1993).
- [6] Comunicazione personale di Prof. Stefan Marx, 29 novembre 2010.
- [7] Kim, J.-H., Bryan, W.W., Chung, H.-W., Park, C.H., Jacobson, A.J., Lee, T.R. Gold, palladium, and gold#palladium alloy nanoshells on silica nanoparticle cores. *ACS Appl Mater Interfaces* 1(5), 1036-1069 (2009).
- [8] Comunicazione personale di Prof. Arturo M. Lopez-Quintela, 29 novembre 2012.
- [9] Turkevich, J. Colloidal gold. Part II. Color, coagulation, adhesion, alloying and catalytic properties. *Gold Bull* 18(4), 125-131 (1985).
- [10] Ellzey, S.E., Connick, W.J., Boudreaux, G.J., Klapper, H. A nuclear magnetic resonance study of the formaldehyde-induced exchange of methylol groups in tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium chloride and tris(hydroxymethyl)phosphine. *J Org Chem* 37(22), 3453-3457 (1972).
- [11] Gorenstein, D.G., Hydrolisis of a phosphonium salt. Encounter-limited, rate-determining breakdown of a pentavalent intermediate. *J Am Chem Soc* 95(25), 8060-8065 (1973).
- [12] Abdelhalim, M.A.K., Mady, M.M., Ghannam, M.M. Physical properties of different gold nanoparticles: ultraviolet-visible and fluorescence measurements. *J Nanomed Nanotechnol* 3(3), 1-5 (2012).
- [13] Congiu, C., Onnis, V., Vesce, L., Castorina, M. Synthesis and in vitro antitumor activity of new 4,5-dihydropirazole derivatives. *Bioorg Med Chem* 18(17), 6238-6248 (2010).
- [14] Pluk, H., Stokes, D.J., Lich, B., Wieringa, B., Fransen, J. Advantages of indium-tin oxide-coated glass slides in correlative scanning electron microscopy application of uncoated cultured cells. *J Microsc* 233(3), 353, 363 (2009).
- [15] Manuale di utilizzo del DLS Nano ZS, scaricabile dal sito Malvern. <http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf> (26 settembre 2012).
- [16] Comunicazione personale della Dr.ssa Brigida Silvestri, 6 giugno 2012.

TEST DI TOSSICITÀ

6.1. Introduzione

I saggi di tossicità da noi realizzati sono stati caratterizzati dall'esposizione di tre fenotipi cellulari (Cap. 2, 3, e 4) a nanoparticelle (NP) inorganiche, lipidiche, e ad una molecola anfifilica di cui si voleva testare la tossicità. Nei nostri test, il tempo di esposizione alle NP è stato variabile (8-72 h) e la tossicità è stata valutata in termini di vitalità cellulare.

Negli esperimenti descritti in questo capitolo, il CellTiter Blue (CTB) è stato scelto come reagente per la quantificazione della vitalità cellulare. Esso contiene resazurina, di colore blu scuro, che viene ridotta a resorufina, rosa e fluorescente, dalle cellule metabolicamente attive. Pertanto, la fluorescenza del CTB è proporzionale al numero di cellule vitali [1].

La casa produttrice Promega consiglia di aggiungere il reagente direttamente ai pozzetti con le cellule in coltura; alcuni autori, infatti, aggiungono direttamente il CTB al pozzetto [2], mentre altri preferiscono rinnovare il terreno di coltura, ed operare quindi un "lavaggio" delle cellule, prima dell'aggiunta del reagente [3].

In letteratura sono stati trovati anche esempi di utilizzo di reagenti differenti dal CTB, quali l'MTT [4], il quale sfrutta la reazione del sale di tetrazolio, composto solubile in acqua. In seguito al tempo di incubazione, che varia da 2 a 4 h [5,4], la sostanza precipita formando il formazano, cristallo insolubile in acqua. Tale composto viene poi recuperato e ridisciolto attraverso alcuni trattamenti della durata di 24-48 h [5,6] ed infine viene misurata la fluorescenza.

Altri autori invece utilizzano il SRB, che richiede un trattamento della durata superiore alle 48 h [7], mentre altri testano la vitalità cellulare sfruttando la conversione mitocondriale del WST-1 in formazano [8]. Il saggio del MTT è stato invece utilizzato in esperimenti dove è stato testato il paclitaxel [9].

La scelta del reagente da utilizzare per i nostri saggi di tossicità è ricaduta sul CTB proprio per la sua semplicità di utilizzo e la velocità di esecuzione rispetto agli altri reagenti, oltre che per la sua non tossicità [1].

L'esposizione alle NP di silice è stata da noi testata per alle 72 h, mentre altri autori hanno studiato solo un'esposizione di 2 [10] e 24 h [11,12]. Le cellule tumorali ed i melanociti da noi coltivati sono stati esposti anche a NP di silice aventi eparina coniugata in superficie. In letteratura, tuttavia, sono stati trovati studi effettuati solamente sulle Colo-38, nelle quali il tempo di incubazione è stato di 48 h [13]. Le NP d'oro sono state utilizzate da diversi autori per i test di tossicità; in questi esperimenti, alcuni hanno quantificato la vitalità cellulare col CTB [10], altri hanno utilizzato l'MTT [6]. Inoltre, certi studi sono stati eseguiti per tempi più lunghi dei nostri (i.e., 96 e 120 h) [14], ed addirittura, in alcuni casi, è stata osservata la mortalità cellulare mediante quantificazione dell'apoptosi [15].

6.2. Materiali

6.2.1. Prodotti per la coltura delle cellule.

Cellule, terreni ricostituiti, supplementi, neutralizzatore di tripsina preparato da noi (i.e., TN-lab), ed altri prodotti necessari alla coltura delle HEKa, HEMa-LP e Colo-38 sono riportati, rispettivamente, nei Paragrafi 2.2, 3.2, e 4.2.

6.2.2. Reagenti per il test di tossicità.

I reagenti utilizzati durante i test di tossicità comprendono il CellTiter-Blue[®] (CTB, Promega, n. cat. G8081), ed una soluzione di penicillina-streptomina, 100×, sterile (pen/strep, Sigma-Aldrich[®], n. cat. P0781). Il CTB è stato aliquotato (si veda oltre), conservato ad una temperatura di -27 - -30°C, ed utilizzato a temperatura ambiente (RT). La pen/strep è stata anch'essa aliquotata e conservata alla temperatura di -21°C.

6.2.3. Nanoparticelle testate.

Le nanoparticelle (NP) utilizzate per i saggi di tossicità sono state preparate e caratterizzate come descritto nei Paragrafi 5.3.1, e 5.4.1-5.4.8. Qui viene riportato solo il loro elenco: NP di silice [NP-Si], NP di oro – semini [NP-GS], NP di oro [NP-Au], NP di silice decorate con NP-GS [NP-Si)GS], NP di silice decorate con rodamina [NP-Si-RHOD], NP di silice decorate con rodamina ed eparina [NP-Si-RHOD/Hep], e NP di oro pegilate e decorate con molecole citotossiche [DNPC]. Inoltre, si sono testate delle NP lipidiche più comunemente distinte in nanoemulsione (NE) e nano-

capsule (NC) come tali o contenenti diversi farmaci (i.e., il paclitaxel, indicato nel testo come “Pacli”, e due molecole citotossiche denominate Azl 6 e Azl 38).

6.2.4. Protezione.

Gli esperimenti sono stati eseguiti indossando i necessari dispositivi di protezione individuale: camice, guanti monouso in nitrile e, durante il lavoro asettico, una maschera facciale. L'accesso al laboratorio è avvenuto sempre indossando calzature perfettamente pulite, o soprascarpe monouso.

6.2.5. Prodotti per la pulizia e disinfezione degli spazi appositi.

I prodotti utilizzati sono riportati nei Paragrafi 2.2, 3.2, e 4.2.

6.2.6. Materiale consumabile in plastica.

Il materiale in plastica che è stato utilizzato per HEKa, HEMa-LP, e Colo-38 è riportato, rispettivamente, nei Paragrafi 2.2, 3.2, e 4.2.

6.2.7. Materiale consumabile in vetro.

Oltre al materiale in vetro elencato nei Paragrafi 2.2, 3.2, e 4.2, per i test di tossicità sono state utilizzate delle apposite cuvette in vetro ed un adattatore per il fluorimetro (Turner Designs, n. cat. P/N 8000-931).

6.2.8. Strumenti.

Oltre agli strumenti elencati nei Paragrafi 2.2, 3.2, e 4.2, per i test di tossicità sono stati usati: un fluorimetro portatile (Turner Designs, modello: *PicoFluor*TM; ora venduto da Promega), un freezer (Ignis, modello: ICF221; -30°C), una microcentrifuga (Eppendorf, modello: Mini Spin Plus 5453), uno stereomicroscopio (Optika, modello: SZM-2; ingrandimento 7-45×), una stufa (Binder, modello: E28), dei tubi in policarbonato per ultracentrifuga (Beckman Coulter, n. cat. 3556CA), ed un'ultracentrifuga (Beckman Coulter, modello: OptimaTM MAX-XP; rotore: MLA-80, n. cat. 10U1208).

6.2.9. Analisi dei dati.

I dati sperimentali sono stati analizzati, ed opportunamente presentati utilizzando i seguenti programmi: Excel 97-2003 e Origin 6.0. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando lo Student's *t*-

test (per due popolazioni dispari) dove un $p \leq 0,05$ è stato considerato significativo (i risultati sono riportati nell'appendice).

6.3. Metodi

6.3.1. Sintesi delle NP

Le nanoparticelle utilizzate per gli esperimenti sono quelle elencate nel Paragrafo 6.2.3. La loro sintesi è stata descritta nel Paragrafo 5.3.1.

6.3.2. Sterilizzazione e pulizia del materiale e della strumentazione.

Le modalità ed i tempi di pulizia del materiale e della strumentazione sono riportati nei Paragrafi 2.2, 3.2, e 4.2. Oltre al materiale elencato precedentemente, per i test di tossicità è stato necessario anche pulire accuratamente le cuvette per il fluorimetro. Infatti, prima del loro utilizzo è stato verificato che sulle pareti interne ed esterne non ci fossero impronte, fibre naturali e/o artificiali, e polvere; laddove si è reso necessario, le stesse sono state pulite esternamente con un panno in microfibra bagnato con isopropanolo (70% v/v). Inoltre, dopo il loro utilizzo, le cuvette sono state svuotate del loro contenuto mediante aspirazione con pipetta Pasteur, riempite di isopropanolo (70% v/v), lasciate a contatto con lo stesso per 10 minuti, svuotate come precedentemente descritto, sciacquate con acqua di fonte, ed infine con acqua Milli-Q. Le cuvette sono state riposte in autoclave e sterilizzate (121°C, 15 minuti, 1 bar). In seguito, sono state fatte asciugare a RT, oppure in stufa (60-100°C).

6.3.3. Aliquotazione dei reagenti.

La maggior parte dei reagenti (e.g. terreni, supplementi) utilizzati è stata suddivisa in aliquote e conservata a -21°C (vedi Par. 2.2, 3.2, e 4.2). Oltre ai reagenti indicati nei paragrafi menzionati sopra, sono stati aliquotati anche i reagenti riportati nella Tabella 6.1. Si precisa che il CTB è stato aliquotato in ambiente non sterile in quanto nella confezione non è indicata la sua sterilità, e le sue aliquote sono state conservate a -27 - -30°C. Un consulto con il servizio tecnico della Promega ha poi chiarito che il prodotto viene filtrato (0,2 µm) alla fine del processo produttivo ma non in un ambiente assimilabile ad una camera bianca. Inoltre, non viene effettuato nessun controllo di qualità sulla effettiva sterilità, né sulla presenza di endotossine e piccoli virus (e.g. micoplasma) sul prodotto filtrato [16]. Considerando che i dati ottenuti sono risultati ripetibili nel tempo, si è ritenuto che le tre ore in cui tale colorante viene lasciato a contatto con le cellule non abbia generato una contaminazione biologica importante.

Tabella 6.1. Numero e volumi delle aliquote prodotte per confezione.

Campione	Volume originale (mL)	N. aliquote	mL/aliquota
CTB	100	10	10
pen/strep	100	20	5

6.3.4. Preparazione del terreno supplementato con aggiunta di pen/strep.

Ai terreni M254 e RPMI 1640, quando necessario, è stata aggiunta anche una soluzione di pen/strep. In seguito alla supplementazione del terreno (come descritto nei Par. 3.2 e 4.2), si sono aggiunti 5 mL di pen/strep, ottenendo un volume finale di 505 mL, per M254, e di 510 mL, per RPMI 1640. Infine, il terreno è stato filtrato. Nel terreno Epilife® la pen/strep non è stata mai aggiunta in quanto questo terreno contiene già, tra i suoi supplementi, una soluzione di gentamicina/anfotericina-b (si veda Par. 2.2).

6.3.5. Scongelo, semina, coltura e subcultura di un fenotipo cellulare.

Le cellule da noi utilizzate sono state coltivate come descritto nei Capitoli 2-4. L'espansione di ciascun fenotipo è stata necessaria per permettere l'ottenimento di un numero di cellule sufficiente ad espletare i test di tossicità che verranno descritti in questo capitolo.

6.3.6. Curva di calibrazione per la quantificazione della vitalità cellulare.

Prima di allestire i test di tossicità sono state preparate delle curve di calibrazione per ogni fenotipo cellulare. Pertanto, il numero di cellule è stato messo in correlazione con la fluorescenza letta al fluorimetro mediante l'utilizzo del CTB. Il protocollo per l'allestimento della curva di calibrazione, generalizzato per tutti i fenotipi cellulari da noi coltivati, è riportato di seguito. Qualsiasi variazione apportata per un singolo fenotipo verrà messa in evidenza. Se non altrimenti indicato, le cellule sono state sempre incubate a 37°C, 5% CO₂, e 100% di umidità relativa (RH) e coltivate in terreno ricostituito e non supplementato con pen/strep. Qui di seguito è riportato il protocollo per l'ottenimento delle curve di calibrazione.

Protocollo.

- 1- È stato calcolato il numero di cellule necessarie all'allestimento della curva di calibrazione. In generale, come concentrazione minima (n. cellule/cm²) è stata considerata quella corrispondente alla densità di semina utilizzata per la coltura cellulare, e come concentrazione massima quella ottenuta al momento della tripsinizzazione (n. cellule/cm²). Le curve di calibrazione

sono state costruite con un numero di punti pari ad un minimo di 5 (HEKa) e ad un massimo di 20 (Colo-38).

- 2- Le cellule contenute in una o più crio-vial sono state seminate nelle fiasche (Cap. 2-4). Il numero di cellule seminate è stato proporzionale al numero necessario per l'allestimento della curva. Si è tenuto in considerazione, a questo proposito, che tale numero aumenta durante il periodo di coltura. Pertanto, quando si è preparata la curva di calibrazione di lunedì mattina, le HEKa sono state seminate circa 7 giorni prima, le HEMa-LP circa 12 giorni prima, mentre per le Colo-38 è stato sufficiente seminare il venerdì prima. Il rispetto dei tempi di coltura dei singoli fenotipi cellulari ha fatto sì che al momento della tripsinizzazione le fiasche contenesero un numero cospicuo di cellule. I cambi di terreno si sono effettuati regolarmente, secondo protocollo. Nel caso delle Colo-38, se sono state seminate di venerdì mattina, si è proceduto al cambio del terreno il venerdì pomeriggio (è stato constatato che le Colo-38 impiegano circa 6 ore ad attaccarsi alla fiasca), dispensando, nelle fiasche, il 60% in più di terreno. La coltura è stata lasciata indisturbata per tutto il fine settimana.
- 3- Nel giorno prestabilito per l'esperimento si sono tripsinizzate le fiasche (Cap. 2-4) contenenti le cellule. Talvolta il numero di cellule raccolte è stato superiore a quello necessario per l'allestimento della curva; in questo caso, quelle in sovrappiù sono state congelate o mantenute in coltura, secondo le metodiche descritte nei Capitoli 2-4.
- 4- Dopo la subcultura, le cellule sono state contate e si sono preparate tante diluizioni cellulari quanti erano i punti della curva di calibrazione. Le diluizioni sono state preparate in tubi di plastica (4 mL) sterili. Il volume totale di ciascuna diluizione era di 2 mL (triplicato) o 2,5 mL (quadruplicato). In questo volume era contenuto un numero di cellule tale che in 500 μ L vi fossero quelle da seminare nei singoli pozzetti.
- 5- Per l'allestimento delle curve di calibrazione sono state utilizzate delle piastre da 24 pozzetti. Queste presentano sei colonne identificate dai numeri progressivi 1-6, e quattro file indicate con le lettere A-D. Pertanto, ad ogni singolo pozzetto corrisponde una lettera ed un numero. Prima di procedere alla semina nei pozzetti, è stato necessario scongelare un'aliquota di CTB, lasciandola a temperatura ambiente o immergendola brevemente nel bagno termostato a 37°C. La temperatura di utilizzo ottimale del reagente è quella ambiente, come riportato nel protocollo Promega [1]. Il CTB è sensibile alla luce, quindi è stato maneggiato con le dovute precauzioni.
- 6- La semina delle cellule nei pozzetti è avvenuta in questo modo: nella prima colonna a sinistra (pozzetti A1-C1 o A1-D1) si è pipettato solo terreno (500 μ L/pozzetto), che è servito da bianco. Nelle cinque colonne successive (A2-C2 o A2-D2, e seguenti) si sono pipettate concentrazioni crescenti di cellule, in triplicato o in quadruplicato (solo per le Colo-38). Nel caso delle

HEMA-LP, i tre punti corrispondenti alla concentrazione più alta sono stati seminati nei pozzetti D2-D4. Le concentrazioni dei punti delle curve sono riassunti nella Tabella 6.2.

- 7- Al termine della semina, la piastra è stata fatta ondeggiare (10 sec) evitando schizzi sulle pareti dei pozzetti e sul coperchio, per permettere alle cellule di disporsi uniformemente nella superficie di ciascun pozzetto.

Tabella 6.2. Curve di calibrazione CTB

Campioni	Piastra n.	Heka		Hema		Colo-38	
		n. cell/pz	pozzetti	n. cell/pz	pozzetti	n. cell/pz	pozzetti
1	1	0	A1-C1	0	A1-C1	0	A1-D1
2	1	5.000	A2-C2	5.000	A2-C2	50.000	A2-D2
3	1	10.000	A3-C3	10.000	A3-C3	100.000	A3-D3
4	1	20.000	A4-C4	15.000	A4-C4	120.000	A4-D4
5	1	40.000	A5-C5	20.000	A5-C5	150.000	A5-D5
6	1	80.000	A6-C6	25.000	A6-C6	170.000	A6-D6
7	1			30.000	D2-D4		
8	2					0	A1-D1
9	2					200.000	A2-D2
10	2					225.000	A3-D3
11	2					250.000	A4-D4
12	2					275.000	A5-D5
13	2					300.000	A6-D6
14	3					0	A1-D1
15	3					325.000	A2-D2
16	3					350.000	A3-D3
17	3					375.000	A4-D4
18	3					400.000	A5-D5
19	3					450.000	A6-D6
20	4					0	A1-D1
21	4					500.000	A2-D2
22	4					550.000	A3-D3
23	4					600.000	A4-D4
24	4					700.000	A5-D5
25	4					800.000	A6-D6

- 8- Successivamente, 80 µL di CTB sono stati pipettati in ciascun pozzetto, evitando schizzi sulle pareti interne dei pozzetti e sul coperchio della piastra, cosa che avrebbe determinato la

perdita di una certa quantità del reagente e quindi una sottostima del numero di cellule metabolicamente attive. Quando sono state riscontrate delle gocce di CTB sulle pareti interne del pozzetto o nella parte interna del coperchio, queste sono state accompagnate fino al fondo del pozzetto con l'utilizzo di un puntale pulito, nel primo caso, o aspirate, nel secondo caso. L'ordine seguito nel dispensare il CTB è stato A1-D1, A2-D2, etc.

- 9- È stato ripetuto quanto descritto al punto 7.
- 10- La piastra (o le piastre) è stata incubata per 3 h.
- 11- Al termine del periodo di incubazione, le piastre sono state riposte su un bancone ben pulito e disinfettato con isopropanolo (70% v/v). Da questo momento in poi, si è lavorato con una luce soffusa ed in ambiente non sterile.
- 12- Il contenuto di ciascun pozzetto è stato aspirato con una micropipetta e versato in microtubo da centrifuga, non sterile, da 1,5 mL.
- 13- I microtubi sono stati poi centrifugati a 180 g, per 7 minuti, e a 20°C.
- 14- Successivamente, il surnatante è stato separato dal pellet e riposto in un altro microtubo, riportante la stessa sigla. Per comodità, infatti, questi microtubi sono stati contrassegnati con il codice alfanumerico del pozzetto (e.g., A1, A2, etc.).
- 15- A questo punto è stata letta la fluorescenza del surnatante. Il fluorimetro è stato impostato nel seguente modo: canale "RHOD" (i.e., rodamina), e <STD VAL> = 100.
- 16- Il surnatante di ciascun campione è stato trasferito, con una pipetta Pasteur da 150 mm, in una cuvetta in vetro. La cuvetta è stata inserita nel fluorimetro, è stata letta la fluorescenza del campione, ed il corrispondente valore è stato annotato in un quaderno.
- 17- Solamente per le Colo-38, a volte, si è verificato che i campioni con concentrazione più alta di cellule sono risultati "OVER" al fluorimetro. Pertanto, non di tutti i campioni è stato possibile ottenere la fluorescenza con una lettura tal quale. Di conseguenza, si è pensato di diluire tutti i campioni con del terreno fresco. Le diluizioni sono state effettuate mantenendo un rapporto campione:terreno di 1:4 (i.e., 1/4 della concentrazione iniziale del campione). Di conseguenza le curve di calibrazione allestite per le Colo-38 sono state due: una derivante dalla lettura dei campioni tal quali, e l'altra derivante dalla lettura dei campioni diluiti.
- 18- Infine, i valori di fluorescenza sono stati normalizzati, sottraendo il valore ottenuto dalla media dei bianchi di ciascuna piastra, anche nel caso delle Colo-38. I dati sono stati inseriti su Origin, ed è stato costruito il grafico della curva di calibrazione, disponendo nell'asse delle ascisse il "numero di cellule per pozzetto", e in quella delle ordinate la "fluorescenza", espressa in unità arbitrarie (u.a.).

6.3.7. Minima dose efficace.

Questo esperimento è stato eseguito per capire quale fosse la dose minima di NP che potesse esplicare il suo effetto tossico sulle cellule cancerogene. In breve, le Colo-38 e le HEMa-LP sono state esposte per 24 - 48 h a diverse diluizioni di NP. Le HEKa non sono state utilizzate per eseguire questo test, ma sono state scelte le HEMa-LP in quanto, tra i tre fenotipi cellulari utilizzati, sono quelle a crescita più lenta. Generalmente, questi esperimenti sono stati condotti prima con le Colo-38 e poi con le HEMa-LP. Ciò ha permesso di limitare il numero di dosi testate con i melanociti (Tab. 6.3). Si evidenzia che oltre alle formulazioni nanoparticellari sono stati testati i diversi lotti del rivestimento ("C" in Tab. 6.3) utilizzato per ricoprire le NP-Au. Si è proceduto come descritto nel protocollo che segue. Se non altrimenti indicato, il terreno ricostituito è stato sempre utilizzato previa equilibratura. Le cellule sono state sempre incubate a 37°C, 5% CO₂, e 100% RH, e coltivate con terreni ricostituiti. Solo per le prove con NP-Si)RHOD e per le NP-Si)RHOD/Hep, il terreno è stato supplementato con pen/strep. L'aspirazione del terreno dai pozzetti è avvenuta utilizzando una pipetta Pasteur collegata ad una pompa da vuoto, che ha riversato i liquidi biologici di scarto in uno scarico.

Protocollo.

- 1- Si è proceduto come descritto nei punti 2, 3, e 5 del Paragrafo 6.3.6.
- 2- È stato calcolato il numero di cellule necessario ad allestire l'esperimento, tenendo presente che per ogni tipo di NP da testare sono stati necessari 6 - 24 pozzetti di una piastra da 24, e che in ogni pozzetto si sarebbero dovuti dispensare un numero di cellule pari alla densità di semina moltiplicata per la superficie del pozzetto (i.e., 1,9 cm²). In realtà, per quanto riguarda le HEMa-LP, sono state seminate 10.000 cellule in ogni pozzetto, anziché 9.500. Il numero di cellule è stato arrotondato per una maggiore semplicità nei calcoli. Per le Colo-38, invece, sono state seminate 50.000 cellule in ogni pozzetto (Cap. 4).
- 3- Le cellule sono state diluite in un volume di terreno ricostituito (con o senza pen/strep) tale che in 500 µL fossero presenti 10.000 cellule (HEMa-LP) o 50.000 cellule (Colo-38).
- 4- Dopo un'accurata ridispersione, 500 µL di sospensione cellulare sono stati pipettati in ciascun pozzetto della piastra.
- 5- Al termine della semina, la piastra è stata fatta ondeggiare delicatamente per circa 10 secondi, affinché le cellule si disponessero uniformemente sulla superficie del pozzetto.
- 6- La fiasca è stata incubata per 20 h.
- 7- Prima di procedere alla preparazione delle diluizioni delle NP da dispensare nelle piastre, le formulazioni (Tab. 6.3) sono state ridisperse accuratamente (bagnetto a ultrasuoni o agitazio-

ne manuale), e la loro corretta ridispersione è stata sempre controllata allo stereomicroscopio, riponendo una goccia della dispersione in un vetrino da orologio.

Laddove il mezzo disperdente della formulazione non fosse acquoso, un'aliquota omogeneamente dispersa delle NP è stata centrifugata ed il pellet ridisperso in un eguale volume di acqua Milli-Q (Tab. 6.3).

Tabella 6.3. Differenze nella preparazione delle diluizioni delle NP testate con le Colo-38 ed Hema-LP.

Formulazione		TQ		n. diluizioni	
Acronimo	Mezzo disp.	Centrifugazione	Mezzo di Ridispers	Colo-38	HEMa-LP
NP-Si	Et-OH	14.100 g, 10 min	H ₂ O Milli-Q sterile	20	5
NP-GS	H ₂ O dist.	×	×	20	5
NP-Si)GS*	H ₂ O Milli-Q	×	×	10 / 20	5
C	n.a.	×	×	10	×
NC Pacli	H ₂ O Milli-Q	×	×	20	5
NC Azl 6	H ₂ O Milli-Q	×	×	20	5
NC Azl 38	H ₂ O Milli-Q	×	×	20	5
NE Pacli	H ₂ O Milli-Q	×	×	20	5
NE Azl 6	H ₂ O Milli-Q	×	×	20	5
NE Azl 38	H ₂ O Milli-Q	×	×	20	5
NP-Si-R [§]	H ₂ O dist.	13.523 g, 11 min., 20°C	H ₂ O Milli-Q sterile	19	20
NP-Si-R/Hep [§]	H ₂ O dist.	13.523 g, 11 min., 20°C	H ₂ O Milli-Q sterile	19	20

8- Le diluizioni sono state preparate con terreno ricostituito. L'antibiotico è stato aggiunto solo per i test con NP-Si)RHOD e NP-Si)RHOD/Hep (indicate rispettivamente con NP-Si-R e NP-Si-R/Hep in Tab. 6.3). Il campione non diluito (i.e., TQ) è stato sempre indicato con D1, mentre con D2 è stato indicato il campione la cui concentrazione era dimezzata rispetto a 1, e con D3 quello con concentrazione pari a ¼ di D1, e così via, fino ad ottenere 20 campioni. Questo modus operandi sarà indicato nel testo con "diluizioni seriali" e le corrispondenti diluizioni TQ o D1, D2, D3, etc.

Le diluizioni sono state preparate in modo seriale per le NP-Si, le NP-GS, le NP-Si)GS, le NP-Si-RHOD, e le NP-Si-RHOD/Hep, sia nei test con le HEMa-LP che in quelli con le Colo-38. Le diluizioni di NC ed NE, invece, sono state preparate in modo seriale solamente per i test con le Colo-38; nei test con le HEMa-LP sono state scelte soltanto le 5 diluizioni (non seriali) che si erano mostrate più efficaci nel saggio con le cellule tumorali.

Per quanto riguarda, infine, il campione C, sono state preparate 3 diluizioni con rapporto campione:terreno di 1:1000, 1:800, e 1:600 (rispettivamente: 1, 1,25, e 1,67 µL/mL). A par-

tire dalla diluizione 1:800, poi, sono state preparate 7 diluizioni seriali (indicate con gli acronimi C-Dx). In totale, quindi, sono state ottenute 10 diluizioni.

- 9- Al termine del periodo di incubazione delle cellule, prima si è osservata la piastra al microscopio invertito, per avere conferma del perfetto stato di salute delle cellule. Poi si sono pipettati asetticamente 100 µL della dispersione particellare o della soluzione da testare in ogni pozzetto, secondo quanto qui riassunto. Per le diluizioni delle NP sono stati usati i seguenti pozzetti: diluizioni D1-D5 pozzetti A2-A6, diluizioni D6-D10 pozzetti B2-B6, diluizioni D11-D15 pozzetti C2-C6, e diluizioni D16-D20 pozzetti D2-D6. Per le diluizioni della sostanza C sono stati usati i pozzetti A2-A6 per le prime cinque diluizioni ed i pozzetti B2-B6 per le successive diluizioni. Infine, nella prima colonna della piastra (pozzetti A1-D1 per le NP, A1-B1 per la sostanza C), le cellule non sono state messe a contatto con le NP, pertanto questi pozzetti sono serviti da bianco.

Nel caso dei test di NP-Si-RHOD e NP-Si-RHOD/Hep con le Colo-38, sono state preparate 19 diluizioni, e non 20, in quanto il campione TQ è stato seminato due volte nella piastra. Per un TQ, è stato seguito il protocollo tradizionale (si veda oltre, punti 12-16 di questo protocollo), mentre per l'altro TQ non è stato effettuato il cambio di terreno, né la centrifuga prima della lettura della fluorescenza. Il risultato di questa prova è discusso nel Paragrafo 6.4.2.3. In ogni caso, dopo la semina delle NP e rispettive diluizioni la piastra è stata fatta oscillare come descritto nel punto 5 di questo protocollo.

- 10- La piastra è stata incubata per 24 h.
- 11- Al termine di questo periodo di tempo, la piastra è stata osservata nuovamente al microscopio invertito ed è stato verificato lo stato di salute delle cellule dopo 24 h di esposizione alle NP.
- 12- A questo punto, nelle piastre in cui il tempo di esposizione delle cellule alle NP era di 24 h, è stato asetticamente aspirato il contenuto di ogni pozzetto. Questo è servito a rimuovere le NP dal pozzetto e, quindi, a porre fine alla loro azione tossica. La rimozione del terreno è stata compiuta con molta delicatezza, aspirando il liquido dal bordo del pozzetto, con una pipetta Pasteur, senza che questa venisse poggiata sul fondo e potesse, quindi, aspirare anche le cellule.
- 13- In ogni pozzetto sono stati poi pipettati 500 µL di terreno ricostituito. La fiasca è stata fatta oscillare per 10 secondi. Con questo terreno si sono volute lavare le cellule, rimuovendo eventuali residui di NP. Il terreno di lavaggio è stato aspirato, infine, con una pipetta Pasteur, usando le stesse precauzioni descritte al punto 13.
- 14- A questo punto sono stati pipettati, in ciascun pozzetto, 500 µL di terreno ricostituito (con o senza pen/strep).

- 15- La piastra è stata osservata al microscopio invertito, per verificare che le cellule non avessero cambiato in numero o aspetto. È stato osservato anche lo stato di salute delle cellule dopo la rimozione delle NP.
- 16- Sono stati dispensati 80 μ L di CTB in ciascun pozzetto. L'ordine con cui il terreno ed il reagente sono stati pipettati nella piastra è stato sempre lo stesso. In questi esperimenti si è partiti dai pozzetti A1-A6, si è proseguito con i B2-B6, e così via. La piastra è stata nuovamente fatta oscillare per circa 10 secondi, poi è stata incubata per 3 h.
- 17- Nelle piastre, invece, in cui l'esposizione delle cellule alle NP è durata 48 h (i.e., test su HEMa-LP di NP-GS, NP-Si, NP-Si)GS, NC/NE Pacli, NC/NE Azl 38, ed NC/NE Azl 6), non sono stati effettuati i cambi di terreno e l'incubazione si è semplicemente protratta per ulteriori 24 h. Successivamente si è proceduto come descritto nei punti 12-16.
- 18- Nel caso in cui, invece, si sia voluta somministrare una seconda dose di NP (i.e., test su HEMa-LP di NP-GS, NP-Si, NP-Si)GS, NC/NE Pacli, NC/NE Azl 38, ed NC/NE Azl 6), si è proceduto come descritto ai punti 13-16, e poi 9. Dopo l'aggiunta della seconda dose, la piastra è stata agitata lievemente, poi incubata per 24 h. Al termine di questo periodo di tempo, si è proceduto, nuovamente, come descritto ai punti 12-16.
- 19- In tutti i casi, al termine delle 3 h di reazione, si è proceduto come descritto nei punti 12-17 del paragrafo 5.3.6.
- 20- Basandosi sulla curva di calibrazione di riferimento è stato calcolato il numero (e la percentuale) di cellule vitali per ogni diluizione utilizzata. A questo punto si sono scelte le cinque concentrazioni di NP da utilizzare nei test di tossicità a tempo.

6.3.8. Test di tossicità a tempo - cellule e NP.

Le cinque diluizioni di NP scelte sono state testate sulle cellule. Si è deciso di esporre le cellule alla prima dose di NP per 8, 24, e 48 h, e poi ad una seconda dose per altre 24 h. Il tempo totale per allestire ed eseguire questo esperimento è stato di 5 giorni. Il protocollo è descritto qui sotto. Se non altrimenti indicato, il terreno ricostituito è stato sempre utilizzato previa equilibratura. La soluzione di pen/strep è stata aggiunta ai terreni M254 e RPMI. L'aspirazione del terreno dai pozzetti è avvenuta mediante pipetta Pasteur collegata ad una pompa da vuoto, che ha riversato i liquidi biologici di scarto in uno scarico. Le cellule sono state sempre incubate a 37°C, 5% CO₂, e 100% RH.

Protocollo.

- 1- Si è proceduto come descritto al punto 2 del Paragrafo 6.3.6.

- 2- Il lunedì mattina si sono staccate le cellule dalle fiasche, e si è calcolato il numero di cellule necessarie per l'esperimento, tenendo conto che, per ogni tipo di NP, sarebbero state necessarie 4 piastre da 24 pozzetti. Solitamente è stato testato il triplicato di ciascuna diluizione.
- 3- Le cellule sono state diluite in un volume di terreno ricostituito e contenente antibiotici tale che in 500 μ L fossero presenti 5.000 cellule nel caso delle HEKa, 10.000 nel caso delle HEMa-LP, e 50.000 nel caso delle Colo-38.
- 4- Sono stati pipettati 500 μ L di dispersione cellulare in ciascun pozzetto della piastra, seguendo l'ordine A1-D1, A2-D2 e così via.
- 5- Al termine della semina, la piastra è stata fatta ondeggiare delicatamente, per circa 10 secondi, per permettere alle cellule di disporsi uniformemente sulla superficie del pozzetto.
- 6- Il lunedì pomeriggio sono state preparate le 5 diluizioni di NP da testare. Per risospendere il pellet del campione D1 è stata usata sempre acqua Milli-Q sterile, mentre per operare le altre diluizioni è stato usato terreno ricostituito e contenente antibiotici. I campioni D1 di NC ed NC-Pacli, disperse in mezzo acquoso, sono stati usati tal quali previa ridispersione. Le diluizioni sono state preparate in tubi in plastica, sterili, da 4 mL, e sono state conservate a 4°C, e al buio, fino al loro utilizzo.
- 7- Il martedì mattina si sono controllate le piastre al microscopio invertito per verificare lo stato di salute delle cellule.
- 8- Alle 9 a.m. si è proceduto con l'aggiunta di 100 μ L di diluizione nanoparticellare in ciascun pozzetto, nelle 4 piastre (una per tempo di incubazione). Le diluizioni sono state pipettate con lo stesso ordine seguito per la semina delle cellule, ovvero quello riportato al punto 4 di questo protocollo. Le diluizioni D1-D5 sono state dispensate in triplicato o quadruplicato, come riportato nella Tabella 6.4. I pozzetti A1-C/D1 non contengono NP e serviranno da bianco (BK in Tab. 6.4).

Tabella 6.4. Rappresentazione schematica della localizzazione delle 5 diluizioni nella piastra da 24 pozzetti.

	1	2	3	4	5	6
A	BK	D1	D2	D3	D4	D5
B	BK	D1	D2	D3	D4	D5
C	BK	D1	D2	D3	D4	D5
D	BK	D1	D2	D3	D4	D5

- 9- Le piastre sono state agitate per circa 10 secondi, e poi riposte nell'incubatore.
- 10- Dopo 8 h di incubazione, la piastra 1 ("8 h") è stata osservata al microscopio invertito, per verificare lo stato di salute delle cellule. Successivamente è stata riposta nella cappa a flusso laminare.

- 11- Si è proseguito come descritto ai punti 12-19 del Paragrafo 6.3.7.
- 12- I valori di fluorescenza sono stati normalizzati sottraendo la media dei valori del bianco – terreno ottenuti alle 8 h (Par. 6.3.10).
- 13- Il mercoledì mattina, la piastra 2 (“24 h”) è stata osservata al microscopio invertito.
- 14- Si è proseguito come descritto ai punti 12-19 del Paragrafo 6.3.7.
- 15- I valori di fluorescenza ottenuti sono stati normalizzati sottraendo i valori del bianco – terreno 24 h (Par. 6.3.10).
- 16- Quando si sono ottenuti dei valori di fluorescenza “OVER” (Colo-38), i campioni sono stati diluiti con terreno ricostituito e supplementato con pen/strep, non equilibrato, mantenendo un rapporto campione:terreno di 1:4.
- 17- I valori di fluorescenza sono stati normalizzati sottraendo la media dei valori del bianco – terreno ottenuti alle 24 h (Par. 6.3.10).
- 18- Il mercoledì pomeriggio si sono preparate, inoltre, le diluizioni da dispensare nella piastra 4, come “seconda dose”. Per la preparazione delle diluizioni si è proceduto come indicato al punto 6 di questo protocollo.
- 19- Il giovedì mattina la piastra 3 (“48 h”) è stata osservata al microscopio invertito.
- 20- Si è proceduto seguendo quanto descritto ai punti 12-19 del Paragrafo 6.3.7.
- 21- Quando si sono ottenuti dei valori di fluorescenza “OVER” (Colo-38), i campioni sono stati diluiti con terreno ricostituito e supplementato con pen/strep, non equilibrato, mantenendo un rapporto campione:terreno di 1:4.
- 22- I valori di fluorescenza sono stati normalizzati sottraendo la media dei valori del bianco – terreno ottenuti alle 48 h (Par. 6.3.10).
- 23- Sempre il giovedì mattina, anche la piastra 4 (“72 h”) è stata osservata al microscopio. Si è seguito il procedimento descritto ai punti 12-15 del Paragrafo 6.3.7.
- 24- Sono stati pipettati 100 μ L di diluizione nanoparticellare nei pozzetti, secondo lo schema riportato nella Tabella 6.4.
- 25- La piastra 4 è stata incubata per ulteriori 24 h.
- 26- Il venerdì mattina, al termine delle 72 h di esposizione alle NP, la piastra 4 è stata osservata al microscopio invertito per verificare lo stato di salute delle cellule.
- 27- Si è seguito, come per le alte piastre, il procedimento riportato ai punti 12-19 del paragrafo 6.3.7.
- 28- Quando si sono ottenuti dei valori di fluorescenza “OVER” (Colo-38), i campioni sono stati diluiti con terreno ricostituito e supplementato con pen/strep, non equilibrato, mantenendo un rapporto campione:terreno di 1:4.

- 29- I valori di fluorescenza sono stati normalizzati sottraendo la media dei valori del bianco – terreno ottenuti alle 48 h (Par. 6.3.10).
- 30- Le fluorescenze ottenute sono state sottratte del valore del bianco ottenuto come descritto nel Paragrafo 6.3.10. Successivamente i dati sono stati analizzati e modellizzati con il programma Origin. È stato costruito un grafico disponendo nell’asse delle ascisse il “Tempo”, espresso in ore, di durata dell’intero esperimento, e nell’asse delle ordinate il “Numero di cellule vive per pozzetto”, calcolato a partire dalla curva di calibrazione di riferimento, o la “Percentuale di cellule vive per pozzetto”, calcolata a partire dal numero di cellule.

Per effettuare i test di tossicità a tempo, utilizzando le NP-Si-RHOD e le NP-Si-RHOD/Hep, è stato seguito il protocollo appena descritto, ma il tempo di esposizione delle cellule (solo HEMa-LP e le Colo-38) alle NP è stato soltanto di 24 ore. Inoltre, in questo caso è stato testato soltanto il campione D1 delle NP (centrifugato e risospeso, come da Tab. 6.3).

Per quanto riguarda, invece, gli esperimenti con le NP lipidiche, queste sono state testate solo con le Colo-38, e soltanto le NC e le NC Pacli sono state sottoposte ad un saggio di tossicità completo (72 h, 4 tempi, 2 dosi). Le altre formulazioni (Tab. 6.3) sono state esposte solo ad una dose e per 24 h (Colo-38), o per 24-48 h, ed 1-2 dosi (HEMa-LP) negli esperimenti di “Minima dose efficace” (Par. 6.3.7).

Per effettuare i test di tossicità a tempo, utilizzando le DNPC, è stato seguito il protocollo descritto ai punti 1 – 30. Sulle DNPC sono stati coniugati due diversi farmaci, s-Azl 6 ed s-Azl 38, utilizzando per ognuno due concentrazioni iniziali, indicate in questo capitolo con C1 e C2 (corrispondenti a 1:275 e 1:1100, Cap. 5). Pertanto, se le molecole si fossero coniugate completamente alle DNPC, avremmo avuto che C1 DNPC e C2 DNPC in Tabella 6.5 corrisponderebbe a 18,18 µg/mL e 4,55 µg/mL. Le due molecole citotossiche sono state testate anche in soluzione (1:1) con la sostanza C (D+C, in Tab. 6.5). In questo caso, le concentrazioni C1 e C2 di D+C corrispondono a 0,6656 µg/mL della sostanza C (provetta 17, vedi Cap. 5) e rispettivamente a 18,18 (C1) e 4,54 (C2) µg/mL di entrambe le molecole citotossiche.

Tabella 6.5. Rappresentazione schematica della localizzazione delle DNPC nella piastra.

	1	2	3	4	5	6
A	BK	C1 DNPC	C2 DNPC	C1 D+C	C2 D+C	
B	BK	C1 DNPC	C2 DNPC	C1 D+C	C2 D+C	
C	BK	C1 DNPC	C2 DNPC	C1 D+C	C2 D+C	
D	BK	C1 DNPC	C2 DNPC	C1 D+C	C2 D+C	

Lo schema di allestimento della piastra per il test, è stato lo stesso per DNPC contenenti i due farmaci, ed è riportato nella Tabella 6.5. Le cellule seminate nella prima riga della piastra sono state esposte alle DNPC per 8 h, quelle nella seconda riga per 24 h, quelle nella terza per 48 e quelle della quarta riga per 72 h, e due dosi di farmaco.

6.3.9. Test di tossicità a tempo – mezzo disperdente della formulazione nanoparticellare.

I tre fenotipi cellulari sono stati esposti al mezzo in cui sono disperse le diverse NP testate. Questo esperimento è stato effettuato con lo scopo di verificare se la tossicità esplicita sulle cellule era dovuta alle NP, o al mezzo in cui sono disperse. Il mezzo disperdente varia con le NP e con la loro diluizione. Se si considera la diluizione D1, al momento della loro aggiunta in piastra, si trovano disperse in acqua Milli-Q le seguenti NP: NP-Si, NP-Si)GS, NP-Si-RHOD, NP-Si-RHOD/Hep, DNPC, NC/NE, NC/NE Pacli, NC/NE Azl 6, e NC/NE Azl 38. Le particelle NP-GS, invece, sono state utilizzate disperse nel loro mezzo originario, il quale si suppone che possa contenere dei residui della reazione di sintesi delle NP (si veda Par. 5.3.1.4).

Pertanto, questi esperimenti sono stati effettuati esponendo le cellule ad H₂O Milli-Q sterile, ed al surnatante ottenuto dopo ultracentrifugazione (48.000 rpm, 159.800 g, 1 h, 4°C) delle NP-GS. L'H₂O Milli-Q ed il surnatante delle NP-GS sono stati diluiti con terreno ricostituito e contenente antibiotici e testati in 5 diverse diluizioni. Un'eccezione è rappresentata dal test in cui le HEMa-LP sono state esposte al mezzo in cui sono disperse le NP-GS: in questo caso è stato testato solamente il campione D1. Per l'attuazione di questi esperimenti è stato seguito fedelmente il protocollo riportato nel Paragrafo 6.3.8. È stato allestito, quindi, un set di quattro piastre per ogni fenotipo cellulare, e per entrambi i mezzi disperdenti.

6.3.10. Test di tossicità a tempo - terreni.

Questo esperimento, simile a quello descritto nel Paragrafo 6.3.8, si è pensato fosse utile per verificare se la fluorescenza dei terreni potesse variare nel tempo. I terreni ricostituiti, senza aggiunta di antibiotico (tranne per il terreno Epilife[®] che contiene già antibiotico tra i suoi supplementi), sono stati tenuti in incubazione con le tempistiche descritte nel Paragrafo 6.3.8. In ogni pozzetto sono stati dispensati 500 µL di terreno.

I terreni utilizzati per la coltura dei tre fenotipi cellulari sono stati dispensati ciascuno in una piastra, in quadruplicato. Nei pozzetti A1-D1 il terreno scelto è stato incubato per 8 h, quello nei pozzetti A3-D3 per 24 h, quello nei pozzetti A5-D5 per 48 h, ed infine quello nei pozzetti A6-D6 per 72 h. Il numero di ore indicato, corrisponde alle ore di esposizione delle cellule alle NP nei test di tossicità a tempo. Infatti, i dati di questo esperimento sono stati presi come bianco da sottrarre a

tutti i valori di fluorescenza (corrispondenti per ore di incubazione e tipo di terreno) derivanti dagli esperimenti di esposizione delle cellule alle NP nei test di tossicità a tempo. Pertanto, e.g. la media dei bianchi alle “8 h” è quella che è stata sottratta ai valori di fluorescenza derivanti dai test di tossicità (Par. 6.3.8 e 6.3.9) alle 8 h, e così via per tutti i tempi di incubazione.

Il protocollo per l'esecuzione di questo esperimento è riportato di seguito. Se non altrimenti indicato, il lavoro è stato eseguito in modo asettico.

Protocollo.

- 1- Il lunedì mattina si sono pipettati i terreni nelle piastre. L'orario in cui i terreni sono stati dispensati nei pozzetti è stato il più simile possibile all'orario in cui, nel saggio di tossicità, sono state seminate le cellule. Orientativamente, l'1 p.m.
- 2- Il martedì, nel tardo pomeriggio, le piastre sono state spostate dall'incubatore alla cappa a flusso laminare, previa osservazione dei pozzetti al microscopio invertito, per verificare l'assenza di eventuali contaminazioni.
- 3- Il terreno nei pozzetti A1-D1 (8 h) è stato aspirato con una pipetta Pasteur; sono stati dispensati 500 μ L di terreno in ogni pozzetto come lavaggio; successivamente, sono stati di nuovo pipettati 500 μ L di terreno in ogni pozzetto, ed infine 80 μ L di CTB. Dopo un'incubazione di 3 h, la piastra è stata trasferita nuovamente sotto la cappa. I campioni di terreno e CTB, infatti, sono stati prelevati sempre sterilmente, affinché il terreno presente negli altri pozzetti della piastra non si contaminasse nei giorni successivi.
- 4- Il mercoledì e il giovedì si è seguito lo stesso procedimento descritto al punto 2 e 3 di questo protocollo, rispettivamente per i pozzetti A3-D3 (24 h) e A5-D5 (48 h).
- 5- Il giovedì, inoltre, il terreno presente nei pozzetti A6-D6 (72 h) è stato aspirato, aggiunto il terreno per il lavaggio dei pozzetti, e poi aggiunto terreno (sempre 500 μ L) e 80 μ L di CTB. I campioni con il terreno ed il CTB nei pozzetti A6-D6 sono stati prelevati in ambiente non sterile.
- 6- Acquisite le fluorescenze di tutti i campioni, è stata calcolata la media dei dati ottenuti alle 8, 24, 48, e 72 h.
- 7- I valori di fluorescenza così ottenuti sono stati usati come “bianco” nei test di tossicità (Par. 6.3.8-6.3.9).

6.3.11. Test di tossicità a tempo - terreni e NP.

Si è ritenuto opportuno anche verificare l'eventuale fluorescenza delle NP in terreno, per valutare se questa potesse influire sui risultati di fluorescenza ottenuti in presenza delle cellule. In questo esperimento sono state testate solamente la diluizione D1 (i.e., TQ), e la D5. Sono state scelte que-

ste due diluizioni in quanto sono, rispettivamente, quella con concentrazione maggiore e minore di NP. Pertanto, una eventuale fluorescenza, se riscontrata nella D5, avrebbe indicato una fluorescenza anche nei campioni più concentrati. Il D1, al contrario, se non avesse dato fluorescenza avrebbe indicato una non-fluorescenza anche degli altri campioni. Si sono testate le NP-Si, le NP-GS, le NP-Si)GS, le NP-Si-RHOD, e le NP-Si-RHOD/Hep.

Per il test con NP-Si, NP-GS, e NP-Si)GS l'esperimento è stato allestito utilizzando quattro piastre, una per tempo di esposizione, per ogni tipo di terreno (supplementato con antibiotici). Le piastre sono state allestite in questo modo. Nella prima riga, nei pozzetti A1-A3 non sono state aggiunte le formulazioni nanoparticellari. Nella seconda riga, nei pozzetti B1-B3 e B4-B6 sono state successivamente aggiunte le NP-Si D1 e D5. Nella terza riga, nei pozzetti C1-C3 e C4-C6 sono state successivamente aggiunte le NP-GS D1 e D5. Infine, nella quarta riga, nei pozzetti D1-D3 e D4-D6 sono state successivamente aggiunte le NP-Si)GS D1 e D5.

Il protocollo per questo esperimento rispecchia esattamente quello descritto per i test di tossicità cellulare, nel Paragrafo 6.3.8, eccetto che per la parte di subcultura e semina delle cellule (punti 1-5 del protocollo). Nelle 4 piastre allestite per ciascun terreno da testare è stato aggiunto il CTB alle 8 h, in piastra 1, alle 24 h, in piastra 2, alle 48 h, in piastra 3, e alle 72 h (dopo l'aggiunta della seconda dose) in piastra 4. Si è proceduto infine come indicato nei precedenti protocolli (punti 5-17, Par. 6.3.6). I valori di fluorescenza sono stati normalizzati sottraendo il valore della media dei bianchi.

Inoltre, è stata anche verificata la fluorescenza del terreno e delle NP per accertarsi che le NP non avessero una fluorescenza intrinseca tale da poter influenzare i valori ottenuti nei saggi di tossicità. È stata misurata la fluorescenza anche dell'acqua Milli-Q utilizzata per gli esperimenti. Per fare ciò, un'aliquota di ciascun campione è stata semplicemente pipettata all'interno di una cuvetta in vetro per il fluorimetro (riempita con un volume minimo di 75 μ L), ed è stata letta la fluorescenza. In particolare, i campioni analizzati sono riportati nella Tabella 6.6.

L'acqua Milli-Q, i terreni supplementati ed i GS sono stati utilizzati tal quali. Inoltre, è stata verificata la fluorescenza del terreno di coltura in presenza dei GS: in questo caso, i GS sono stati diluiti 1:2 in terreno.

Per quanto riguarda, invece, le NP-Si-RHOD e le NP-Si-RHOD/Hep, esse sono state testate soltanto con i terreni M254 e RPMI ricostituiti, e supplementati con pen/strep. Il motivo per cui non è stato utilizzato anche il terreno Epilife[®] risiede nel fatto che le HEKa non sono state esposte a queste NP. Per questi due tipi di NP, il tempo di incubazione col terreno è stato solamente di 24 h. Di queste NP è stato testato solamente il D1, utilizzando una piastra per le NP-Si-RHOD e una per le NP-Si-RHOD/Hep.

Tabella 6.6. Campioni di cui è stata letta la fluorescenza.

Campione	Concentrazione
H ₂ O Milli-Q	TQ
RPMI 1640 suppl.	TQ
M254 suppl.	TQ
Epilife [®]	TQ
RPMI suppl. + GS	1:2
M254 suppl. + GS	1:2
Epilife [®] suppl. + GS	1:2
GS	TQ

Le NP sono state testate con i loro rispettivi bianchi in triplicato, e seguendo tre protocolli. Per i campioni indicati nella sezione dei risultati con BK1 e TQ1 è stato seguito il protocollo tradizionale (i.e., lavaggio con terreno prima dell'aggiunta del CTB, e centrifuga del campione dopo le 3 h di incubazione con il CTB). Nei campioni che saranno indicati come BK2 e TQ2, non è stato aggiunto il CTB, ed inoltre questi non hanno subito né il lavaggio né la centrifuga, ma, semplicemente, il campione è stato prelevato dal pozzetto ed è stata letta la sua fluorescenza. Infine, nei campioni che saranno indicati come TQ3 non è stato aggiunto il CTB, ma sono stati effettuati sia il cambio di terreno sia la centrifuga, prima della lettura al fluorimetro. Si è ritenuto opportuno misurare la fluorescenza delle NP, senza l'aggiunta di CTB, in quanto queste particelle sono decorate con rodamina. Pertanto, essendo la lettura della fluorescenza impostata sul canale "RHOD" (Par 6.3.6), si è voluto verificare che i valori di fluorescenza ottenuti dai test di tossicità non fossero influenzati da una fluorescenza intrinseca delle particelle.

6.4. Presentazione e discussione dei risultati

6.4.1. CTB e Curve di calibrazione

6.4.1.1. Curve di calibrazione: HEKa.

Come già ricordato nei capitoli riguardanti i fenotipi cellulari che sono stati coltivati (Cap. 2-4), le cellule, in seguito ad ogni subcultura, cambiano le loro caratteristiche [17, 18]. Inoltre, le cellule normali hanno un tempo di vita limitato, e dopo alcuni passaggi entrano nella fase di senescenza e poi muoiono [19]. Si è considerato, pertanto, che il metabolismo del reagente CTB potesse essere modificato da una quantità di fattori: passaggio delle cellule, lotto delle cellule, microvariazioni nei terreni, supplementi e reagenti utilizzati durante la coltura ed il congelamento, fattori ambientali, ed

altre variabili più difficilmente identificabili. Di conseguenza si è ritenuto necessario costruire una curva di calibrazione non solo per ogni passaggio (P), ma anche per ogni lotto di cellule scongelato, (anche se appartenenti allo stesso passaggio) ed utilizzato per effettuare un esperimento di tossicità.

Tutte le curve di calibrazione delle HEKa sono riportate in Figura 6.1. Per una semplificazione del testo, con la dicitura “una curva Pn” si intenderà “una curva di calibrazione allestita con cellule appartenenti al passaggio Pn”. Le curve sono state allestite tutte in triplicato tranne la P8 (n=1) in quanto al momento della tripsinizzazione non si è ottenuto un numero di cellule sufficiente. La curva P8 si riporta per motivi comparativi, ma non è stata associata a nessun esperimento di tossicità.

Osservando i dati presentati in Figura 6.1, per quanto detto precedentemente, ci si sarebbe aspettati che la fluorescenza sarebbe variata progressivamente con l’aumentare dei passaggi o improvvisamente una volta raggiunto un certo passaggio.

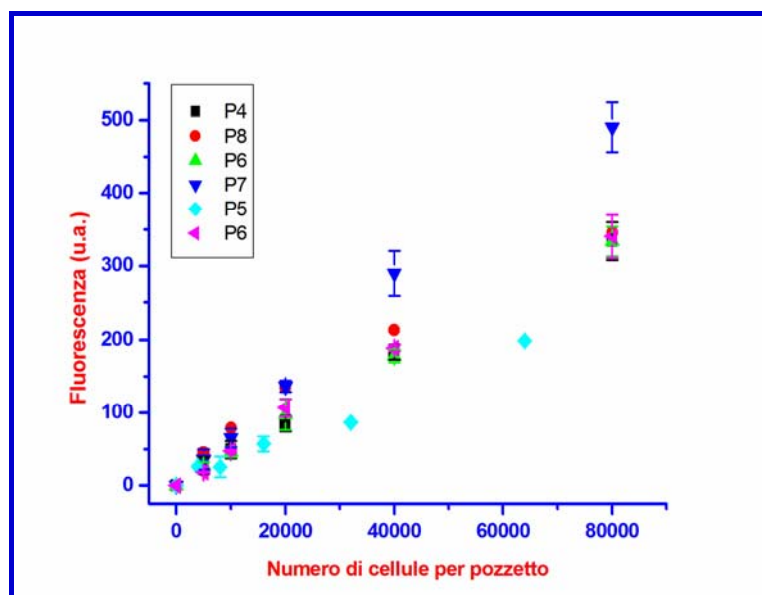


Figura 6.1. Curve di calibrazione di HEKa a confronto.

Ciononostante, non si è trovata questa corrispondenza. Infatti, tra le 6 curve di calibrazione riportate in Figura 6.1, quella con i valori più alti è una P7 (in blu) mentre quella con valori più bassi è una P5 (in celeste). Tuttavia, le curve di calibrazione presenti nella parte centrale della figura, dove troviamo una P4, due P6, ed una P8 (n=1), sembrano molto simili. Per ovvi motivi non si è proceduto all’analisi statistica di queste curve, essendo evidenti le macroscopiche differenze. Non è stato possibile trovare la causa che ha determinato le variazioni appena descritte, tuttavia la decisione di affiancare ogni esperimento di tossicità con una curva di calibrazione risulta un’ottima scelta alla luce di questi dati.

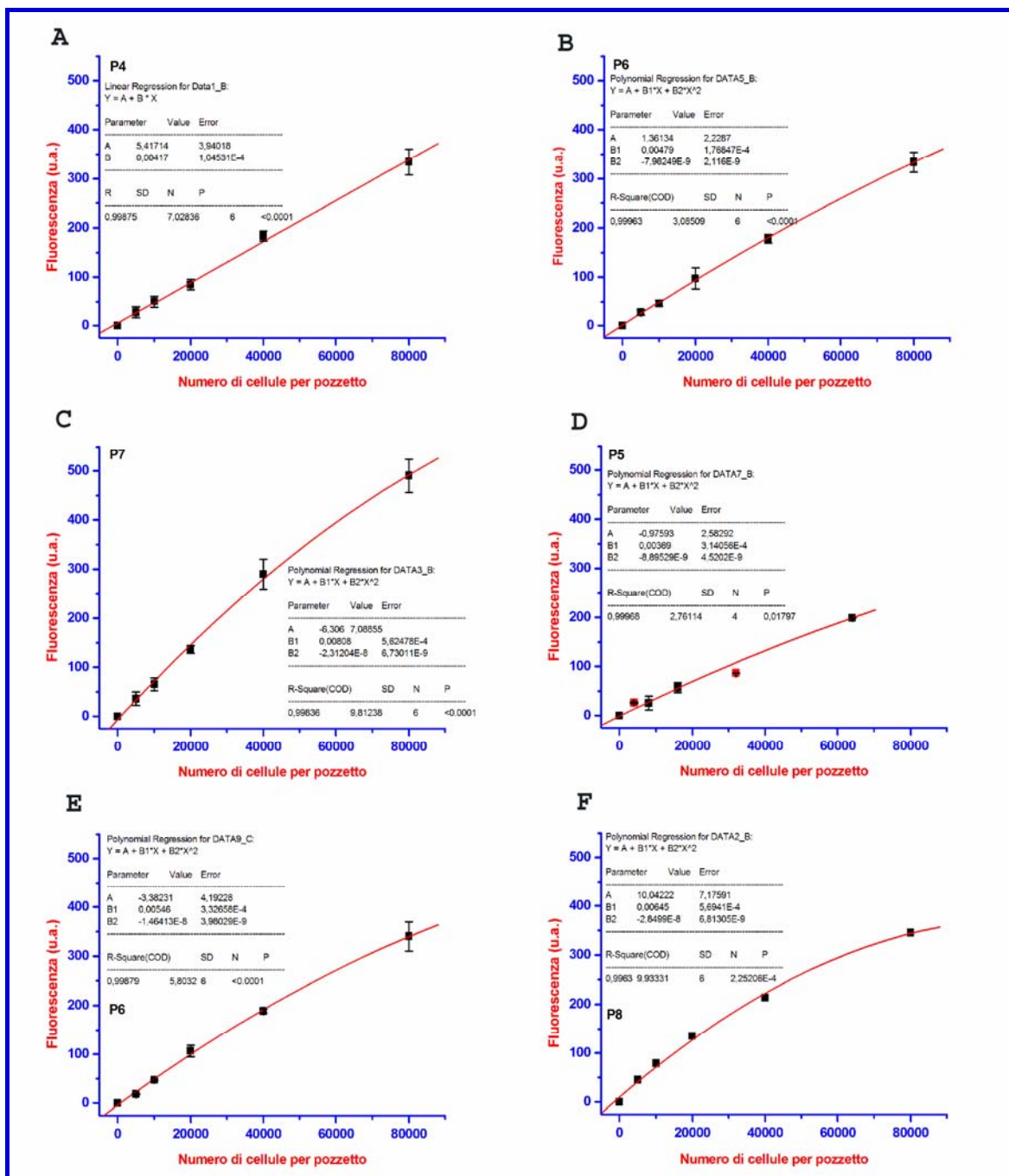


Figura 6.2. Curve di calibrazione HEK293T utilizzate come riferimento negli esperimenti di tossicità. (A) NP-GS, (B) NP-Si, (C) NP-Si)GS, (D) mezzo disperdente – acqua, (E) mezzo disperdente – surmatante GS. I dati in rosso sono stati esclusi dalla modellizzazione. La curva di calibrazione P8 (F) non è stata usata come riferimento per nessun esperimento, ed è stata qui inserita solo per confronto.

I dati di ogni curva sono stati sottoposti a modellizzazione matematica per ottenere l'equazione che meglio descrive il loro andamento (Fig. 6.2). Sono state prese in considerazione regressioni lineari o polinomiali di secondo grado, senza tener conto se la retta/curva passasse per lo zero, ma avesse

invece rispettivamente una R o R^2 prossima ad uno. Tutte le modellizzazioni sono riportate in Figura 6.2 dove è altresì indicato l'esperimento associato ad ogni curva di calibrazione.

6.4.1.2. Curve di calibrazione: HEMa-LP

Con le stesse motivazioni espresse per i cheratinociti, anche per i melanociti è stata costruita una curva di calibrazione per ogni lotto di cellule con il quale è stato allestito un esperimento di tossicità, in modo che i dati derivanti da quell'esperimento potessero avere una curva di riferimento. Questo giustifica il fatto che siano state allestite curve di calibrazione appartenenti non solo a passaggi differenti, ma anche allo stesso passaggio. Si riporta che le curve di calibrazione sono state allestite sempre dallo stesso operatore, e, nella maggior parte dei casi, durante il periodo invernale (novembre-febbraio) quando la climatizzazione del laboratorio è risultata più facile. Solo gli esperimenti del giugno 2012 (i.e., curve P5-fuxia e P6-gialla, in Fig. 6.3) possono avere risentito dell'eccessivo caldo durante le operazioni in cappa sterile (aria condizionata spenta per evitare contaminazioni). Infatti, a causa dell'elevato ritmo con cui si sono susseguiti gli esperimenti, il condizionatore è stato tenuto spento anche per giornate intere determinando l'innalzamento della temperatura di 5-7°C rispetto alla norma. Tuttavia, se si ipotizza che questo parametro possa essere stato dannoso per le cellule, si potrebbe sempre obiettare che una RT più vicina a quella in cui vengono incubate le cellule non avrebbe dovuto causare uno stress termico tale da poter cambiare il metabolismo cellulare. Infine, si riporta che le curve sono state allestite tutte in triplicato tranne la P6 del 18.02.2013 (n=2 in Fig. 5.3) in quanto non si avevano abbastanza cellule per tutti i punti della curva e relativi esperimenti di tossicità.

Tutte le curve ottenute (una P4, quattro P5, tre P6, e una P7.) sono riportate in ordine cronologico e confrontate in Figura 6.3, dove è subito evidente che le stesse mostrano nella maggior parte dei casi andamenti lineari, ma valori di fluorescenza differenti a parità di numero di cellule e passaggio. Inoltre, sebbene la P7 (in azzurro in Fig. 6.3) abbia restituito fluorescenze statisticamente più basse della P4 (in nero in Fig.6.3), le restanti P5 e P6 non si trovano comprese fra queste due curve. Pertanto, si è forzati a concludere che non può essere la senescenza la causa del diminuito metabolismo. Inoltre, per rendere più agevole il confronto dei dati delle curve accomunate dallo stesso passaggio, tutte le P5 e le P6 sono state riunite nei due grafici della Figura 6.4. Qui è possibile notare che il metabolismo delle P6 è diminuito nel tempo, ciò che potrebbe far pensare ad un effetto del tempo trascorso in azoto liquido (se si esclude la senescenza). Tuttavia, lo stesso ragionamento non può essere fatto per le P5, perché la P5-verde (di giugno) coincide con la nera. Per contro, se invece giustificiamo i più alti valori di fluorescenza della P5-verde come dovuti ad una RT più elevata (vedi più sopra), si sarebbe dovuto manifestare lo stesso andamento anche nelle P6.

In entrambi i casi, non si è trovata nemmeno una corrispondenza con la data di esecuzione che potesse dipendere dal cambio di fornitore delle fiasche di coltura, oppure tempo in criomantenimento. Quello che è certo, è che le HEMa-LP a volte crescono con difficoltà come anche già evidenziato nel Capitolo 3, e che ciò correla bene con un basso metabolismo.

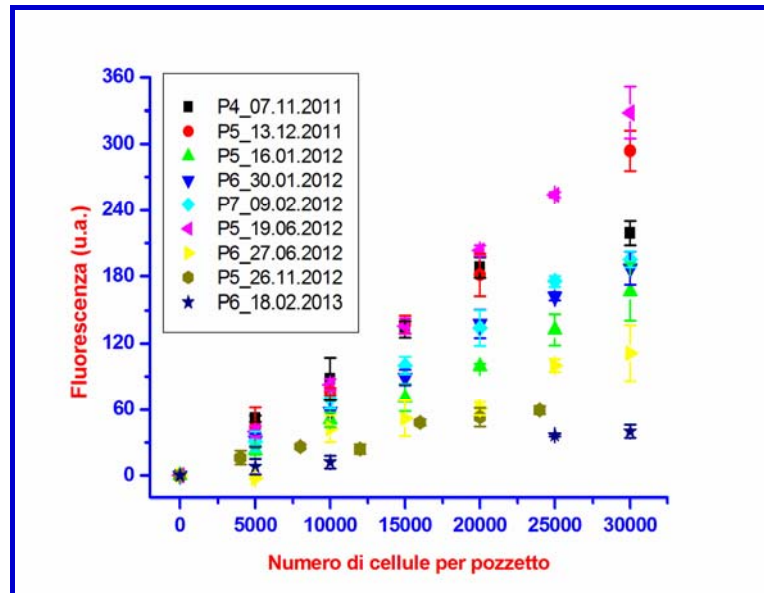


Figura 6.3. Curve di calibrazione di HEMa-LP a confronto.

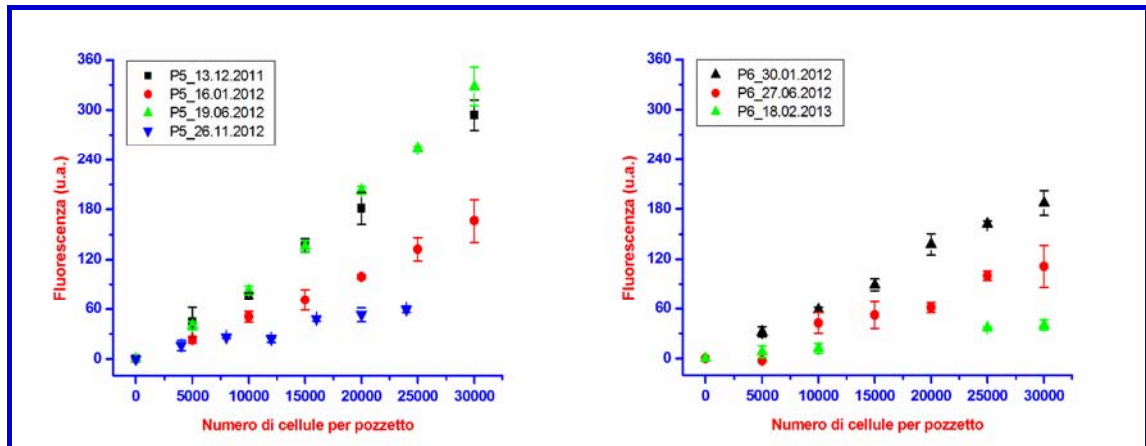


Figura 6.4. Curve di calibrazione di HEMa-LP, P5 (sinistra) e P6 (destra), a confronto.

I dati di ogni curva sono stati sottoposti a modellizzazione matematica per ottenere l'equazione che meglio descrive il loro andamento. Sono state prese in considerazione regressioni lineari o polinomiali di secondo grado, senza tener conto se la retta/curva passasse per lo zero, ma avesse invece rispettivamente una R o R^2 prossima ad uno. Tutte le modellizzazioni sono riportate nelle Figure

6.5 e 6.6 dove è altresì indicato l'esperimento associato ad ogni curva di calibrazione. Come si può osservare, nella maggior parte dei casi i dati di fluorescenza aumentano linearmente con l'aumentare della concentrazione cellulare. Fanno eccezione la curva P5 del 26.11.2012 (grafico D in Fig. 6.5) e la curva P5 del 19.06.2012 (grafico D in Fig. 6.6) per le quali si è usata un'equazione di secondo grado.

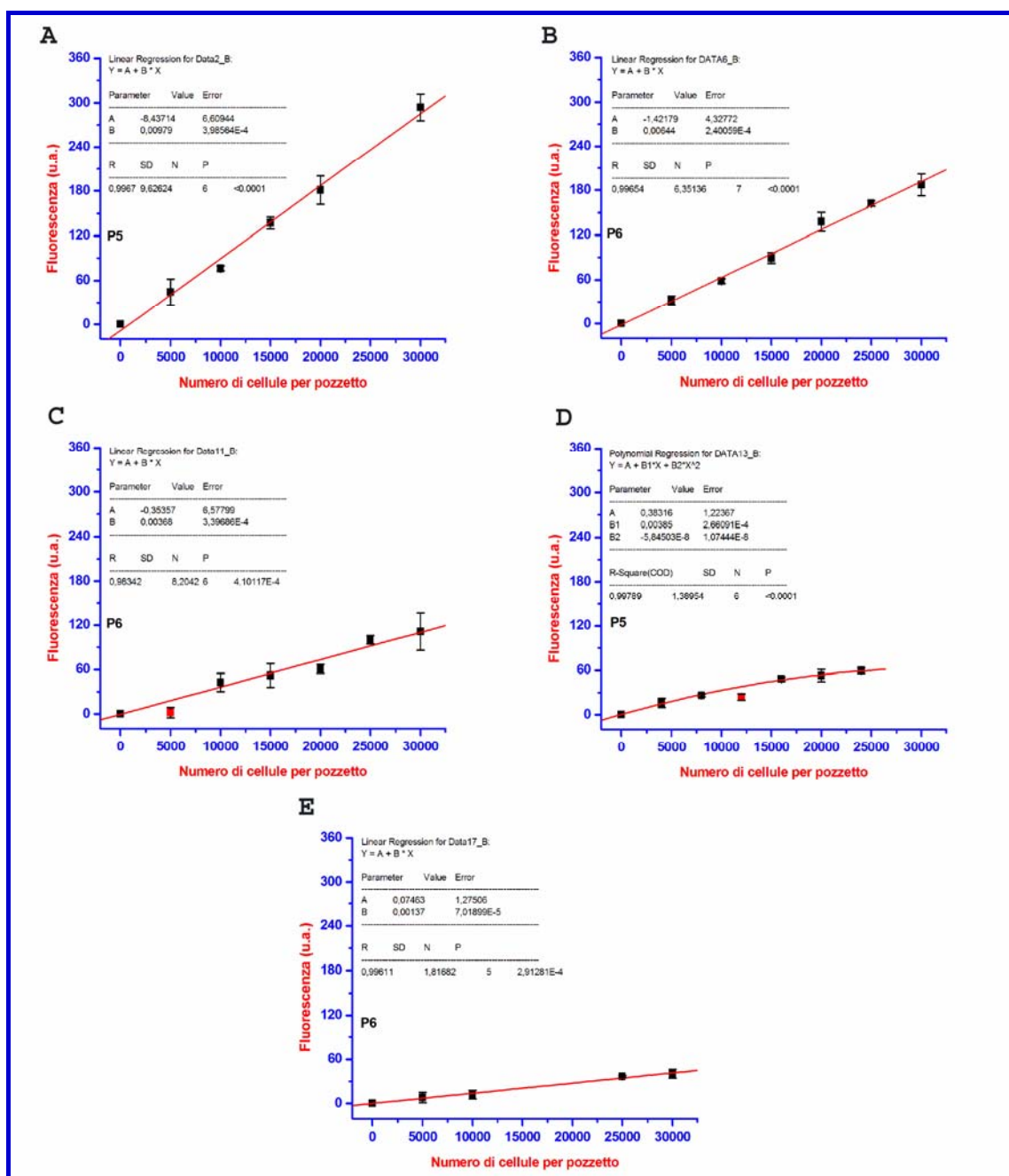


Figura 6.5. Curve di calibrazione HEMA-LP utilizzate come riferimento negli esperimenti di tossicità. (A) NP-GS, NP-Si, (B) NP-Si)GS, (C) NP-Si)RHOD, NP-Si)RHOD/Hep, (D) mezzo disperdente – acqua, (E) mezzo disperdente – surnatante GS. I dati in rosso sono stati esclusi dalla modellizzazione.

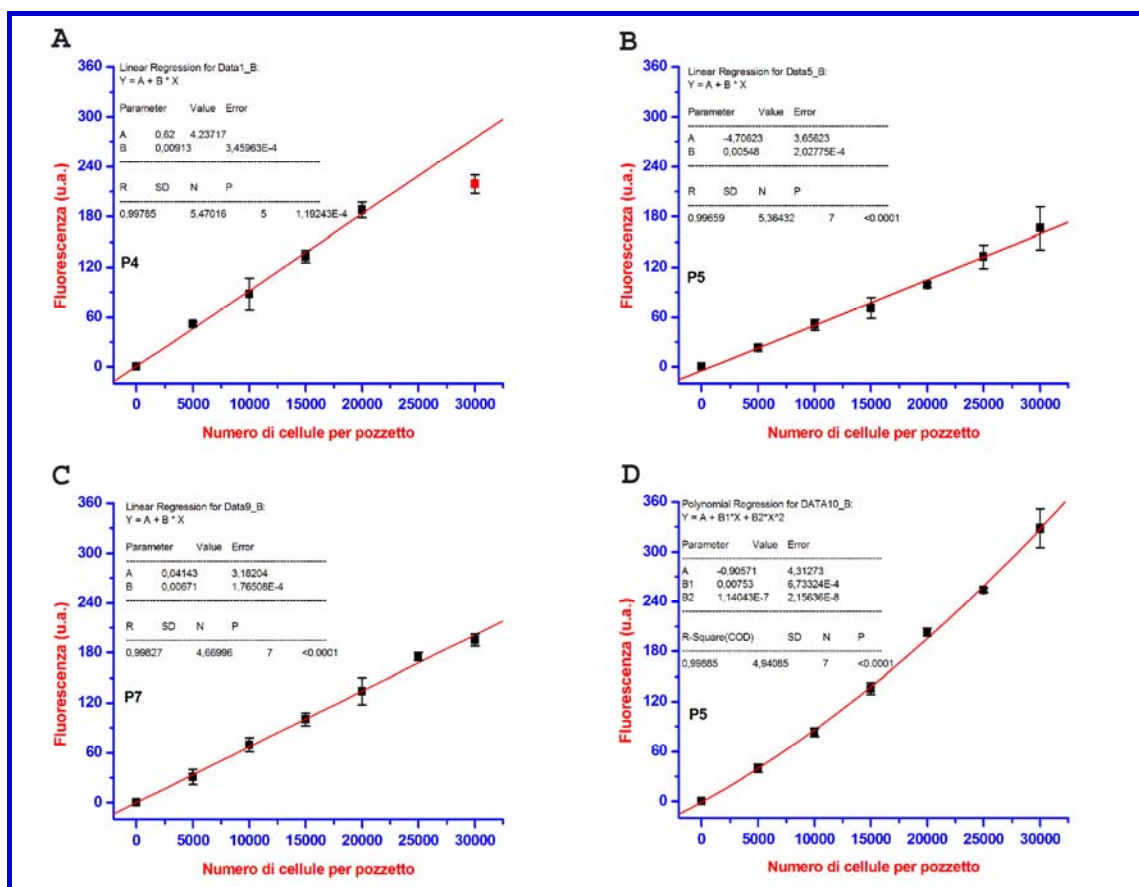


Figura 6.6. Curve di calibrazione HEMA-LP non utilizzate come riferimento negli esperimenti di tossicità. (A) Minima dose efficace, esposizione di 24 h, (B) non utilizzata, (C) non utilizzata, (D) minima dose efficace NP-Si)RHOD, NP-Si)RHOD/Hep. I dati in rosso sono stati esclusi dalla modellizzazione.

6.4.1.3. Curve di calibrazione: Colo-38.

Coltivare ed allestire gli esperimenti con le cellule di melanoma umano ha comportato maggiori difficoltà e tempi più lunghi di lavoro, dato l'elevato numero di cellule da maneggiare di volta in volta. Per le curve di calibrazione, questo ha significato la messa a punto di un protocollo specifico per la lettura delle fluorescenze al fluorimetro (Par. 6.3.6).

Infatti, inizialmente, i campioni provenienti dai pozzetti che contenevano 400.000 – 800.000 cellule sono risultati non misurabili con qualsiasi settaggio (Par. 6.3.6) del PicoFluor, che dava come misurazione : <OVER>. Di conseguenza, questi sono stati diluiti con lo stesso terreno di coltura utilizzato per gli esperimenti, e la fluorescenza è stata rimisurata (punto 17, Par. 6.3.6). Tuttavia, procedendo in questo modo la curva di calibrazione derivante sarebbe stata composta da campioni diluiti e non. Pertanto, si è deciso di operare come descritto precedentemente (punto 17, Par 6.3.6) e qui riassunto. I campioni di una stessa curva di calibrazione sono stati quantificati prima così come tali (TQ) e poi tutti diluiti (1:4). In questo modo le due curve di calibrazione costruite pote-

vano rappresentare un punto di riferimento valido per analizzare i campioni a concentrazioni incognita degli esperimenti di associati. Pertanto, se durante i saggi di tossicità venivano ottenuti valori “over”, quindi da diluire, la curva di calibrazione di riferimento sarebbe stata quella con i valori derivanti dai campioni diluiti. La curva di calibrazione derivante da campioni letti tal quali sarebbe stata presa come riferimento, invece, nel caso opposto.

Tutte le curve di calibrazione, diluite e non, sono riportate in Figura 6.7, dove sono indicati anche il giorno in cui sono state allestite ed il passaggio delle cellule.

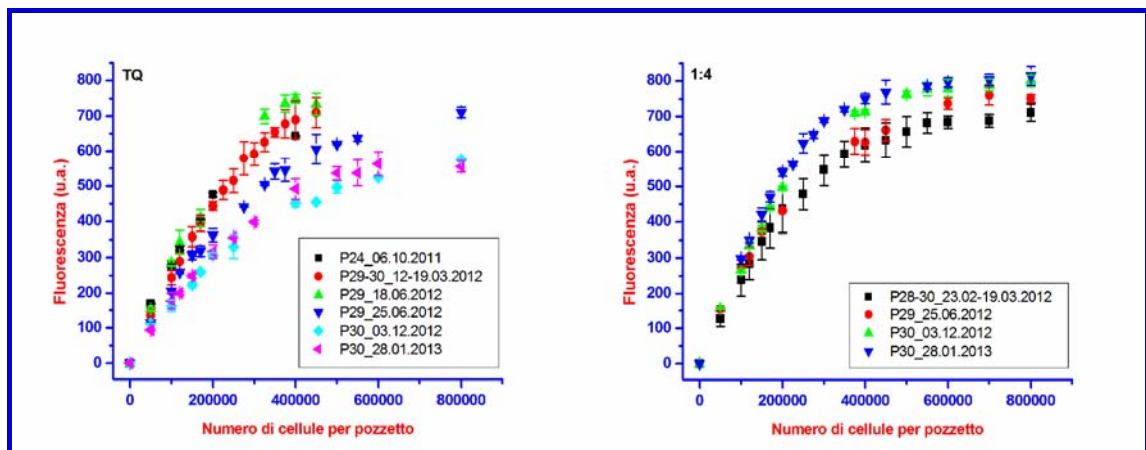


Figura 6.7. Curve di calibrazione di Colo-38 ottenute da campioni diluiti 1:4 (destra) e non (sinistra) a confronto.

Sebbene le Colo-38 siano cellule tumorali appartenenti ad una linea cellulare, e quindi dovrebbero potersi coltivare indefinitamente mantenendo le loro caratteristiche inalterate [19], per discutere i risultati si è deciso di inserire anche questo parametro.

Osservando la Figura 6.7, sembra esistere la correlazione metabolismo – passaggio/tempo di crioconservazione ipotizzata per le cellule normali. Si può notare infatti che dopo una certa data è stato possibile misurare tutti i campioni non diluiti e che per uno stesso campione la fluorescenza diminuisce nel tempo. Per contro, la fluorescenza dei campioni diluiti aumenta nel tempo. Tenendo a mente quanto commentato sul metabolismo del CTB [22] (Par. 6.1), gli andamenti riportati nei due grafici della Figura 6.7 possono essere spiegati con un diminuito metabolismo della resorufina ad idroresorufina [23], accumulo di resorufina, ed insorgenza del quenching [24].

Si evidenzia che in Figura 6.8, la curva ottenuta da campioni non diluiti e indicata con la dicitura P29-30, deriva dal calcolo della media e deviazione standard dei valori ottenuti da una P29 e una P30 (n=6) come mostrato in Figura 6.8. Queste due curve di calibrazione furono allestite a distanza di una settimana per sincerarsi della ripetibilità dei risultati.

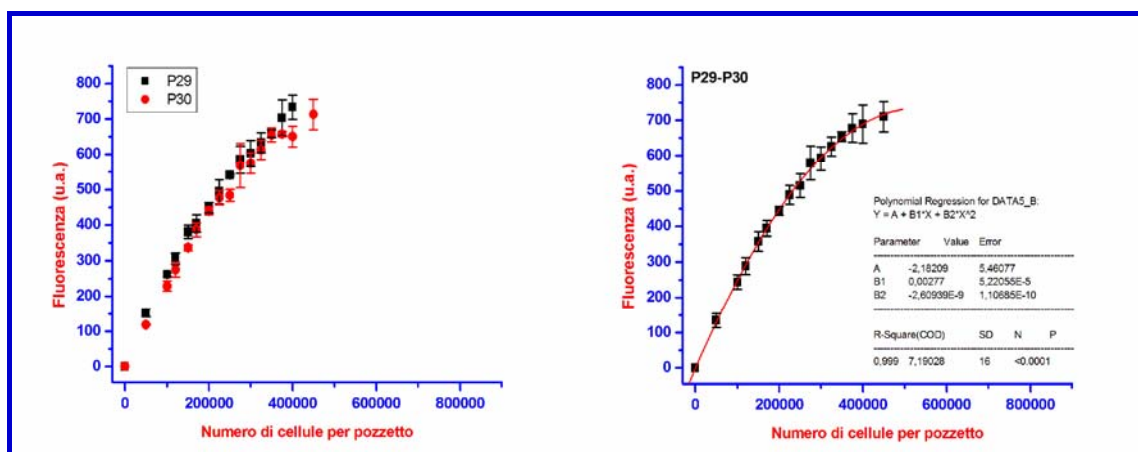


Figura 6.8. A sinistra, confronto tra curva di calibrazione Colo-38, del 12 (P29) e del 19 (P30) marzo 2012. Tutti i valori sono stati letti tal quali. A destra, curva di calibrazione e modellizzazione della media aritmetica derivante dai dati riportati nel grafico a sinistra. Questa curva di calibrazione è stata utilizzata per: “*Minima dose efficace*” di NC/NE Pacli, NC/NE Azl 6, NC/NE Azl 38, NP-GS, NP-Si, NP-Si)GS, NP-Si)RHOD, ed NP-Si)RHOD/Hep. Inoltre, è stata utilizzata per i “*Test di tossicità a tempo – cellule e NP*” di: NP-GS, NP-Si, NP-Si)GS, NP-Si)RHOD, NP-Si)RHOD/Hep, DNPC.

Come si può notare le due curve sono quasi sovrapponibili, e pertanto si è usata la media dei loro valori, il cui andamento è ben descritto da una equazione polinomiale di secondo grado. Questa curva è stata usata per diversi esperimenti come indicato nella legenda della Figura 6.8.

In Figura 6.9, è presente un'altra media di due curve di calibrazione ottenute da campioni diluiti ed è indicata con l'acronimo P28-30. L'andamento puntuale di queste due curve è mostrato nel grafico di sinistra della Figura 6.9.

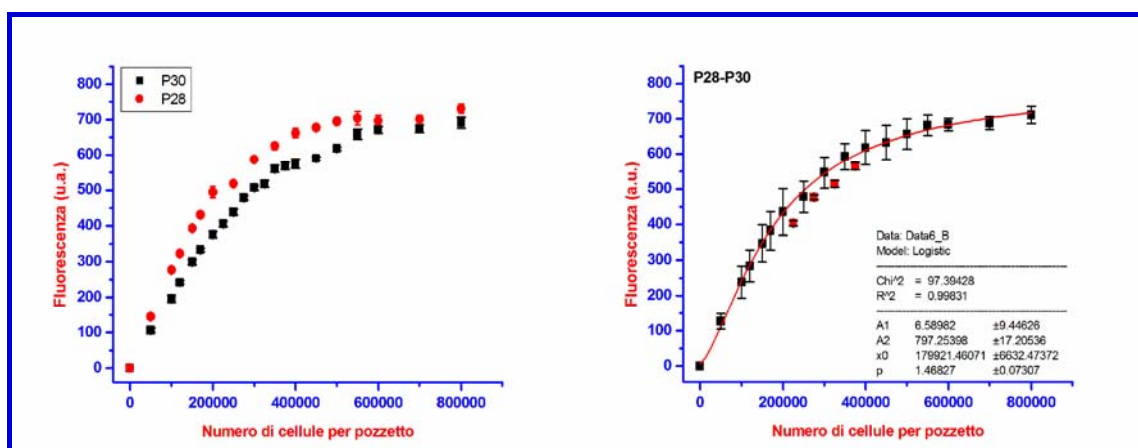


Figura 6.9. A sinistra, confronto tra curve di calibrazione Colo-38, del 23 febbraio (P28) e del 19 (P30) marzo 2012. Tutti i campioni sono stati letti apportando una diluizione di 1:4. A destra, curva di calibrazione e modellizzazione della media aritmetica derivante dai dati riportati nel grafico a sinistra. Questa curva di calibrazione è stata utilizzata per: “*Test di tossicità a tempo – cellule e NP*” di: NP-GS, NP-Si, NP-Si)GS, NP-Si)RHOD, NP-Si)RHOD/Hep, DNPC, NC-Pacli, ed NC. I dati in rosso nel grafico a destra sono stati esclusi dalla modellizzazione.

Come si può notare le due curve “diluite” risultano meno sovrapponibili di quelle non-diluite mostrate nella figura precedente. Tuttavia, sono state considerate sufficientemente vicine e la media che è stata calcolata e modellizzata (grafico a destra della Figura 6.9) è stata utilizzata per diversi esperimenti che hanno coinvolto cellule dei passaggi P28, P29, e P30.

Si riporta, inoltre, che quando i dati di fluorescenza coprono tutto l’intervallo 0 – 800.000 cellule vengono modellizzati meglio da un’equazione indicata come “logistic” in Figura 6.9 e successive. Il modello di regressione logistica utilizza la seguente equazione:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2$$

Questa essendo abbastanza complessa non viene mai riportata nei grafici.

Tutte le altre modellizzazioni delle curve derivanti da dati diluiti e non-diluiti sono riportate nella Figura 6.10 dove è altresì indicato l’esperimento associato ad ogni curva di calibrazione. Rispetto alle modellizzazioni delle HEKa e delle HEMa-LP l’andamento è meno regolare e diversi dati sono stati esclusi. Ciò può essere dovuto alla replicazione tumultuosa e veloce di queste cellule.

In letteratura sono riportati esempi in cui la vitalità delle cellule Colo-38 è stata quantificata con il CTB [10, 25], ma non è stato trovato alcun articolo in cui si discutesse di un eventuale allestimento della curva di calibrazione, in cui fosse usato questo reagente.

5.4.2. Esperimenti di minima dose efficace.

Gli esperimenti di minima dose efficace sono stati eseguiti prima degli esperimenti di tossicità descritti nel Paragrafo 6.4.3. Questi esperimenti sono serviti per capire se le NP studiate presentassero una qualche tossicità e per definire un protocollo standard per gli esperimenti in triplicato (i.e., tempo di esposizione, quante dosi, quale concentrazione della dose, uso degli antibiotici). In questa fase, si è considerato che se ci fosse stata una differenza importante si sarebbe vista anche facendo degli screening sommari (n=1). Inoltre, come indicato nel Paragrafo 6.3.7, questi esperimenti si sono eseguiti prima con le Colo-38 e poi con le HEMa-LP. I risultati ottenuti con le cellule tumorali sono serviti per limitare le concentrazioni testate con i melanociti. Pertanto le cinque diluizioni utilizzate nei successivi esperimenti di minima dose efficace con le HEMa-LP (Par.6.3.7), e poi per i saggi di tossicità (Par. 6.4.3) sono state scelte secondo il seguente criterio: è stata sempre scelta la dose a concentrazione D1 (i.e., TQ), poi due dosi a concentrazione Dx che precedono quella a efficacia nulla, ed una dose a concentrazione Dy successiva a quella ad efficacia nulla. Inoltre, è stata scelta una diluizione intermedia tra quella ad efficacia massima e quella ad efficacia nulla.

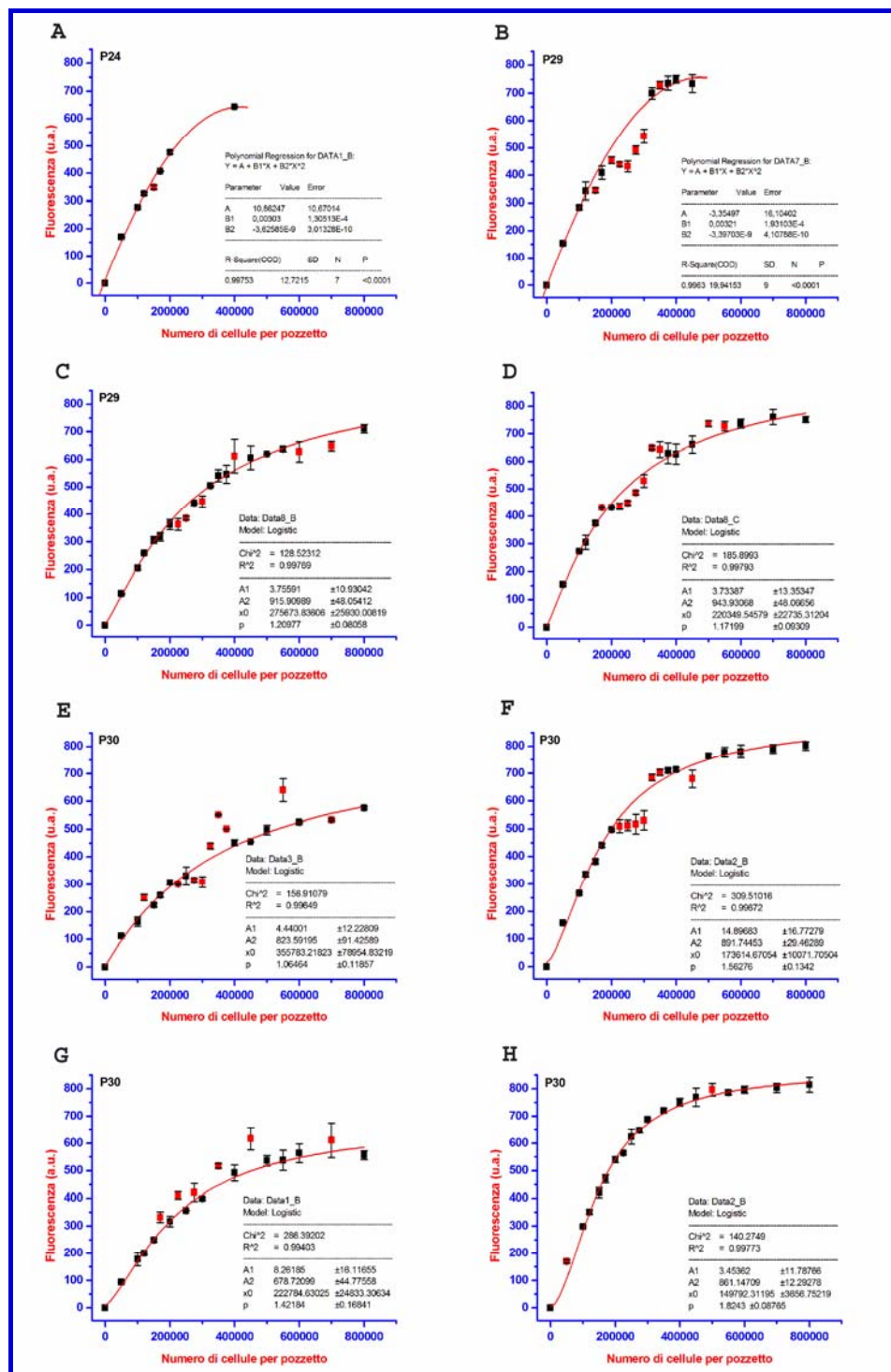


Figura 6.10. Confronto tra curve di calibrazione. (A) Curva di calibrazione P24, del 6 ottobre 2012, tal quale, utilizzata per “*Test di tossicità a tempo – cellule e NP*” di NC ed NC-Pacli, (B) curva di calibrazione P29, del 18 giugno 2012, tal quale, non utilizzata, (C, D) curve di calibrazione P29, del 25 giugno 2012, rispettivamente tal quale e diluita, non utilizzate, (E, F) curve di calibrazione P30, del 3 dicembre 2012, rispettivamente tal quale e diluita, utilizzate per “*Test di tossicità a tempo – mezzo disperdente della formulazione nanoparticellare- H₂O*”, (G, H) curve di calibrazione P30, del 28 gennaio 2013, rispettivamente tal quale e diluita, utilizzate per “*Test di tossicità a tempo – mezzo disperdente della formulazione nanoparticellare- NP-GS*”. I dati in rosso sono stati esclusi dalla modellizzazione.

Tutti i dati di questi esperimenti sono riassunti nelle Tabelle 6.7-6.11 dove si riporta la quantità di cellule metabolicamente attive dopo l'esposizione alle NP; valori espressi in percentuale rispetto alle cellule non trattate con le NP ma coltivate nelle medesime condizioni (Par.6.3.7). Infine, i valori indicati in grassetto nelle Tabelle 6.7-6.11 sono relativi alle diluizioni scelte per gli esperimenti descritti nel Paragrafo 6.4.3.

6.4.2.1. Nanoparticelle inorganiche

Le NP-Si, NP-GS, e NP-Si)GS sono state testate con le Colo-38 e con le HEMa-LP. Nel primo caso, le cellule sono state esposte solo per 24 h ad una dose (varie diluizioni) di NP (Tab.6.7). Nel secondo caso, invece, i melanociti sono stati esposti per 24 e 48 h ad una dose (varie diluizioni) di NP, oppure a due dosi (0 e 24 h) nell'arco di 48 h (Tab. 6.8).

Tabella 6.7. Percentuali di Colo-38 metabolicamente attive dopo 24 h di esposizione ad una dose di NP.

Dil.	Si	GS	Si)GS	NC Pacli	NE Pacli	NC Azl 38	NE Azl 38	NC Azl 6	NE Azl 6
D1	86,4	73,8	100,9	52,9	13,7	41,8	50,4	15,9	24,7
D2	/	102,5	84,69	101,1	11,6	15,6	52,0	14,0	17,5
D3	97,7	111,4	118,76	56,9	9,2	7,8	37,2	13,5	16,0
D4	78,5	98,9	111,92	61,3	6,4	31,8	29,0	7,1	18,7
D5	88,4	91,4	103,26	51,2	6,2	73,3	84,8	9,8	11,7
D6	/	80,3	89,53	46,9	3,7	77,5	87,6	10,3	7,5
D7	/	/	107,31	54,9	5,5	95,8	112,7	48,8	73,8
D8	/	89,3	113,50	51,3	4,9	91,5	91,1	97,8	110,9
D9	/	94,4	119,99	59,0	4,8	107,2	93,7	84,2	98,5
D10	/	99,4	98,43	42,2	81,6	96,7	113,7	93,9	131,3
D11	/	/	/	70,7	13,3	106,4	110,1	92,9	93,7
D12	/	/	/	90,3	22,5	120,2	106,6	89,3	115,2
D13	/	97,9	/	99,4	42,4	94,3	121,0	91,5	103,3
D14	/	86,2	/	108,0	70,4	107,7	99,3	96,6	116,9
D15	/	108,8	/	139,5	78,7	104,3	99,2	106,6	111,1
D16	/	/	/	114,1	94,9	80,6	119,4	102,6	87,7
D17	/	92,7	/	131,9	87,5	87,6	/	115,9	111,6
D18	/	85,4	/	141,0	94,2	98,0	94,2	101,0	140,1
D19	/	82,3	/	138,2	101,2	117,7	116,7	98,1	109,3
D20	/	88,5	/	124,4	84,5	101,1	107,3	98,1	135,9

In grassetto: le diluizioni scelte per gli esperimenti "Test di tossicità a tempo – cellule e NP". Il simbolo "/": non testato

Per quanto riguarda le Colo-38, le varie NP non sono sembrate particolarmente tossiche. Risultati simili si sono ottenuti con le HEMa-LP. In entrambi i fenotipi cellulari, la diluizione D1 è sembrata la più efficace, e come tossicità si è mantenuto un ordine di priorità: NP-GS > NP-Si > NP-Si)GS. Inoltre, se si osservano i dati della Tabella 6.7 dove si confrontano le risposte ai vari tempi e dosi, solo per le NP-GS si nota una correlazione tra tossicità e tempo di esposizione e dose.

Considerando che queste NP sono centrali per questa tesi, si sono scelte le prime cinque diluizioni seriali per i successivi esperimenti.

Tabella 6.8. Percentuale di HEMa-LP metabolicamente attive dopo esposizione ad 1-2 dosi di NP.

Dil.	NP-Si			NP-GS			NP-Si)GS			NP-GS in RPMI	
	24	48-1	48-2	24	48-1	48-2	24	48-1	48-2	48-1	48-2
D1	73,5	86,46	122,3	66,0	46,8	32,6	123,3	c	c	16,3	39,2
D2	116,7	/	123,5	82,3	/	82,3	110,1	/	c	/	60,5
D3	101,0	/	126,2	100,7	/	124,2	99,2	/	c	/	33,3
D4	89,8	/	102,9	125,4	/	145,0	111,9	/	c	/	16,6
D5	95,2	/	87,8	102,6		98,4	111,5		c		46,0

48-1: cellule esposte ad un'unica dose di NP, per 48h; 48-2: cellule esposte a due dosi di NP dispensate a distanza di 24h l'una dall'altra; c: pozzetto in cui è stata riscontrata contaminazione. **In grassetto:** le diluizioni scelte per gli esperimenti "Test di tossicità a tempo – cellule e NP". Il simbolo "f": non testato

6.4.2.2. Nanoparticelle lipidiche

Le NP lipidiche testate, sebbene contenevano farmaci antitumorali o citotossici, possono essere confrontate a coppie NC-NE. Infatti, l'unica differenza è la carica superficiale: positiva per le NC e negativa per le NE. Per quanto riguarda il confronto crociato, si riporta che le tre molecole attive erano state incapsulate a diverse concentrazioni espresse in peso di molecola attiva per volume di dispersione di NP. Queste sono così riassunte: (i) NC Pacli: 46,3 µg/mL, (ii) NE Pacli: 47,2 µg/mL, (iii) NC Azl 38: 113,6 µg/mL, (iv) NE Azl 38: 125 µg/mL, (v) NC Azl 6: 113,6 µg/mL, e (vi) NE Azl 6: 120,2 µg/mL. Entrambi i fenotipi cellulari sono stati esposti a varie diluizioni seriali con le stesse modalità descritte per le NP inorganiche. I risultati ottenuti con le Colo-38 e con le HEMa-LP sono rispettivamente presentati nelle Tabelle 6.7 e 6.8.

Utilizzando il Pacli, le NE sono risultate decisamente superiori con le Colo-38 piuttosto che con le HEMa-LP, dove la differenza tra NC e NE non è così importante. Nel primo caso (Tab. 6.7), solo un 50% delle Colo-38 esposte alle NC Pacli sono risultate metabolicamente attive nel range di concentrazioni D1 – D9 (i.e., 46,3 – 0,18 µg/mL).

Tabella 6.8. Percentuali di HEMa-LP metabolicamente attive dopo esposizione di 24-48 h ad 1-2 dosi di NP.

Dil.	NC-Pacli		NE-Pacli		NC-Azl 38		NE-Azl 38		NC-Azl 6		NE-Azl 6							
	24	48-1	48-2	24	48-1	48-2	24	48-1	48-2	24	48-1	48-2						
D1	61,25	40,03	32,33	67,70	62,55	67,88	87,34	61,31	69,51	62,88	8,00	22,70	83,33	94,43	65,74	33,25	65,26	56,51
D2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
D3	/	/	/	/	/	/	175,58	/	96,91	36,75	/	58,84	/	/	/	/	/	/
D4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	46,65	/	27,65	74,59	/	30,09	28,53	/	24,09
D5	46,24	/	43,43	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
D6	/	/	/	/	/	/	93,22	/	58,00	58,16	/	84,37	/	/	/	16,43	/	37,40
D7	/	/	/	46,47	/	100,48	/	/	/	85,72	/	109,75	52,79	/	47,71	32,28	/	49,94
D8	/	/	/	/	/	/	95,29	/	96,50	/	/	/	/	/	/	/	/	/
D9	79,23	/	71,04	/	/	/	84,75	/	134,19	/	/	/	59,52	/	79,29	41,79	/	58,76
D10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	91,99	/	54,84	/	/	/
D11	86,26	/	c	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
D12	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
D13	77,61	/	74,60	69,20	/	92,02	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
D14	/	/	/	75,51	/	118,61	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
D15	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
D16	/	/	/	81,18	/	110,56	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
D17	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
D18	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
D19	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
D20	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

48-1: cellule esposte ad un'unica dose di NP, per 48h; 48-2: cellule esposte a due dosi di NP dispensate a distanza di 24h l'una dall'altra; c: pozzetto in cui è stata riscontrata contaminazione. Il simbolo “/” : non testato

Per contro, utilizzando le NE-Pacli la percentuale di cellule tumorali metabolicamente attive si trova sotto il 15% nel range di concentrazioni D1 – D11 (i.e., 47,2 µg/mL – 46,09 ng/mL), ed è necessario arrivare fino alla diluizione D14 (i.e., 5,76 ng/mL) per risalire ad un 70%. Le stesse particelle esposte alle HEMA-LP alle concentrazioni scelte in base ai risultati con le Colo-38 hanno mostrato dei risultati meno entusiasmanti (Tab. 6.8). La dose a concentrazione D1 (i.e., NC Pacli: 46,3 µg/mL, e NE Pacli: 47,2 µg/mL) in 24 h, determina che un 60% di melanociti sia metabolicamente attivo (i.e. NC: ca. 61%; NE: ca. 68%). L'effetto dose – tempo di esposizione è visibile solo con le NC-Pacli e solo con la concentrazione D1, passando da un 60% a un 40% ed infine ad un 30% con due dosi.

Le NC-Pacli sono state testate con le Colo-38 negli esperimenti di tossicità alle concentrazioni D1, D5, D9, D11 e D13 (i.e., 46.300 ng/mL, 2893,75 ng/mL, 180,86 ng/mL, 45,21 ng/mL, 11,30 ng/mL).

Utilizzando la molecola Azl 38, le NC sono risultate più efficaci delle NE con le Colo-38. Ad ogni modo già dalla concentrazione D5 per le NC (i.e., 7,1 µg/mL) e le NE (i.e., 7,8 µg/mL) si sono raggiunti quantità superiori al 70% di cellule tumorali metabolicamente attive. Con queste cellule le concentrazioni più attive sembrano essere la D3 (i.e., 28,4 µg/mL) con le NC (ca. 8%) e la D4 (i.e., 15,6 µg/mL) con le NE (ca. 29%). Tuttavia, utilizzando i melanociti la situazione si capovolge (Tab. 6.8). Infatti, le HEMA-LP sono risultate più sensibili alle NE ed alle concentrazioni D3 (i.e., 31,3 µg/mL) e D4 (i.e., 15,6 µg/mL), rispettivamente: 36,8 % in 24 h, e ca. 28 % in 48 h e due dosi.

Utilizzando la molecola Azl 6, anche in questo caso le NC sono risultate più efficaci delle NE. Ad ogni modo, è necessario raggiungere la concentrazione D8 per le NC e la D7 per le NE per osservare quantità superiori al 70% di cellule tumorali metabolicamente attive. È degno di nota che, nel range di concentrazioni D1 – D6 le NC (i.e. 113,6 – 3,6 µg/mL) assestano le Colo-38 su un 10%, mentre le NE (i.e. 120,2 – 3,8 µg/mL) su un 16 % circa. Tuttavia, utilizzando i melanociti la situazione si capovolge (Tab. 6.8). Infatti, le HEMA-LP sono risultate più sensibili alle NE, e nelle concentrazioni testate ci ritroviamo sempre al di sotto di un 40 % di melanociti metabolicamente attivi dopo 24 h di esposizione.

6.4.2.3. *Nanoparticelle inorganiche rodamate*

Entrambi i fenotipi cellulari sono stati esposti ad una dose (varie diluizioni seriali) di NP rodamate per 24 h. Tutti i risultati sono mostrati in Tabella 6.9 dove si evince che sia le NP-Si-RHOD che le NP-Si-RHOD/Hep non sembrano essere tossiche, perché solo pochi valori sono sotto al 90% di cellule metabolicamente attive. Per i test di tossicità è stato scelto di utilizzare soltanto la concentrazione D1 (i.e., TQ).

Tabella 6.9. Percentuali di cellule metabolicamente attive dopo esposizione di 24h alle NP.

Diluizione	NP-Si)RHOD		NP-Si)RHOD/Hep	
	Colo-38	HEMA-LP	Colo-38	HEMA-LP
D1	99,7	94,8	83,2	104,6
D2	111,4	97,4	96,1	126,1
D3	100,0	116,2	/	91,2
D4	102,3	124,8	101,5	107,1
D5	123,4	107,4	/	85,3
D6	107,6	90,3	/	107,0
D7	105,6	102,0	/	95,4
D8	100,1	123,7	/	83,8
D9	99,6	114,3	115,6	90,8
D10	95,9	106,2	99,0	93,8
D11	101,8	84,9	/	94,3
D12	99,1	91,5	122,9	127,1
D13	/	109,2	102,1	92,2
D14	95,9	115,1	113,0	94,8
D15	115,2	77,7	/	68,7
D16	85,5	88,6	102,7	104,2
D17	106,2	80,3	109,6	73,9
D18	93,4	87,5	/	70,3
D19	101,2	110,9	98,7	77,9
D20	/	81,2	/	41,6

In grassetto: le diluizioni scelte per gli esperimenti “Test di tossicità a tempo – cellule e NP”.

Queste NP, essendo fluorescenti, sono state anche utilizzate per verificare l’influenza dei passaggi aggiunti al protocollo originale del CTB: (i) lavaggio del pozzetto prima dell’aggiunta del CTB, e (ii) centrifugazione del campione prima della lettura al fluorimetro (Par. 6.3.6). Queste prove sono state fatte con la diluizione D1, ed i risultati sono mostrati nella successiva Tabella 6.10.

Nella Tabella 6.10, con “TQ1” ci si riferisce al campione che non ha subito il cambio del terreno né la centrifuga, mentre con “TQ2” al campione che è stato trattato con il protocollo da noi approntato. Inoltre, essendo i campioni TQ1 risultati “OVER”, è stata necessaria una diluizione degli stessi in rapporto 1:4 con terreno ricostituito e supplementato. I campioni “TQ2”, invece, sono risultati leggibili, ma sono stati anche diluiti affinché fosse possibile un confronto con i TQ2. Dalla Tabella 6.10 si evince che i TQ1 sono sempre più alti rispetto ai TQ2, a dimostrare che il cambio del terreno e la centrifuga servono a rimuovere eventuali particelle o cellule in sospensione e a limitare la torbidità del campione.

Tabella 6.10. Fluorescenza registrata per i campioni TQ.

Campione	TQ1	TQ1 dil.	TQ2	TQ2 dil.
NP-Si)RHOD	OVER	754,2	889,1	712,3
NP-Si)RHOD/Hep	OVER	719,4	929,3	641,6

Inoltre, come si può evincere dalla Tabella 6.10. i valori di fluorescenza di NP-Si)RHOD sono più alti di quelli di NP-Si)RHOD/Hep. Sulla superficie delle NP-Si)RHOD e NP-Si)RHOD/Hep è presente la rodamina, in misura maggiore sulle prime NP, rispetto alle seconde. Questa molecola potrebbe essere responsabile dell'aumento di fluorescenza. Per confermare questa ipotesi sono stati allestiti ulteriori esperimenti in cui nei pozzetti erano presenti NP-Si)RHOD e NP-Si)RHOD/Hep, con terreno. I risultati sono discussi nel Paragrafo 6.3.11.

6.4.2.4. Sostanza C

Le cellule Colo-38 sono state esposte anche ad una molecola da noi indicata come “C”, la quale è stata utilizzata per ricoprire le NP-Au. Presso il nostro laboratorio erano presenti diversi lotti di questo composto, pertanto si è ritenuto opportuno testarli tutti. I risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 6.11. I diversi lotti di C non sembrano sortire risultati differenti tra loro. Le percentuali di cellule metabolicamente attive ottenute sono alte e ciò dimostra che la sostanza C che ricopre le NP-Au (nella formazione delle DNPC) non esplica un'azione tossica.

Tabella 6.11. Percentuali di Colo-38 metabolicamente attive dopo 24h di esposizione alla sostanza C.

Diluizione	Sostanza C				
	Lotto 16	Lotto 17	Lotto 18	Lotto 19	Lotto 20
C-D1	105,5	99,8	98,2	104,6	103,2
C-D2	100,6	86,2	97,2	103,6	103,6
C-D3	94,4	88,2	90,3	85,3	99,8
C-D4	80,0	92,8	89,8	100,4	99,8
C-D5	89,9	101,2	93,4	97,0	101,4
C-D6	85,7	97,5	91,6	99,0	95,6
C-D7	89,0	93,0	92,7	95,4	92,1
C-D8	99,0	94,3	99,5	103,2	101,3
C-D9	90,0	95,7	93,1	104,6	105,1
C-D10	85,7	88,9	95,7	100,8	99,3

6.4.3. Test di tossicità a tempo - cellule e nanoparticelle.

I test di tossicità a tempo sono stati allestiti per tutti e tre i fenotipi cellulari da noi coltivati. Le cellule sono state esposte alle NP-Si, NP-GS, NP-Si)GS, NC, NC Pacli, NP-Si-RHOD, NP-Si-RHOD/Hep, e DNPC. I grafici mostrati nei prossimi Paragrafi riassumono i risultati ottenuti in seguito all'esposizione delle cellule alle NP. I dati sono stati presentati sia come percentuale che come numero di cellule rimaste vive, in ogni pozzetto, al termine del periodo di esposizione ad una determinata formulazione. Il numero di cellule è stato calcolato sostituendo il valore di fluorescenza ottenuto per ciascun campione (sottratto del suo bianco corrispondente) alla y della curva di calibrazione utilizzata come riferimento. Il valore restituito dalla x corrisponde, quindi, al numero di cellule. Le percentuali di cellule vive sono state calcolate a partire dal numero di cellule, considerando come 100% il numero di cellule non esposte alle NP (nei pozzetti "BK"). Le due dosi di NP sono state seminate al tempo "0" ed al tempo "48". Il tempo "-20" indica l'inizio dell'esperimento, venti ore prima della semina della prima dose.

6.4.3.1. NP-Si.

Le NP-Si da noi utilizzate sono state descritte nel Capitolo 5. Esse sono originariamente disperse in etanolo, pertanto, prima dell'utilizzo, è stato necessario ridisperderle in un mezzo non dannoso per le cellule. Infatti esse sono state ridisperse in acqua Milli-Q sterile.

Le altre diluizioni sono state poi preparate diluendo il campione tal quale, dopo la sua redispersione in acqua, nel terreno utilizzato per coltivare ciascun tipo cellulare. Queste diluizioni sono state incubate per 16 ore a 4°C prima degli esperimenti.

Le dosi utilizzate per gli esperimenti con le NP-Si sono descritte nel Paragrafo 6.4.2.1, mentre, di seguito, in Tabella 6.12 sono indicate le concentrazioni di silice, ed il numero di particelle all'interno di ciascun pozzetto, per ogni diluizione presenti nel pozzetto della piastra.

Tabella 6.12. Concentrazione di silice e NP-Si nei pozzetti.

Diluizione	mg/mL silice	n. particelle
D1	5,617	$9,11 \times 10^{11}$
D2	2,809	$4,56 \times 10^{11}$
D3	1,404	$2,28 \times 10^{11}$
D4	0,702	$1,14 \times 10^{11}$
D5	0,351	$5,70 \times 10^{10}$

Essendo state apportate delle diluizioni seriali, per preparare le diluizioni delle NP, la concentrazione è stata dimezzata di volta in volta, con il progredire del numero della diluizione.

In Figura 6.11 sono riportati due grafici. Quello a sinistra mostra la percentuale di cellule HEKa, metabolicamente attive, in ogni pozzetto, dopo esposizione alle diverse diluizioni di NP-Si. Il grafico a destra mostra, invece, il numero di cellule metabolicamente attive dopo esposizione alle NP.

Negli esperimenti con i cheratinociti, sono state seminate 5.000 cellule per pozzetto. Rispetto agli altri fenotipi cellulari, questa delle cellule HEKa è stata la densità di semina più bassa. Quindi, essendo le diluizioni delle NP-Si uguali per tutti i tipi cellulari, rispetto ai melanociti ed alle cellule tumorali, i cheratinociti hanno ricevuto, in proporzione, una dose maggiore di NP per ciascuna cellula.

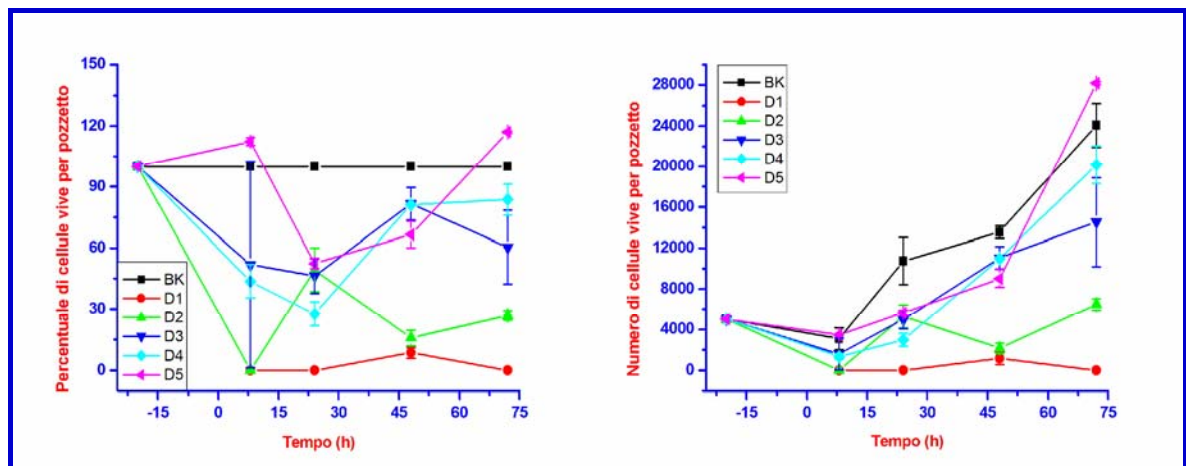


Figura 6.11. Percentuale (a sinistra) e numero (a destra) di cellule HEKa metabolicamente attive dopo l'esposizione alle diverse dosi di NP-Si.

I due grafici in Figura 6.11 mostrano due prospettive diverse degli stessi risultati. La D1, che è la più concentrata, è stata la dose che ha avuto gli effetti più tossici per le cellule. Infatti, sia nel grafico a sinistra che a destra, si nota che il numero delle cellule, dopo 8 h di esposizione alle NP, è pari a 0. In realtà, non tutte le cellule sono state uccise dall'esposizione alle NP, perché alle 48 h si ha di nuovo un aumento del numero di cellule, per poi tornare pari a 0 alle 72 h, cioè dopo la semina della seconda dose. La D2 segue, almeno per le prime 8 h, lo stesso andamento della D1: si è avuta una diminuzione drastica della percentuale e del numero di cellule, fino a 0, mentre alle 24 h il numero e la percentuale di cellule sono aumentati per poi diminuire, nuovamente, alle 48 ed alle 72 ore. Sempre in Figura 6.11, nei due grafici, con la D2 sia la percentuale che il numero di cellule è aumentato dopo la semina della seconda dose. La D3, D4, e D5 sembrano seguire l'andamento della crescita del BK, e questo si evince soprattutto dal grafico a destra in Figura 6.11. Anche la

D3 e la D4, come già visto per la D2 e la D1, nelle prime 8 h subiscono una diminuzione della percentuale, e numero, di cellule. Nel grafico della percentuale, questa diminuzione è osservabile fino alle 24 h, sia per la D3 che per la D4, mentre nel grafico a destra, il numero di cellule subisce una ripresa fino alle 72 ore. Le cellule esposte alla D3, nel grafico a sinistra, invece, dopo la semina della seconda dose paiono diminuire. Questo non è percepibile, invece, nel grafico a destra. Infine, le cellule esposte alla D5, la meno concentrata, addirittura nelle prime 8 h dell'esperimento sono cresciute più delle cellule non esposte alle NP (i.e., BK). Nel grafico a destra è interessante notare come nelle prime 8 h dell'esperimento anche la linea del BK subisca una diminuzione nel numero di cellule, ad indicare che una parte delle cellule, anche se non è esposta alle NP, non si attacca al fondo del pozzetto, o viene rimossa durante il lavaggio nei diversi passaggi dell'esperimento.

Gli effetti dell'aggiunta della seconda dose di NP (alle 48 h), come già accennato, non sono stati sempre gli stessi. Se si osserva il grafico a destra, in Figura 6.11, dopo l'aggiunta della seconda dose le cellule non sembrano risentire particolarmente degli effetti delle NP. Infatti si ha una diminuzione del numero di cellule soltanto per quelle esposte alla D1.

Si è osservata una certa linearità tra la percentuale o il numero di cellule morte e la concentrazione di NP a cui le cellule erano esposte. Infatti, in entrambi i grafici riportati in Figura 6.11 si nota che la mortalità più elevata si è ottenuta con la diluizione D1, e, a seguire, con la D2. Inoltre, nelle prime 48 h, si è osservata una mortalità più elevata nelle cellule esposte alla D4, rispetto alla D3; tuttavia, dalle 48 alle 72 ore, la crescita è stata superiore nelle cellule esposte alla D4. La D5, infine, è stata la diluizione che ha determinato la minore mortalità sulle cellule. Infatti, nelle prime 8 h, le cellule sono cresciute, in percentuale ed in numero, anche più del bianco, per poi diminuire dalle 24 alle 48 h. Nelle ultime 24 h dell'esperimento, c'è stata una ripresa della crescita che ha superato anche la percentuale ed il numero di cellule presenti nei pozzetti non esposti alle NP.

Le deviazioni standard in linea generale si sono mostrate inferiori al 5% della media (media aritmetica dei triplicati), ma in taluni casi si sono avuti valori di deviazione standard elevati, soprattutto per le cellule esposte alla D3 (e.g., 8 h, 72 h). Questo potrebbe essere dovuto al fatto che le cellule in due pozzetti diversi, ma esposte alla stessa diluizione ed alla stessa dose, non abbiano reagito in uguale maniera alla presenza delle NP, di conseguenza restituendo risultati di tossicità differenti.

La valutazione statistica di questi risultati si trova nell'appendice. Per quanto riguarda gli esperimenti condotti con il mezzo disperdente le NP-Si (acqua), sebbene gli esperimenti siano stati eseguiti non si riportano per alcune questioni sorte durante la scrittura della tesi e che non abbiamo potuto verificare con un tecnico specializzato nel tempo della consegna di questo documento.

In Figura 6.12. sono riportati due grafici. Quello a sinistra mostra la percentuale di cellule HEMA-LP, metabolicamente attive, in ogni pozzetto, dopo esposizione alle diverse diluizioni di NP-Si. Il grafico a destra mostra, invece, il numero di cellule metabolicamente attive dopo esposizione alle NP.

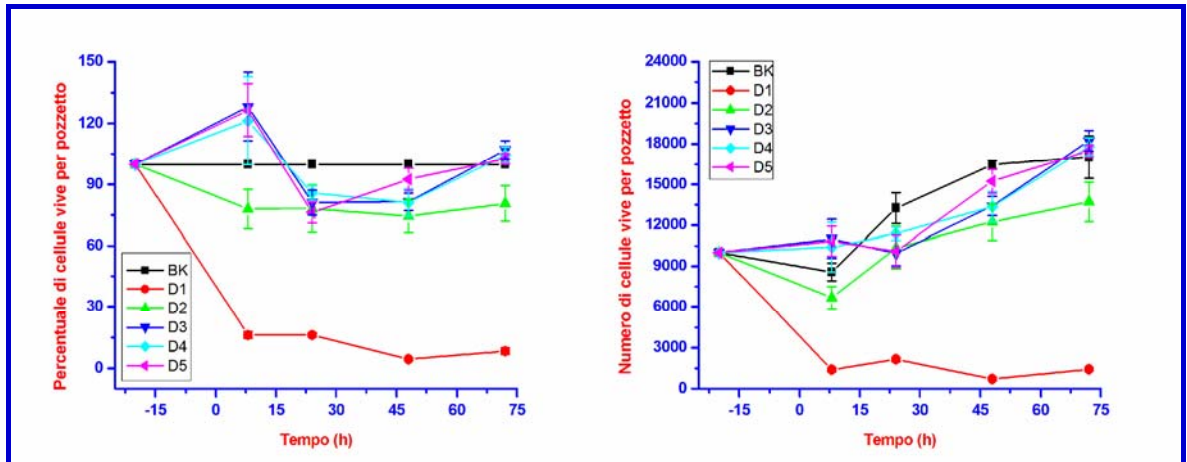


Figura 6.12. Percentuale (a sinistra) e numero (a destra) di cellule HEMA-LP metabolicamente attive dopo l'esposizione alle diverse dosi di NP-Si.

Negli esperimenti con i melanociti, sono state seminate 10.000 cellule per pozzetto. Questo numero di cellule è pari al doppio rispetto a quello seminato nei pozzetti per gli esperimenti con i cheratinociti.

I due grafici in Figura 6.12 mostrano, quindi, due prospettive diverse degli stessi risultati. La D1, che è la diluizione con una maggiore concentrazione di silice (i.e., TQ), è stata la diluizione che ha avuto gli effetti più tossici per le cellule, rispetto alle altre diluizioni utilizzate. Nei grafici a sinistra e a destra (Fig. 6.12) si nota che utilizzando la D1, il numero delle cellule, dopo 8 h di esposizione, diminuisce drasticamente (la percentuale di cellule rimaste vitali è del $16,20 \pm 1,60$ %), fino ad arrivare quasi a 0, alle 48 h ($4,7 \pm 0,67$ %). L'effetto della D2 sulle cellule segue, nel tempo, lo stesso andamento della D1, ma esplicitando una tossicità nettamente inferiore. Infatti, la più bassa percentuale di cellule vive si ottiene alle 48 h, e corrisponde al $74,30 \pm 8,10$ % (percentuale calcolata rispetto al BK, grafico a sinistra). La D3, D4, e D5 invece, hanno un effetto molto diverso da D1 e D2. Infatti, nelle prime 8 h, si ha una crescita cellulare addirittura superiore a quella riscontrata nelle cellule non esposte a NP. Nelle ore successive, considerando sempre le diluizioni D3, D4, e D5, si è avuta una diminuzione della percentuale e del numero di cellule metabolicamente attive, come se l'effetto della dose di NP avesse esplicitato un effetto ritardato sulle cellule. Inoltre, dopo la semina della seconda dose (48 h), si è avuta nuovamente una ripresa della crescita delle cellule, tanto da superare, in percentuale e numero, le cellule presenti nei pozzetti non trattati.

Come già osservato anche nel grafico delle HEKa, a destra in Figura 6.11, nelle prime 8 h anche le cellule HEMa-LP (Fig. 6.12) non esposte alle NP (i.e., “BK”) hanno mostrato una decrescita. È curioso anche che, al contrario, le diluizioni D3, D4, e D5 non abbiano mostrato questa decrescita iniziale, ma abbiano risentito nelle ore successive degli effetti delle NP.

La semina della seconda dose, di nessuna diluizione, sembra non aver causato un effetto tossico marcato sulle cellule, infatti non si è mai avuta una diminuzione della percentuale o del numero di cellule. Infatti, dopo le 48 h, non si è mai osservata una decrescita cellulare, ma anzi, nel caso delle cellule esposte a D1, si è avuta una ripresa.

In linea generale, si può affermare che mentre nelle HEKa (Fig. 6.11) la D1 era quella che esercitava, assieme alla D2, il maggiore effetto tossico, nel caso delle HEMa-LP (Fig. 6.12), invece l'effetto della D1 è stato marcatamente superiore rispetto alle altre diluizioni. Anche nella Figura 6.12. (così come in Fig. 6.11., per i cheratinociti) si è osservata una certa linearità tra la mortalità cellulare e la diluizione di NP utilizzata: infatti, cellule esposte alla D1 sono state quelle che maggiormente hanno risentito della presenza delle NP, e, a seguire, quelle esposte alla D2. Durante le prime 24 h, gli effetti delle D3, D4, e D5 sono stati simili, mentre dopo le 24 h le cellule esposte alla D5 hanno mostrato una maggiore ripresa. Dopo 72 h di esposizione alle NP, tuttavia, la percentuale ed il numero di cellule esposte a D3, D4, e D5 sono risultati molto vicini tra loro.

Non sono state osservate (Fig. 6.12) delle deviazioni standard elevate come quelle presenti in presenti in Fig. 6.11, ma si sono spesso ottenuti dei valori superiori al 5% della media. Questo è stato osservato soprattutto per le cellule esposte alla D2, ed in misura minore, per quelle esposte alla D4. Tali deviazioni standard si sono mantenute, in tutti i casi, al di sotto del 20 % della media.

La valutazione statistica di questi risultati si trova nell'appendice. Per quanto riguarda gli esperimenti condotti con il mezzo disperdente le NP-Si (acqua), sebbene gli esperimenti siano stati eseguiti non si riportano per alcune questioni sorte durante la scrittura della tesi e che non abbiamo potuto verificare con un tecnico specializzato nel tempo della consegna di questo documento.

In Figura 6.13 sono riportati i grafici che mostrano i risultati ottenuti dall'esposizione delle cellule Colo-38 alle NP-Si: a sinistra, le percentuali di cellule Colo-38 metabolicamente attive dopo esposizione alle diverse diluizioni di NP (in ogni pozzetto), a destra, il numero di cellule.

Se negli esperimenti con le HEKa e con le HEMa-LP erano state seminate, rispettivamente, 5.000 e 10.000 cellule per pozzetto, nelle Colo-38 la densità di semina è pari a 50.000 cellule per pozzetto. Di conseguenza, ogni cellula avrà a disposizione, rispetto alle HEKa ed alle HEMa-LP, una quantità di NP 10 volte e 5 volte inferiore, rispettivamente, essendo, le diluizioni utilizzate di NP-Si, sempre uguali per tutti e tre i fenotipi cellulari.

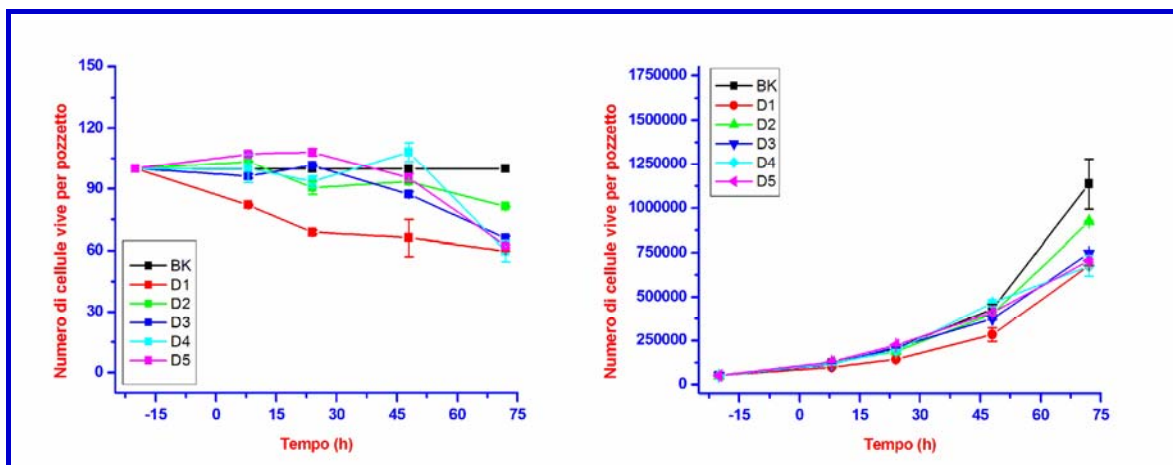


Figura 6.13. Percentuale (a sinistra) e numero (a destra) di cellule Colo-38 metabolicamente attive dopo l'esposizione alle diverse dosi di NP-Si.

Anche nel caso delle Colo-38, come osservato per le HEKa (Fig. 6.11) e le HEMa-LP (Fig. 6.12) è stata la D1 ad avere gli effetti più tossici per le cellule. Tuttavia, gli effetti sono stati più blandi rispetto a ciò che si è osservato nei fenotipi sani. Infatti, osservando il grafico a sinistra in Figura 6.13, si nota che la percentuale di cellule metabolicamente attive si abbassa fino ad un minimo del $59,75 \pm 0,03 \%$, per la D1, alle 72 h. Nelle HEKa ed HEMa-LP (Fig. 5.11 e 5.12) per le cellule esposte alla D1 si era registrata, rispettivamente, una vitalità pari a 0, alle 8 h, e al $4,7 \pm 0,67 \%$, alle 48 h. Dal grafico a sinistra, in Figura 6.13, si osserva che, la percentuale di cellule metabolicamente attive esposte alla D1 si è ridotta durante il tempo dell'esperimento fino ad arrivare ad un minimo di $59,75 \pm 0,03 \%$. Anche nel grafico a destra, la D1 appare come la diluizione che ha determinato la maggiore mortalità cellulare. Per le Colo-38, la D2 non ha mostrato di essere la diluizione seconda in tossicità, alla D1, come si era commentato per le HEKa (Fig. 6.11) e le HEMa-LP (Fig. 6.12). Infatti, le percentuali di cellule metabolicamente attive, esposte alla D3 e D4, alle 8 h, sono più basse rispetto alla percentuale di cellule vive misurata con la D2, e sono, rispettivamente, $96,21 \pm 0,93$, $100,19 \pm 7,05$, e $103,39 \pm 0,28$. Alle 24 h, la percentuale di cellule metabolicamente attive, esposte alla D2, diventa inferiore a quella della D3 e D4.

Nel caso delle Colo-38 non sembra ci sia una linearità tra la mortalità cellulare la concentrazione delle NP a cui le cellule sono esposte. A parte la D1, che si è detto essere la più citotossica, per le prime 8 h è stato osservato che D3 e D4 determinano la morte di una percentuale maggiore di cellule rispetto a D2. Inoltre, anche dalle 48 alle 72 ore, la D2 si mostra meno tossica di D3, D4, e D5. La D5 nelle prime 48 h non aveva mostrato una particolare citotossicità, ma, anzi, la crescita cellulare si era mostrata superiore alle cellule non esposte a NP. Invece, nelle ultime 24 h, la seconda dose ha determinato una diminuzione della percentuale di cellule vive fino al $62,15 \pm 0,73 \%$.

Gli effetti dell'aggiunta della seconda dose di NP (alle 48 h), in tutte e 5 le diluizioni, ha determinato una diminuzione della percentuale e numero di cellule (grafico a sinistra, Fig. 6.13). Nel grafico a destra, invece, che riporta il numero di cellule metabolicamente attive, dalle 48 alle 72 h non sembra che ci sia stata una decrescita, tuttavia si può notare che, rispetto alle cellule non esposte a NP (BK), le altre cellule esposte alle diverse diluizioni sono cresciute in minore misura. In effetti, quindi, si è notata una diversa risposta dalle cellule sane e quelle tumorali all'esposizione alle NP. Questo può essere spiegato considerando, innanzi tutto, il fatto che la concentrazione di cellule nei pozzetti, nelle piastre delle Colo-38 è nettamente superiore a quella delle piastre in cui sono presenti le HEKa e le HEMa-LP, come si è già accennato precedentemente. Questo si traduce anche col fatto che ogni cellula tumorale avrà a "disposizione" un numero minore di particelle rispetto alle cellule sane, che quindi esplicherà un effetto tossico minore. Infatti, a sostegno di questa ipotesi c'è il fatto che la citotossicità esplicita dalle NP-Si diminuisce nel passare dalle HEKa alle HEMa-LP, ed infine alle Colo-38, cioè diminuisce con l'aumentare della concentrazione di semina. Inoltre, si è visto che le Colo-38 sono più resistenti delle HEKa e delle HEMa-LP agli stress meccanici e termici: questo è stato notato soprattutto valutando la percentuale di recovery dopo scongelamento, che, nelle Colo-38, è sempre stata più alta che nelle altre linee cellulari. È possibile, quindi, che le HEKa e le HEMa-LP siano più suscettibili, ad esempio, anche al semplice cambio di terreno nei pozzetti o alla semina delle dosi di NP, rispetto alle Colo-38.

Le deviazioni standard si sono mostrate generalmente inferiori al 5 % della media (Fig. 6.13), eccezione fatta per quella ottenuta alle 48 h, in corrispondenza delle cellule esposte alla D1 (i.e., 13,55 % della media), e quella misurata in corrispondenza del numero di cellule nel BK, alle 72 h (i.e., 12,63 % della media).

La valutazione statistica di questi risultati si trova nell'appendice. Per quanto riguarda gli esperimenti condotti con il mezzo disperdente le NP-Si (acqua), sebbene gli esperimenti siano stati eseguiti non si riportano per alcune questioni sorte durante la scrittura della tesi e che non abbiamo potuto verificare con un tecnico specializzato nel tempo della consegna di questo documento.

6.4.3.2. NP-GS

Le NP-GS sono state testate, anch'esse, in 5 diverse diluizioni. Nel caso di queste particelle, la D1 non è stata ridispersa in acqua, in quanto non è stato possibile ottenere il pellet dopo centrifuga (fino ad una velocità massima di 20.016 g). Le NP, in ogni caso, si ritrovano disperse in un mezzo acquoso già all'origine. Le altre diluizioni sono state preparate in terreno, a partire dalla D1, utilizzando il terreno di coltura di ciascuna linea cellulare. Come indicato precedentemente, le dosi da usare vengono preparate la sera prima dell'inoculo, e quindi rimangono ca. 16 ore a 4°C prima di

essere utilizzate. Le concentrazioni utilizzate per gli esperimenti con le NP-GS sono descritte nel Paragrafo 6.4.2.1, mentre, di seguito, in Tabella 6.13, verranno indicate le concentrazioni d'oro, all'interno di ciascun pozzetto, per ogni diluizione. Essendo state apportate delle diluizioni seriali, per preparare le diluizioni delle NP, la concentrazione è stata dimezzata di volta in volta, con il progredire del numero della diluizione.

Tabella 6.13. Concentrazione di oro e NP-GS nei pozzetti.

Diluizione	mg/mL	n. particelle
D1	0,057	$4,68 \times 10^{14}$
D2	0,028	$2,34 \times 10^{14}$
D3	0,014	$1,17 \times 10^{14}$
D4	0,007	$5,86 \times 10^{13}$
D5	0,004	$2,93 \times 10^{13}$

In Figura 6.14 sono riportati due grafici. Quello a sinistra mostra la percentuale di cellule HEKa, metabolicamente attive, in ogni pozzetto, dopo esposizione alle diverse diluizioni di NP-GS. Il grafico a destra mostra, invece, il numero di cellule metabolicamente attive dopo esposizione alle NP.

Come si è già discusso nei commenti alla Figura 6.11, negli esperimenti con le cellule HEKa, sono state seminate 5.000 cellule per pozzetto. Rispetto agli altri fenotipi cellulari, questa delle cellule HEKa è stata la densità di semina più bassa. La concentrazione d'oro a cui le cellule si trovano esposte, tuttavia, è inferiore a quella della silice (rispettivamente Tab. 6.13 vs. Tab. 6.12).

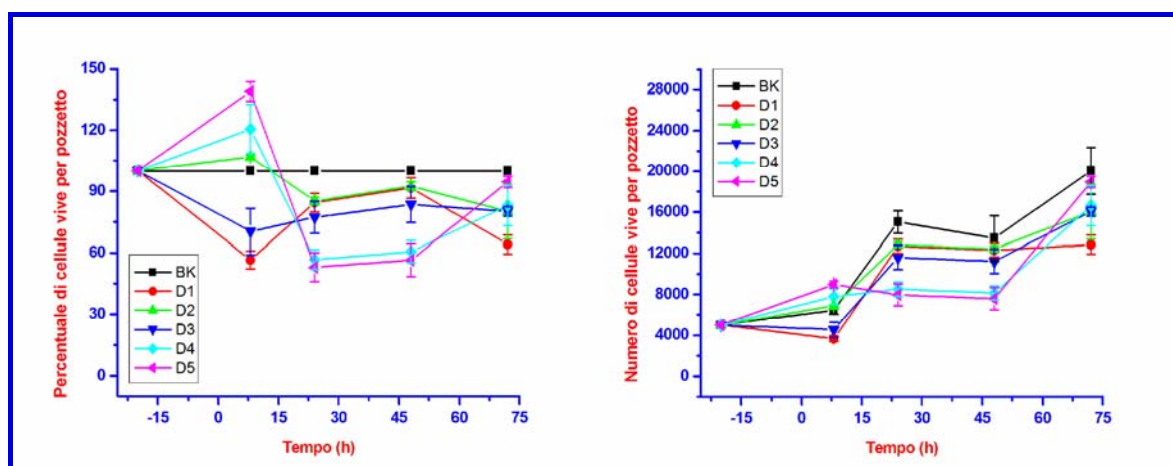


Figura 6.14. Percentuale (a sinistra) e numero (a destra) di cellule HEKa metabolicamente attive dopo l'esposizione alle diverse dosi di NP-GS.

Confrontando i due grafici in Figura 6.14 si è osservato che, nelle prime 8 h, gli effetti sulla capacità metabolica più elevati si sono avuti nelle cellule esposte alla D1, la più concentrata. Dopo le prime ore, le cellule esposte a questa diluizione hanno mostrato, invece, una attività metabolica superiore anche a quelle esposte a diluizioni inferiori di NP-GS (i.e., D3, D4, e D5), per poi subire una decrescita dopo le 48 h, quindi dopo l'aggiunta della seconda dose. Nelle cellule esposte alla D2, meno concentrata della D1, durante le prime 8 h dell'esperimento si è osservata una crescita superiore a quella delle cellule non esposte alle NP-GS. Nelle ore successive, le cellule esposte alla D2 sembrano aver risentito maggiormente della presenza delle NP-GS, infatti alle 24 h si è avuta una percentuale di cellule vive pari all' $85,16 \pm 1,88$ % rispetto al BK, del $92,39 \pm 2,10$ % alle 48 h, fino ad arrivare all' $80,02 \pm 13,20$ % alle 72 h, con due dosi di NP. La D3, invece, pare esplicare un effetto tossico maggiore rispetto alla D2. Sia dal grafico a sinistra, che da quello a destra in Figura 6.14, si nota infatti che sia la percentuale che il numero di cellule metabolicamente attive sono inferiori rispetto alla D2, sebbene alla 72^{ma} ora la quantità di cellule metabolicamente attive, esposte alle D2 e alla D3, coincidano. Le cellule esposte alla D4 e D5, invece, mostrano un comportamento diverso da quelle esposte alle altre diluizioni, in quanto, sebbene nelle prime 15 h si abbia una crescita cellulare anche superiore a quella riscontrata nelle cellule BK, in effetti fino alle 48 h la percentuale ed il numero di cellule metabolicamente attive diminuisce drasticamente per riprendersi nuovamente nelle ultime 24 h. Nel grafico a destra, in Figura 6.14, le cellule non esposte alle NP-GS non hanno mostrato la decrescita che era stata osservata nelle prime 8 h e nel corrispondente grafico in Figura 5.11, ma soltanto le cellule esposte a D1 e D4 sono diminuite in numero nelle prime 15 ore, mostrando di risentire, quindi, della presenza delle NP-GS.

Gli effetti dell'aggiunta della seconda dose di NP-GS, alle 48 h, non sono stati sempre gli stessi per tutte le diluizioni. Infatti, ciò che si osserva dal grafico a sinistra, in Figura 6.14 è che la percentuale di cellule metabolicamente attive diminuisce, rispetto alla 48^{ma} ora, per le cellule esposte alla D1, D2, e D3, mentre aumenta per le cellule esposte a D3 e D4. Di conseguenza, le cellule esposte alle tre dosi più concentrate hanno risentito maggiormente dell'effetto della seconda dose di NP-GS.

Non si è osservata una corrispondenza diretta tra la capacità metabolica e la concentrazione delle NP-GS a cui le cellule sono state esposte. Infatti, se è vero che la D1 ha esplicato la maggiore tossicità nelle prime 8 h, successivamente le cellule esposte a questa stessa concentrazione di NP-GS hanno mostrato una ripresa fino alle 48 h. Considerando sempre le prime 8 h, la dose che ha esplicato un effetto più tossico, dopo la D1, è stata la D3, e non la D2 come ci si sarebbe aspettati. Tra le 24 e le 48 h, invece, sono le diluizioni inferiori (i.e., D4 e D5) ad esplicare l'effetto tossico maggiore sulle cellule, e addirittura la D5 si è rivelata più tossica della D4. Successivamente, nelle ultime 48 h di esposizione, le cellule esposte alla D5 hanno mostrato una ripresa nella attività me-

tabolica, tanto da misurare il $94,50 \pm 2,80$ % di cellule metabolicamente attive. Per le altre diluizioni, invece, alla 72^{ma} ora è stata riscontrata una percentuale di cellule metabolicamente attive pari al $64,05 \pm 4,65$ in corrispondenza della D1; in presenza delle diluizioni D2, D3, e D4, invece, si sono misurate delle percentuali molto vicine tra loro, rispettivamente $80,02 \pm 13,20$, $80,08 \pm 2,28$, e $82,95 \pm 9,73$ %.

Le deviazioni standard sono risultate spesso inferiori al 5 % della media aritmetica calcolata tra i triplicati, ma, altre volte, si sono ottenuti valori più alti. Non si è osservata una corrispondenza tra valori di deviazione standard elevati e diluizioni testate.

La valutazione statistica di questi risultati si trova nell'appendice. Per quanto riguarda gli esperimenti condotti con il mezzo disperdente le NP-GS (mezzo disperdente acquoso), sebbene gli esperimenti siano stati eseguiti non si riportano per alcune questioni sorte durante la scrittura della tesi e che non abbiamo potuto verificare con un tecnico specializzato nel tempo della consegna di questo documento.

I grafici riportati in Figura 6.15 mostrano i risultati ottenuti dopo esposizione delle cellule HEMa-LP alle NP-GS. A sinistra, viene riportata la percentuale, e a destra il numero, di cellule metabolicamente attive in ciascun pozzetto.

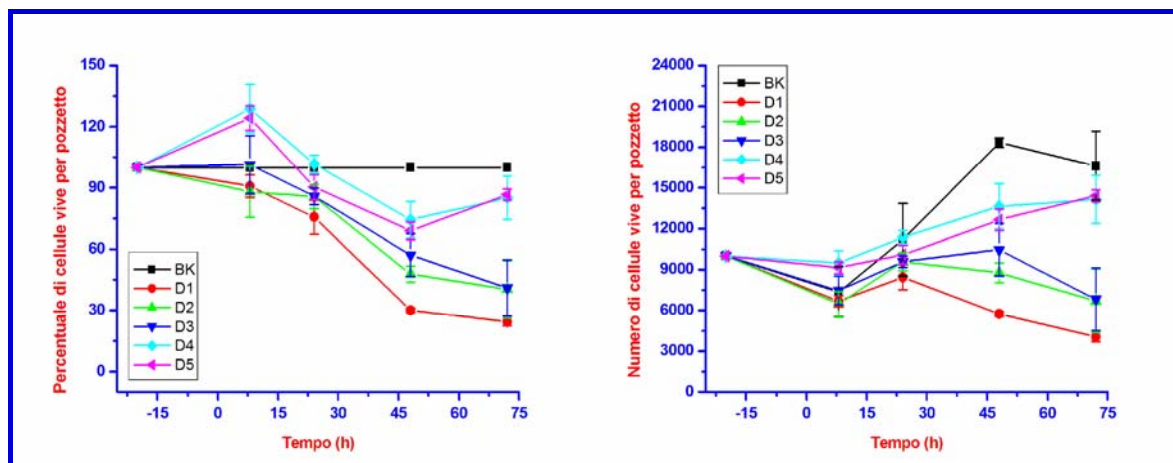


Figura 6.15. Percentuale (a sinistra) e numero (a destra) di cellule HEMa-LP metabolicamente attive dopo l'esposizione alle diverse dosi di NP-GS.

In questi esperimenti, essendo state utilizzate le cellule HEMa-LP, la densità di semina è stata di 10.000 cellule per pozzetto, cioè il doppio rispetto a quella delle HEKa: di conseguenza, ogni cellula ha avuto a disposizione la metà della quantità d'oro e la metà del numero di particelle, rispetto ai cheratinociti.

Le cinque diluizioni testate hanno avuto un effetto diverso. Dai due grafici in Figura 6.15 si nota che dopo le prime 8 h la D1 e la D2 hanno esercitato una azione comparabile ($90,78 \pm 5,55$ % per le cellule esposte alla D1, e dell' $87,97 \pm 12,44$ % per le cellule esposte alla D2). Nelle ore successive, tuttavia, si è osservata una maggiore mortalità cellulare per le cellule esposte alla D1, rispetto alla D2. L'esposizione delle cellule alla D3, invece, nelle prime 8 h ha portato ad una attività metabolica comparabile a quella osservata nelle cellule non trattate ($101,35 \pm 14,20$ %, grafico a sinistra, Fig. 6.15), per poi avere, nelle ore successive, una diminuzione della percentuale e del numero di cellule metabolicamente attive, fino ad ottenere, alle 72 h, dei risultati molto vicini a quelli osservati in corrispondenza delle cellule esposte alla D2 (i.e., $40,37 \pm 14,04$ % per D2, $41,08 \pm 13,83$ % per D3). Le cellule esposte alla D4 ed alla D5, invece, hanno mostrato, nelle prime 20 ore dell'esperimento, una attività metabolica superiore rispetto a quella osservata nelle cellule non esposte alle NP-GS. Nelle ore successive, invece, le cellule hanno mostrato di risentire della presenza delle NP-GS e si è avuta una diminuzione della percentuale e del numero di cellule metabolicamente attive fino alle 48 h, mentre dalle 48 alle 72 h è stata osservata una ripresa. Inoltre, si è osservato (Fig. 6.15, destra) che nelle prime 20 h dell'esperimento si è avuta una diminuzione del numero di cellule rispetto al numero iniziale. Questo si è osservato non solo per le cellule esposte alle diverse diluizioni di NP-GS, ma anche per le cellule "BK". Questo, era stato osservato anche in Figura 6.12 in cui erano mostrati i risultati delle HEMa-LP esposte alle NP-Si. Il motivo per cui si è avuta questa diminuzione del numero di cellule nelle prime 20 ore dell'esperimento, può essere dovuto al fatto che non tutte le cellule seminate inizialmente si sono attaccate al pozzetto, per cui in parte sono andate perse; inoltre, è possibile che alcune cellule si siano staccate dal pozzetto durante la fase di semina delle NP, o durante il cambio di terreno ed il lavaggio.

In seguito all'aggiunta della seconda dose, alle 48 h, si sono avuti effetti differenti sulle cellule, a seconda della diluizione alla quale esse erano esposte. Dai grafici a sinistra e a destra, in Figura 6.15, emerge che nell'intervallo di tempo tra le 48 e le 72 h si è avuta una diminuzione della percentuale e del numero di cellule in ciascun pozzetto, rispetto alle 48 h, per le cellule esposte alla D1, D2, e D3. Invece, nelle cellule esposte a D4 e D5, si è osservato un trend di ripresa o una vera ripresa, per cui la percentuale di cellule metabolicamente attive esposte alla D4 è passata da $74,34 \pm 9,02$ % alle 48 h, a $85,08 \pm 10,68$ % alle 72 h; mentre per le cellule esposte alla D5 si è passati da $68,93 \pm 4,34$ % a $86,66 \pm 2,70$ %. Nel grafico a destra, in Figura 6.15, si nota che alle 72 h si ha una diminuzione anche del numero delle cellule non esposte alle NP-GS.

La diminuita attività metabolica sembra sia stata proporzionale alla concentrazione di oro presente all'interno dei pozzetti, infatti gli effetti maggiormente tossici sono stati esplicitati dalla D1, la più concentrata. A seguire, la D2. La D3 ha esplicitato effetti meno tossici della D2, ma alla 72^{ma} ora sono stati calcolati una percentuale ed un numero di cellule molto vicini a quelli ottenuti per le

cellule esposte alla D2. La D4 e la D5, invece, non hanno mostrato di esplicitare effetti tossici proporzionali alla loro concentrazione di oro, in quanto la D4, più concentrata, si è mostrata meno tossica della D5 anche se comparabile. Alla 72^{ma}, tuttavia, come nel caso della D2 e D3, anche per la D4 e D5 si è ottenuta una percentuale ed un numero di cellule metabolicamente attivo molto simile (i.e., $85,08 \pm 10,68 \%$, per D4, $86,66 \pm 2,70 \%$ per D5).

Le deviazioni standard calcolate sulla media di valori si sono mostrate generalmente superiori al 5 % della media. Le deviazioni standard più elevate, in termini di percentuale rispetto alla media, sono state ottenute in corrispondenza delle cellule esposte alla D2 e alla D3. Questo può essere dovuto al fatto che non in tutti i pozzetti le cellule hanno reagito allo stesso modo alla presenza delle NP-GS, ed inoltre la stessa crescita delle cellule può non essere omogenea all'interno dei diversi pozzetti, tanto che delle deviazioni standard superiori al 5 % della media sono state misurate anche per le cellule non esposte alle NP-GS.

La valutazione statistica di questi risultati si trova nell'appendice. Per quanto riguarda gli esperimenti condotti con il mezzo disperdente le NP-GS (mezzo disperdente acquoso), sebbene gli esperimenti siano stati eseguiti non si riportano per alcune questioni sorte durante la scrittura della tesi e che non abbiamo potuto verificare con un tecnico specializzato nel tempo della consegna di questo documento.

I grafici riportati in Figura 6.16 mostrano due diversi aspetti degli stessi risultati. A sinistra, è mostrata la percentuale di cellule Colo-38 metabolicamente attive, in ogni pozzetto, dopo esposizione alle diverse diluizioni di NP-GS. Il grafico a destra mostra, invece, il numero di cellule metabolicamente attive dopo esposizione alle NP-GS.

Negli esperimenti con le cellule Colo-38, sono state seminate 50.000 cellule per pozzetto. Rispetto agli altri fenotipi cellulari, questa delle cellule Colo-38 è stata la densità di semina più alta. Quindi, essendo le diluizioni delle NP-GS uguali per tutti i tipi cellulari, rispetto ai cheratinociti ed ai melanociti, le Colo-38 hanno ricevuto, in proporzione, una dose inferiore di NP per ciascuna cellula.

Gli effetti dell'esposizione delle cellule alle diverse dosi di NP-GS sono mostrati nei due grafici in Figura 6.16. Osservando sia il grafico a sinistra, che quello a destra, si osserva che la D1, che è la dose più concentrata, è stata quella che ha avuto gli effetti più tossici per le cellule. Soprattutto dal grafico a sinistra si evince che le cellule esposte alla D1 subiscono un decremento fino ad arrivare al $24,74 \pm 0,61 \%$ rispetto alle cellule non esposte alle NP-GS.

Le cellule esposte alla D2, invece, nelle prime 20 h hanno mostrato una crescita simile a quella riscontrata nelle cellule non esposte alle NP-GS, e dopo 8 h di esposizione alle NP-GS, infatti, il $99,06 \pm 7,99 \%$ delle cellule era metabolicamente attivo. Nelle ore successive, tuttavia, le cellule

esposte alla D2 paiono aver risentito della presenza delle NP-GS, pertanto si è osservata una diminuzione della percentuale di crescita delle cellule rispetto a quelle non esposte alle NP-GS.

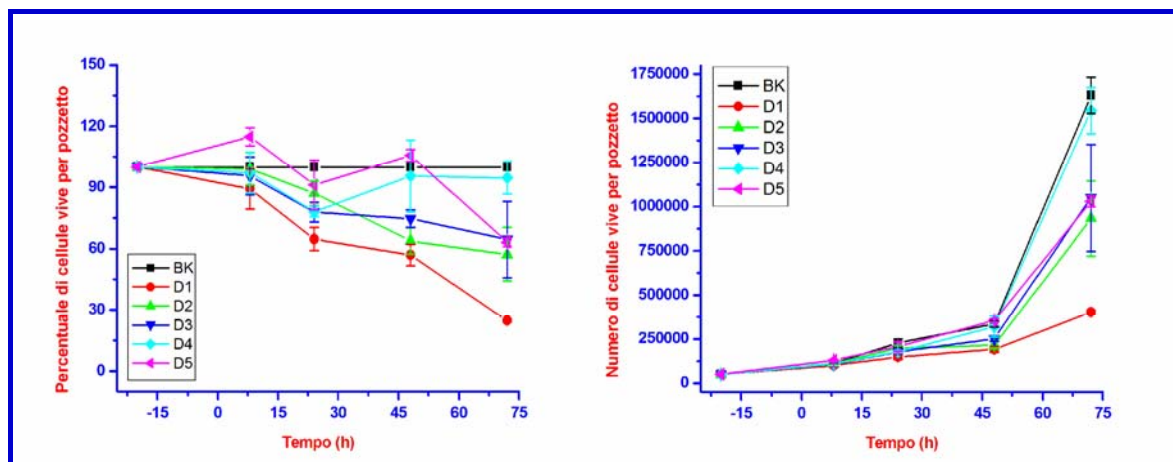


Figura 6.16. Percentuale (a sinistra) ed il numero (a destra) di cellule Colo-38 metabolicamente attive dopo l'esposizione alle diverse dosi di NP-GS.

La D3 e la D4, per le prime 24 ore dell'esperimento, paiono aver sortito gli stessi effetti sulle cellule, in quanto le linee che descrivono la percentuale di cellule metabolicamente attive (grafico a sinistra, Fig. 6.16) sono sovrapposte, e le percentuali corrispondono a $77,87 \pm 4,77 \%$ per D3 e $78,02 \pm 2,54$ per D4, alle 24 h. Nelle ore successive, tuttavia, la D3 sembra esplicare un effetto sulla attività metabolica superiore a quella della D4: questo è percepibile non solo dal grafico a sinistra, ma anche nel grafico a destra della Figura 6.16, in cui, dalle 24 alle 72 ore, si ha un numero inferiore di cellule metabolicamente attive esposte alla D3, rispetto a quelle esposte alla D4. Osservando il grafico a sinistra, in Figura 6.16 si è notato che la D5, nelle prime 8 h dell'esperimento non sembra generare sulle cellule un effetto particolarmente negativo, tanto che si è osservata una percentuale di cellule metabolicamente attive superiore a quella delle cellule non esposte alle NP-GS. Dopo le prime 20 h, tuttavia, si è avuta una diminuzione del numero e della percentuale delle cellule metabolicamente attive, fino al $91,11 \pm 12,38 \%$. È seguita una ripresa della attività metabolica, fino alle 48 h, e poi nuovamente un calo tra le 48 e le 72 h (quindi successivamente alla somministrazione della seconda dose) fino ad una percentuale del $63,09 \pm 1,90 \%$. Questa percentuale è simile a quella ottenuta in corrispondenza dell'esposizione delle cellule alla D3 (i.e., $64,39 \pm 18,56$). Nel caso delle Colo-38, tuttavia, non si è osservata una diminuzione del numero di cellule (grafico a destra, Fig. 6.16), e non si era osservata nemmeno nel caso dell'esposizione delle Colo-38 alle NP-Si (Fig. 6.13)

L'aggiunta della seconda dose ha determinato effetti diversi a seconda della diluizione a cui le cellule sono state esposte. In linea generale, si può affermare che si è osservata, per tutte le dilui-

zioni, una diminuzione della percentuale di cellule metabolicamente attive. Questa diminuzione c'è stata, in misura superiore rispetto alle altre, per la D1. A seguire, effetti più blandi sono stati ottenuti con la D2, e poi con la D5 e la D3. In particolare, sono state misurate delle percentuali di cellule metabolicamente attive, alle 72 h, molto simili tra quelle esposte alla D5 e alla D3. Rispettivamente, le cellule metabolicamente attive esposte alla D5 erano il $63,09 \pm 1,90$ %, mentre quelle esposte alla D3 erano il $64,39 \pm 18,56$ %. Le cellule esposte alla D4, infine, sembrano essere quelle che meno hanno risentito della semina della seconda dose. Infatti, se alle 48 h le cellule metabolicamente attive erano il $95,51 \pm 17,68$ %, alle 72 h è stata riscontrata una percentuale pari al $94,71 \pm 8,06$ %.

Non si è osservata una vera e propria corrispondenza tra la concentrazione d'oro presente nei pozzetti e l'attività metabolica. Infatti, nelle prime 48 ore i dati sono molte volte simili. Inoltre, dopo l'aggiunta della seconda dose, alla 72^{ma} ora la correlazione concentrazione-risposta è invertita per le D4 e D5.

Per la maggior parte delle volte, le deviazioni standard si sono mostrate inferiori al 5 % della media (media aritmetica dei triplicati), ma in taluni casi si sono avuti valori di deviazione standard elevati, soprattutto per le cellule esposte alla D3 e alla D4, alle 48 e alle 72 h. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che le cellule in due pozzetti diversi, ma esposte alla stessa diluizione ed alla stessa dose, non abbiano reagito in uguale maniera alla presenza delle NP, di conseguenza restituendo risultati di tossicità differenti.

La valutazione statistica di questi risultati si trova nell'appendice. Per quanto riguarda gli esperimenti condotti con il mezzo disperdente le NP-GS (mezzo disperdente acquoso), sebbene gli esperimenti siano stati eseguiti non si riportano per alcune questioni sorte durante la scrittura della tesi e che non abbiamo potuto verificare con un tecnico specializzato nel tempo della consegna di questo documento.

6.4.3.3. *NP-Si)GS*

Le NP-Si)GS sono state testate, anch'esse, in 5 diverse diluizioni. Il pellet ottenuto dopo centrifuga è stato ridisperso in acqua Milli-Q per ottenere il campione tal quale (D1). Le diluizioni sono state preparate a partire dalla D1, in terreno, utilizzando il mezzo di coltura col quale sono stati coltivati i singoli fenotipi cellulari. Le dosi utilizzate per gli esperimenti con le NP-Si)GS sono descritte nel Paragrafo 6.4.2.1 mentre, di seguito, in Tabella 6.14 verranno indicate le concentrazioni di silice e di oro per mL, all'interno di ciascun pozzetto, per ogni diluizione. Questi valori devono essere presi come una stima in quanto sono calcoli teorici non confermati da altre analisi

Tabella 6.14. Concentrazione di silice, oro, e NP nei pozzetti.

Diluizione	mg/mL silice	n. particelle Si	mg/mL oro	n. particelle GS
D1	0,110	$2,14 \times 10^{14}$	0,055	$4,55 \times 10^{14}$
D2	0,055	$1,07 \times 10^{14}$	0,027	$2,27 \times 10^{14}$
D3	0,028	$5,34 \times 10^{13}$	0,014	$1,14 \times 10^{14}$
D4	0,014	$2,67 \times 10^{13}$	0,007	$5,68 \times 10^{13}$
D5	0,007	$1,34 \times 10^{13}$	0,003	$2,84 \times 10^{13}$

La Tabella 6.14 riporta la concentrazione di silice e oro ed il numero di NP-Si e GS presente nel pozzetto, per ciascuna diluizione. Essendo state apportate delle diluizioni seriali, per preparare le diluizioni delle NP, la concentrazione è stata dimezzata di volta in volta, con il progredire del numero della diluizione.

I grafici riportati in Figura 6.17 mostrano due diversi aspetti degli stessi risultati. A sinistra, è mostrata la percentuale di cellule HEKa metabolicamente attive, in ogni pozzetto, dopo esposizione alle diverse diluizioni di NP-Si)GS. Il grafico a destra mostra, invece, il numero di cellule metabolicamente attive dopo esposizione alle NP-Si)GS.

Negli esperimenti con le cellule HEKa, sono state seminate 5.000 cellule per pozzetto. Rispetto agli altri fenotipi cellulari, questa delle cellule HEKa è stata la densità di semina più bassa. Quindi, essendo le diluizioni delle NP-Si)GS uguali per tutti i tipi cellulari, rispetto ai melanociti ed alle cellule tumorali, le HEKa hanno ricevuto, in proporzione, una dose superiore di NP per ciascuna cellula.

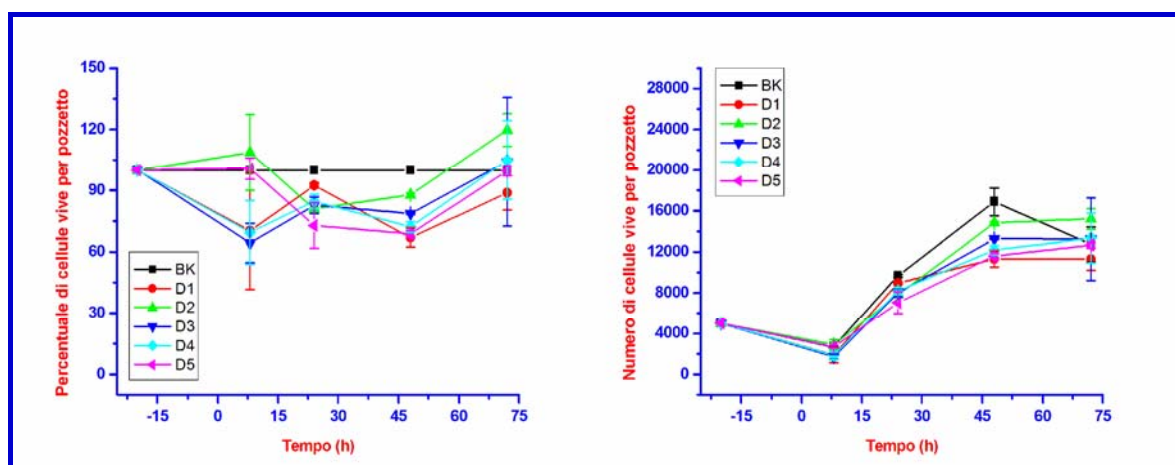


Figura 6.17. Percentuale (a sinistra) e numero (a destra) di cellule HEKa metabolicamente attive dopo l'esposizione alle diverse dosi di NP-Si)GS.

Gli effetti dell'esposizione delle cellule alle diverse dosi di NP-Si)GS sono mostrati nei due grafici in Figura 6.17. Dal grafico a sinistra emerge che la D1 ha determinato, nelle prime 8 h di esposizione alle NP, una diminuzione della percentuale e del numero di cellule: infatti, dopo 8 h di esposizione alle NP-Si)GS, la percentuale di cellule metabolicamente attive era del $70,18 \pm 28,52$ %, rispetto alle cellule non esposte alle NP. Dopo le prime 8 h di esposizione alle NP-Si)GS c'è stata, invece, una ripresa dell'attività metabolica. Infatti, alle 24 h, la percentuale delle cellule metabolicamente attive era del $92,44 \pm 1,24$ %. Il metabolismo dei cheratinociti è nuovamente diminuito dopo le 24 h di esposizione alle NP-Si)GS, per poi sorprendentemente riprendere nuovamente dopo l'aggiunta della seconda dose di NP. Per quanto riguarda, invece, le cellule esposte alla D2, nelle prime 8 h di esposizione si è osservata una attività metabolica (in percentuale ed in numero) superiore a quella osservata per le cellule non esposte alle NP-Si)GS. Questo si osserva sia nel grafico a sinistra che a destra della Figura 6.17. Dopo le prime 8 h di esposizione alle NP-Si)GS, tuttavia, le cellule paiono risentire della presenza delle NP: infatti, alle 24 e alle 48 h, la percentuale di cellule metabolicamente attive è $80,90 \pm 0,47$ %, e $87,81 \pm 0,91$ %, rispettivamente. Infine, l'aggiunta della seconda dose, alle 48 h, non pare aver esplicato effetti importanti sulle cellule, in quanto sia nel grafico a sinistra, che a destra, si nota che l'attività metabolica delle cellule ha superato quella delle cellule non esposte alle NP. La D3 e la D4, invece, nelle prime 8 h di esposizione alle NP hanno determinato modificazioni nell'attività metabolica di entità superiore a quella esplicata dalla D1. Infatti, alle 8 h, è stata misurata una percentuale del $64,30 \pm 9,61$ % di cellule esposte alla D3, e di $69,46 \pm 15,58$ % di cellule esposte alla D4. Alle 48 h, tuttavia, gli effetti sul metabolismo esplicati da queste due dosi sono stati superiore a quelli esercitati dalla D2, ma inferiore a quelli della D1. Inoltre, sempre alle 48 h, gli effetti negativi della D4 si sono mostrati superiori a quelli della D3, e precisamente $78,64 \pm 0,34$ per la D3, e $72,20 \pm 2,62$ per la D4. Alla 72^{ma} ora, infine, le cellule esposte alla D3 e alla D4 hanno mostrato un'attività metabolica superiore a quella delle cellule non esposte alle NP. La D5, nelle prime 8 h, non sembra aver determinato degli effetti negativi sulle cellule, in quanto, dal grafico a sinistra in Figura 6.17, si nota che la percentuale di cellule metabolicamente attive misurata alle 8 h è del $100,71 \pm 5,33$ %. Alle 24 h, invece, la percentuale di cellule metabolicamente attive che è stata misurata per le cellule esposte a D5 è del $72,77 \pm 11,02$ %, la più bassa misurata tra le cellule esposte alle 5 diluizioni. Dopo la semina della seconda dose, invece, le cellule esposte a D5 non hanno risentito della presenza delle NP, in quanto alla 72^{ma} ora, la percentuale delle cellule metabolicamente attive era del $99,55 \pm 2,15$ %.

Le cellule esposte alle cinque diverse diluizioni non hanno mostrato di risentire particolarmente dell'aggiunta della seconda dose. Infatti dal grafico a sinistra, in Figura 6.17 si evince che la percentuale di cellule metabolicamente attive aumenta dopo la 48^{ma} ora. Prendendo in considerazione sempre il grafico a sinistra, si è osservato che la percentuale di cellule metabolicamente attive, e-

sposte alla D1, risulta essere dell' $88,79 \pm 8,46$ %, mentre per le cellule esposte alle altre diluizioni, le percentuali sono superiori al 100 % (eccezion fatta per la D5).

Non si è osservata una vera e propria corrispondenza tra la concentrazione di silice e oro presente nei pozzetti e l'attività metabolica. Infatti, osservando il grafico a sinistra in Figura 6.17 si evince che la D1, sebbene sia la diluizione con la maggiore concentrazione di silice e oro, nelle prime 48 h non ha esplicato gli effetti più negativi sulle cellule, effetti che sono stati invece i più evidenti dopo la semina della seconda dose. È stata, invece, la D3 ad aver esplicato l'effetto più importante nelle prime 8 h, e, a seguire, la D4. Alle 24 ore, invece, la percentuale inferiore di cellule metabolicamente attive si è ottenuta per le cellule esposte alla D5, mentre la D1 sembra aver esplicato gli effetti meno tossici fra tutte e cinque le diluizioni. Ciò che è stato osservato alla 48^{ma} ora, è che è stata nuovamente la D1 a determinare gli effetti metabolici più marcati, seguita dalla D5, dalla D4, D3, e D2. Anche alla 72^{ma} ora gli effetti più importanti sembrano essere stati esplicitati dalla D1. In conclusione, quindi, non c'è stata una diluizione che ha esplicato gli effetti più negativi a tutti i tempi dell'esperimento: sicuramente, la D2 si è rivelata la meno tossica tra tutte (vedi valori ai tempi 8 h, 48 h, e 72 h).

Le deviazioni standard osservate sono state spesso molto basse (i.e., inferiori al 5 % della media), sebbene soprattutto all'8^{va} e alla 72^{ma} ora siano state ottenute delle deviazioni standard più elevate. In effetti, quindi, le deviazioni standard maggiori sono state ottenute dopo la semina delle dosi, e questo potrebbe indicare che, nell'immediato, si ha una risposta differente delle cellule alla presenza delle NP, mentre nelle ore successive (24 h e 48 h) si ottengono dei dati più ripetibili.

La valutazione statistica di questi risultati si trova nell'appendice. Per quanto riguarda gli esperimenti condotti con il mezzo disperdente le NP-Si)GS (acqua), sebbene gli esperimenti siano stati eseguiti non si riportano per alcune questioni sorte durante la scrittura della tesi e che non abbiamo potuto verificare con un tecnico specializzato nel tempo della consegna di questo documento.

I grafici riportati in Figura 6.18 mostrano la percentuale (a sinistra) ed il numero (a destra) di cellule HEMa-LP metabolicamente attive in seguito all'esposizione a diverse diluizioni di NP-Si)GS.

Negli esperimenti con i melanociti, sono state seminate 10.000 cellule in ciascun pozzetto, cioè il doppio rispetto alla densità di semina dei cheratinociti. Ci si aspetta, quindi, che rispetto a questi ultimi, le NP-Si)GS possano esercitare un effetto più blando sui melanociti, in quanto ciascuna cellula ha a disposizione una quantità inferiore di silice, di oro, e quindi un minor numero di particelle. Rispetto alle HEKa, infatti, i melanociti hanno dato una miglior risposta in termini di vitalità cellulare, sia in presenza di NP-Si (Fig. 6.12) che di NP-GS (Fig. 6.15).

In Figura 6.18 nel grafico a sinistra, si nota che, nelle prime 8 h la D1 non è quella che esplica l'effetto più negativo sull'attività metabolica delle HEMa-LP. Infatti, alle 8 h, la tossicità della D1

è pari all' $83,89 \pm 5,00 \%$, mentre alle 24 h si è misurata una percentuale di cellule metabolicamente attive superiore a quella delle cellule non esposte alle NP-Si)GS.

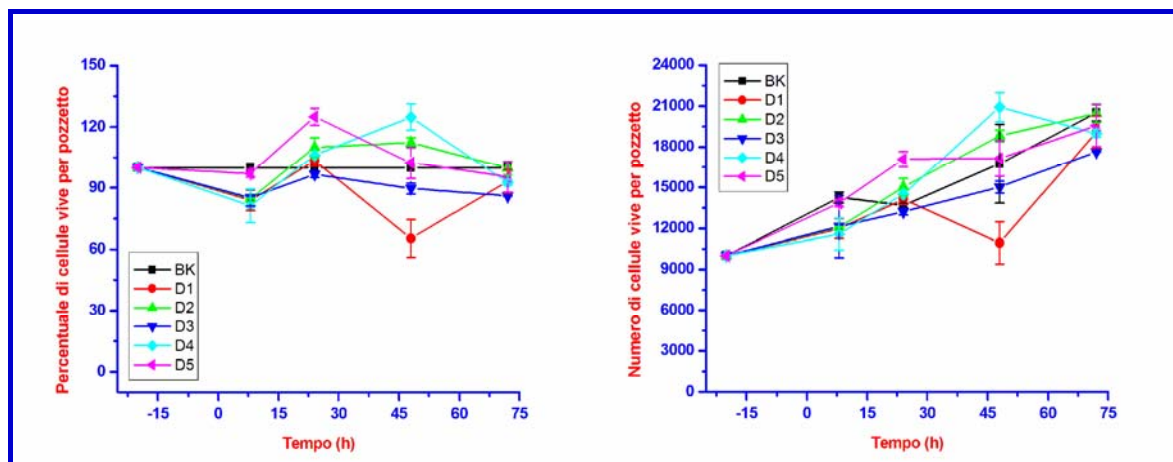


Figura 6.18. Percentuale (a sinistra) e numero (a destra) di cellule HEMA-LP metabolicamente attive dopo l'esposizione alle diverse dosi di NP-Si)GS.

Alle 48 h, invece, le HEMA-LP paiono aver risentito della presenza delle NP, infatti la D1 ha esplicato l'azione più citotossica tra tutte le diluizioni testate. Invece, dopo la semina della seconda dose è stato registrato un aumento della percentuale di cellule metabolicamente attive ($93,11 \pm 5,73 \%$). Le cellule esposte alla D2, nelle prime 8 h dell'esperimento, hanno seguito lo stesso andamento delle cellule esposte alla D1: si è osservata una diminuzione della percentuale di cellule metabolicamente attive (grafico a sinistra, Fig. 6.18). Successivamente, alle 24 h, le cellule esposte alla D2 hanno mostrato di non risentire della presenza delle NP-Si)GS, tanto che la percentuale di cellule metabolicamente attive ha superato il 100 % (i.e., $109,94 \pm 4,66 \%$). Alle 48 h tale percentuale è rimasta ancora superiore a quella delle cellule non esposte a NP (i.e., $112,28 \pm 2,56 \%$), per poi tornare vicina al 100 % alle 72 h, dopo la semina della seconda dose ($99,81 \pm 3,32 \%$). La D3, nelle prime 8 h dell'esposizione alle NP segue lo stesso andamento delle cellule esposte a D1 e D2. Alle 24 h, invece, è stata misurata la vitalità cellulare inferiore a quella misurata per le cellule esposte a tutte le altre diluizioni (i.e., $96,65 \pm 1,61 \%$). La percentuale di cellule metabolicamente attive diminuisce ancora nelle ore successive fino a raggiungere l' $85,95 \pm 0,11 \%$ alle 72 h, dopo l'aggiunta della seconda dose di NP-Si)GS. Le cellule esposte alla D4, nelle prime 8 h di esposizione alle NP, hanno mostrato una percentuale di vitalità inferiore a quelle esposte a tutte le altre diluizioni (i.e., $81,11 \pm 8,16 \%$), mentre, alle 24 ed alle 48 h, la percentuale di cellule metabolicamente attive è aumentata, fino ad arrivare a $124,83 \pm 6,42 \%$. Dopo la semina della seconda dose, si è misurata una percentuale di cellule metabolicamente attive pari al $92,58 \pm 1,45 \%$. Infine, sempre dal grafico a sinistra, in Figura 6.18, si nota che alle 8 h ed alle 24 h la percentuale di cellu-

le metabolicamente attive è la più alta rispetto a quelle delle cellule esposte alle altre diluizioni, ma dopo le prime 24 h di esposizione alle NP, tale percentuale si abbassa fino ad arrivare, alle 72 h, al $95,38 \pm 7,55$ %.

Gli effetti dell'aggiunta della seconda dose non hanno determinato gli stessi effetti sulle cellule esposte a tutte le diluizioni. Infatti, le cellule esposte alla D1 non hanno mostrato di risentire della seconda dose di NP-Si)GS, in quanto la percentuale di cellule metabolicamente attive è aumentata dopo le 48 h, passando da $65,25 \pm 9,17$ % (alle 48 h) a $93,11 \pm 5,73$ % (alle 72 h). Sempre dal grafico a sinistra, in Fig. 6.18, si evince che per le cellule esposte a tutte le altre diluizioni, invece, l'aggiunta della seconda dose di NP ha determinato una diminuzione della percentuale di cellule metabolicamente attive. Le cellule esposte alla D3 sono state quelle in corrispondenza delle quali, alle 72 h, si è registrata la percentuale più bassa, mentre le cellule esposte alla D2 hanno riportato la percentuale più elevata di vitalità cellulare.

Non è stata osservata alcuna linearità tra la concentrazione di silice e oro, e gli effetti sul metabolismo cellulare. Infatti, non sempre ad una concentrazione elevata è corrisposta una tossicità più marcata. Esaminando gli effetti delle NP ai diversi tempi dell'esperimento (grafici in Fig. 6.18), si è visto che dopo le prime 8 h di esposizione alle NP, la tossicità maggiore è stata esplicita dalla D4, mentre alle 24 h dalla D3, alle 48 h dalla D1, ed alle 72 h di nuovo dalla D3. Quindi la D1, sebbene sia quella a maggiore concentrazione di silice e di oro, non ha sempre determinato gli effetti più tossici. La D2, invece, pare aver esercitato un qualche effetto nocivo solamente nelle prime 8 h, in quanto, nelle ore successive, la percentuale di cellule metabolicamente attive è superiore a quella delle cellule non esposte alle NP. Le cellule esposte alla D3, invece, hanno mostrato di risentire della presenza delle NP durante tutte le ore dell'esperimento, in quanto la percentuale di cellule metabolicamente attive è inferiore al 100 % a tutte le ore dell'esperimento. Per quanto riguarda le cellule esposte alla D4, nelle prime 8 h di esposizione si è misurata una tossicità superiore a quella esplicita dalle altre dosi. Nelle ore successive, invece, la percentuale di cellule metabolicamente attive è aumentata fino a superare quella delle cellule non esposte alle NP: in particolare, alle 48 h la percentuale di cellule metabolicamente attive è stata misurata come la più alta fra tutte. Infine, la D5, che contiene la concentrazione più bassa di silice e oro, ha esplicito l'effetto più basso (rispetto alle altre diluizioni) nelle prime 24 h di esposizione alle NP, mentre nelle ore successive le cellule sembrano aver risentito della presenza delle NP, in quanto la percentuale è diminuita fino al $95,38 \pm 7,55$ %.

Le deviazioni standard si sono mostrate, nella maggior parte dei casi, basse (inferiori al 5 % della media del triplicato). Tuttavia, talvolta si sono osservate delle deviazioni standard elevate (soprattutto alle 8 h ed alle 48 h), mentre alle 72 h, cioè dopo l'aggiunta della seconda dose, i valori si sono mostrati ripetibili.

La valutazione statistica di questi risultati si trova nell'appendice. Per quanto riguarda gli esperimenti condotti con il mezzo disperdente le NP-Si)GS (acqua), sebbene gli esperimenti siano stati eseguiti non si riportano per alcune questioni sorte durante la scrittura della tesi e che non abbiamo potuto verificare con un tecnico specializzato nel tempo della consegna di questo documento.

I grafici riportati nella Figura 6.19 mostrano a sinistra, la percentuale, e a destra il numero delle Colo-38 metabolicamente attive dopo esposizione alle NP-Si)GS.

Negli esperimenti con le Colo-38 sono state seminate 50.000 cellule in ciascun pozzetto, cioè dieci volte la densità di semina dei cheratinociti. Ci si aspetta, quindi, che rispetto a questi ultimi, le NP-Si)GS possano esercitare un effetto più blando sulle cellule tumorali, in quanto ciascuna cellula ha a disposizione una quantità inferiore di silice, di oro, e quindi un minor numero di particelle. Rispetto alle HEKa, e alle HEMa-LP, infatti, le Colo-38 hanno dato una miglior risposta in termini di vitalità cellulare, sia in presenza di NP-Si (Fig. 6.13) che di NP-GS (Fig. 6.16).

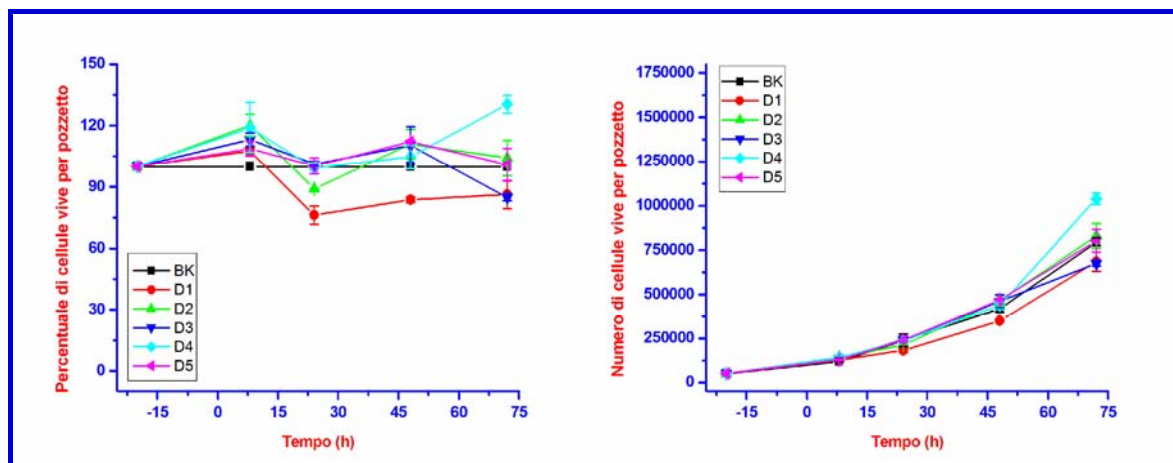


Figura 6.19. Percentuale (a sinistra) e numero (a destra) di cellule Colo-38 metabolicamente attive dopo l'esposizione alle diverse dosi di NP-Si)GS.

In Figura 6.19, nel grafico a sinistra, si nota che nelle prime 8 h di esposizione alle NP-Si)GS le cellule non sembrano aver risentito della presenza delle NP, infatti la percentuale di cellule metabolicamente attive è pari a $107,59 \pm 1,39$ %, quindi è superiore alla percentuale di cellule vive che non sono state esposte alle NP. Nelle ore successive, le cellule sembrano risentire della presenza delle NP, in quanto la percentuale di cellule metabolicamente attive diminuisce fino ad arrivare al $76,15 \pm 4,44$ %, alle 24 h. In corrispondenza delle 48 e delle 72 h, infine, la percentuale di cellule vive aumenta fino all' $86,27 \pm 6,90$ %. Le cellule esposte alla D2 non hanno risentito, nelle 8 h successive alla semina, della presenza delle NP. Infatti, la percentuale di cellule metabolicamente attive è stata superiore al 100 %. Alle 24 h, invece, si è avuta una diminuzione della vitalità cellu-

lare, fino all' $89,07 \pm 0,11$ %. Successivamente, alle 24 e alle 48 h, le cellule esposte alla D2 hanno superato la percentuale di cellule metabolicamente attive non esposte alle NP. Le cellule esposte alla D3, invece, paiono risentire della presenza delle NP solamente dopo l'aggiunta della seconda dose: infatti, se nelle prime 48 h di esposizione alle NP, la percentuale di cellule metabolicamente attive è sempre rimasta sopra il 100 %, nelle ultime 24 h tale percentuale diminuisce, fino ad arrivare all' $84,88 \pm 1,65$ %. L'andamento delle cellule esposte alla D4 riprende quello delle cellule esposte alla D3, infatti si ha un aumento dell'attività metabolica nelle prime 8 h, di esposizione, poi una diminuzione fino ad arrivare al $99,23 \pm 2,72$ % di cellule metabolicamente attive, e, successivamente, nuovamente una crescita alle 48 h. Per la D4, inoltre, si è osservata un aumento considerevole dell'attività metabolica nelle ultime 24 h dell'esperimento, cosa che non era stata osservata per D2 e D3. Dopo l'aggiunta della seconda dose, infatti, le cellule esposte alla D4 hanno mostrato una crescita fino a raggiungere una percentuale di vitalità del $130,46 \pm 4,22$ %. Ciò significa che la seconda dose della D4 non ha esplicito alcuna tossicità sulle cellule. Infine, la D5 pare non aver esplicito alcun effetto tossico sulle cellule, in quanto la percentuale di cellule metabolicamente attive è rimasta sempre al di sopra del 100 %, cioè superiore a quella delle cellule non esposte a NP. Tuttavia, l'andamento della crescita cellulare ha seguito quello delle cellule esposte a D2, D3, e D5, con una crescita alle 8 e alle 48 h, ed un calo della percentuale alle 24 ed alle 72 h.

Dai grafici riportati in Figura 6.19 emerge che gli effetti dell'aggiunta della seconda dose sono stati differenti sulle cellule, a seconda della diluizione testata. Se si valuta, dal grafico a sinistra in Figura 6.19, se la percentuale di cellule metabolicamente attive è inferiore o superiore al 100 %, allora solamente la D1 e la D3 hanno avuto un qualche effetto sulle cellule, mentre per le cellule esposte alle altre diluizioni si è misurata una percentuale superiore al 100%. Se si osserva, però, l'andamento della crescita cellulare nelle 72 h di esposizione alle NP-Si)GS, si vede che per la D1 e la D4, dopo la semina della seconda dose, si è avuto un aumento della percentuale, mentre per le altre diluizioni si è avuta una diminuzione.

Non sempre è stata osservata una precisa corrispondenza tra la concentrazione di silice e oro, e gli effetti negativi sull'attività metabolica cellulare. Infatti, si è osservato che la D1 esplica gli effetti più tossici a tutti i tempi, fra tutte le diluizioni (tranne alla 72^{ma} ora, in cui la tossicità maggiore è stata esplicita dalla D3, e a seguire dalla D1), mentre la D2 non sempre è stata la più tossica dopo la D1. Infatti, dopo 8 h di esposizione alle NP-Si)GS, la tossicità maggiore, dopo la D1, viene esplicita dalla D5. Alle 24 h, invece, è la D2 ad esplicitare gli effetti più tossici dopo la D1. Le percentuali inferiori di cellule metabolicamente attive misurate alle 48 h sono state misurate per le cellule esposte a D1, poi a D4, mentre alle 72 h, come detto poc'anzi, la tossicità maggiore è stata misurata per le cellule esposte alla D4, e poi per la D1.

Nell'esperimento in cui le cellule Colo-38 sono state esposte alle NP-Si)GS, le deviazioni standard sono state, nella maggior parte dei casi, inferiori al 5 % della media del triplicato. In alcuni casi, tuttavia, alcune deviazioni standard si sono mostrate alte (i.e., superiori al 5 % della media), e questo è avvenuto soprattutto in corrispondenza della 72^{ma} ora di esposizione alle NP. In generale, si può affermare che i dati si sono mostrati ripetibili.

La valutazione statistica di questi risultati si trova nell'appendice. Per quanto riguarda gli esperimenti condotti con il mezzo disperdente le NP-Si)GS (acqua), sebbene gli esperimenti siano stati eseguiti non si riportano per alcune questioni sorte durante la scrittura della tesi e che non abbiamo potuto verificare con un tecnico specializzato nel tempo della consegna di questo documento.

6.4.3.4. (NP-Si)RHOD

È stato testato soltanto il tal quale delle NP-Si)RHOD. L'esposizione delle cellule a queste nanoparticelle è durata 24 ore. Quindi, sia il numero di diluizioni utilizzate, sia il tempo di esposizione alle cellule è variato rispetto al protocollo seguito per NP-Si, NP-GS, e NP-Si)GS. Questa variazione è stata apportata in quanto, negli esperimenti di minima dose efficace è risultato che la percentuale di cellule rimaste vitali dopo 24 ore di esposizione era molto prossima al 100% per tutte le diluizioni. Pertanto, si è ritenuto sufficiente effettuare il test utilizzando la concentrazione più alta di NP-Si)RHOD, e per 24 ore. Inoltre, soltanto una dose di NP è stata seminata nelle piastre. Di seguito, in Tabella 6.15, verranno indicate sia la quantità di silice che il numero di NP-Si)RHOD, all'interno di ciascun pozzetto, per ogni diluizione.

Tabella 6.15. Concentrazione di silice e NP-Si)RHOD nei pozzetti.

Diluizione	mg/mL silice	n. particelle NP-Si)RHOD
D1	0,0783	$5,44 \times 10^8$

Le NP-Si)RHOD sono state testate soltanto su HEMa-LP e Colo-38. I risultati ottenuti con i due fenotipi cellulari sono riportati rispettivamente in Figura 6.20 e 6.21, dove, analogamente a quanto riportato nei paragrafi precedenti a sinistra e destra di ogni figura troviamo rispettivamente la percentuale e il numero di cellule metabolicamente attive. Inoltre, negli esperimenti con le HEMa-LP e con le Colo-38 sono stati seminati in ciascun pozzetto rispettivamente 10.000 e 50.000 cellule. Pertanto, a parità di dose, i melanociti sono esposti ad una quantità di NP cinque volte maggiore. Pertanto, già prima di effettuare l'esperimento si poteva immaginare che se queste NP avessero esercitato qualche effetto tossico, questo si sarebbe dovuto vedere nei melanociti.

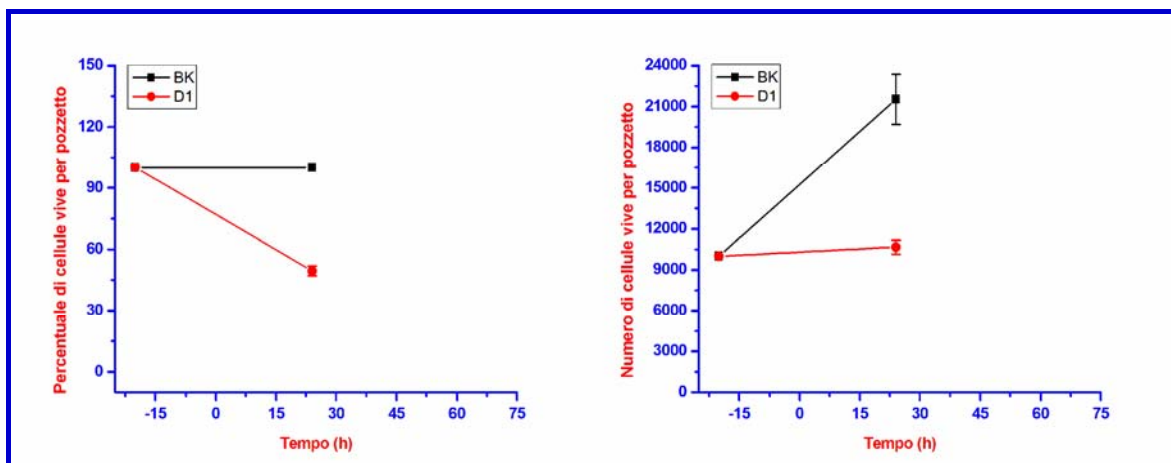


Figura 5.20. Percentuale (a sinistra) e numero (a destra) di cellule HEMA-LP metabolicamente attive dopo l'esposizione ad una dose di NP-Si)RHOD.

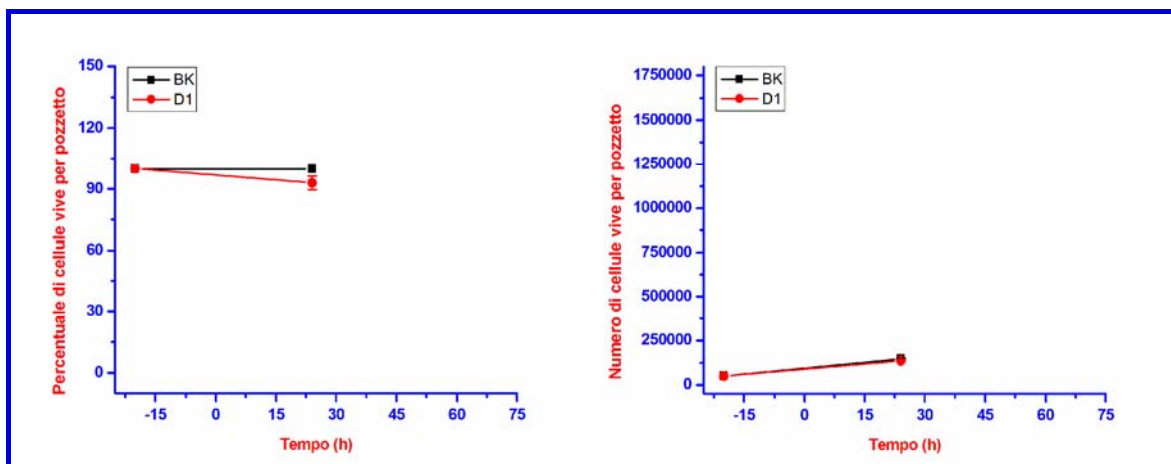


Figura 5.21. Percentuale (a sinistra) e numero (a destra) di cellule Colo-38 metabolicamente attive dopo l'esposizione ad una dose di NP-Si)RHOD.

Dal confronto delle Figure 5.20 e 5.21 si evince che la nostra ipotesi è stata soddisfatta. Osservando i grafici di sinistra si nota che se i melanociti perdono di vitalità metabolica per un 50% (i.e., $49,51 \pm 2,41$ %) nelle 24 h di esposizione, le cellule del melanoma mantengono una vitalità superiore al 90% (i.e., $93,00 \pm 3,40$).

La valutazione statistica di questi risultati si trova nell'appendice. Per quanto riguarda gli esperimenti condotti con il mezzo disperdente le NP-Si)RHOD (acqua), sebbene gli esperimenti siano stati eseguiti non si riportano per alcune questioni sorte durante la scrittura della tesi e che non abbiamo potuto verificare con un tecnico specializzato nel tempo della consegna di questo documento.

6.4.3.5. NP-Si)RHOD/Hep

Come per le NP-Si)RHOD, anche per le NP-Si)RHOD/Hep è stato testato soltanto il tal quale delle particelle, per 24 ore. Anche in questo caso, quindi, come per le NP-Si)RHOD/Hep, sia il numero di diluizioni utilizzate, sia il tempo di esposizione alle cellule è variato rispetto al protocollo seguito per NP-Si, NP-GS, e NP-Si)GS. Questa variazione è stata apportata in quanto, negli esperimenti di minima dose efficace è risultato che la percentuale di cellule rimaste vitali dopo 24 ore di esposizione era molto prossima al 100% per tutte le diluizioni. Pertanto, si è ritenuto sufficiente effettuare il test utilizzando la concentrazione più alta di NP-Si)RHOD/Hep, e per 24 ore. Inoltre, soltanto una dose di NP è stata seminata nelle piastre. Di seguito, in Tabella 6.16, verranno indicate la quantità di silice, di eparina, ed il numero di NP-Si)RHOD/Hep, all'interno di ciascun pozzetto, per ogni diluizione.

Tabella 6.16. Concentrazione di silice, eparina e NP-Si)RHOD/Hep nei pozzetti.

Diluizione	mg/mL Silice	n. particelle NP-Si)RHOD/Hep	mg/mL Hep
D1	0,050	$4,34 \times 10^{10}$	0,028

Le NP-Si)RHOD/Hep sono state testate soltanto su HEMa-LP e Colo-38. I risultati ottenuti con i due fenotipi cellulari sono riportati rispettivamente in Figura 6.22 e 6.23, dove, analogamente a quanto riportato nei paragrafi precedenti a sinistra e destra di ogni figura troviamo rispettivamente la percentuale e il numero di cellule metabolicamente attive. Anche in questo caso si sono considerati preventivamente i potenziali effetti dovuti ad un'unica dose esposta a 10.000 cellule HEMa-LP o 50.000 cellule Colo-38.

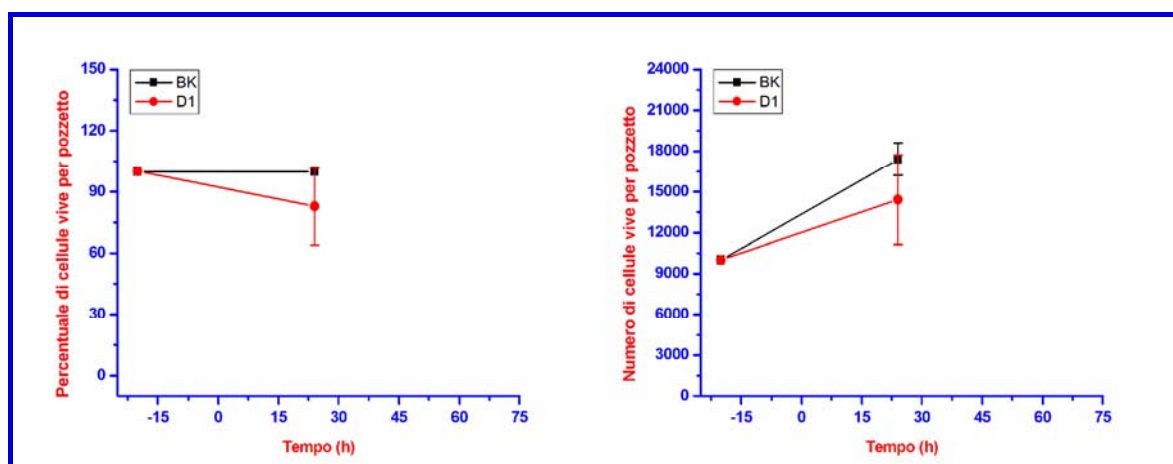


Figura 6.22. Percentuale (a sinistra) e numero (a destra) di cellule HEMa-LP metabolicamente attive dopo l'esposizione ad una dose di NP-Si)RHOD/Hep.

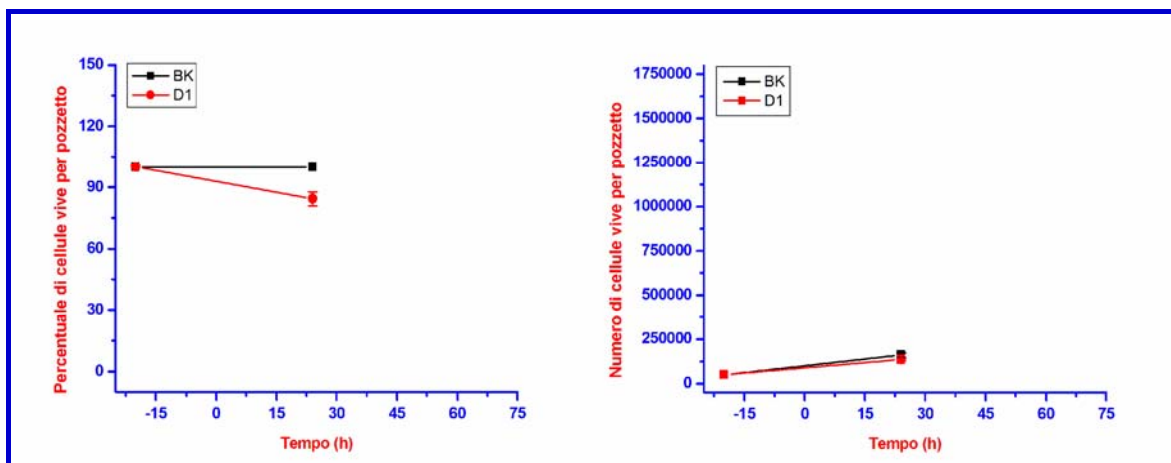


Figura 5.23. Percentuale (a sinistra) e numero (a destra) di cellule Colo-38 metabolicamente attive dopo l'esposizione ad una dose di NP-(Si)RHOD/Hep.

Tuttavia in questo caso il confronto delle Figure 5.22 e 5.23 si evince che la differenza tra i due fenotipi cellulari non è così evidente. Infatti, le percentuali di cellule metabolicamente attive sono $82,83 \pm 18,98$ % (HEMa-LP) e $81,45 \pm 5,59$ % (Colo-38).

Se si confrontano questi dati con quelli del paragrafo precedente, si può concludere che l'aggiunta di eparina rende queste NP rodaminate meno tossiche per le HEMa-LP (senza eparina $49,51 \pm 2,41$ %) ma leggermente più tossiche anche se nello stesso ordine di grandezza per le Colo-38 (senza eparina $93,00 \pm 3,40$ %).

La valutazione statistica di questi risultati si trova nell'appendice. Per quanto riguarda gli esperimenti condotti con il mezzo disperdente le NP-(Si)RHOD/Hep (acqua), sebbene gli esperimenti siano stati eseguiti non si riportano per alcune questioni sorte durante la scrittura della tesi e che non abbiamo potuto verificare con un tecnico specializzato nel tempo della consegna di questo documento.

6.4.3.6. DNPC

Non si riportano grafici né si discute i risultati perché queste NP alle concentrazioni usate non sono risultate essere tossiche.

6.4.3.7. NC Pacli

Le nanoparticelle lipidiche contenenti Paclitaxel al loro interno (NC Pacli) sono state testate sulle cellule Colo-38 (50.000 cellule/pozzetto). I risultati sono riportati in Figura 6.24. Sia il numero di diluizioni utilizzate, sia il tempo di esposizione delle NP alle cellule sono stati uguali rispetto al

protocollo seguito per NP-Si, NP-GS, e NP-Si)GS. Per quanto riguarda le diluizioni delle NP testate, in Tabella 6.17 si riportano le concentrazioni di Pacli all'interno di ciascun pozzetto.

Tabella 6.17. Concentrazione di Paclitaxel nei pozzetti.

Diluizione	mg/mL
D1	7,716
D2	0,482
D3	0,030
D4	0,008
D5	0,002

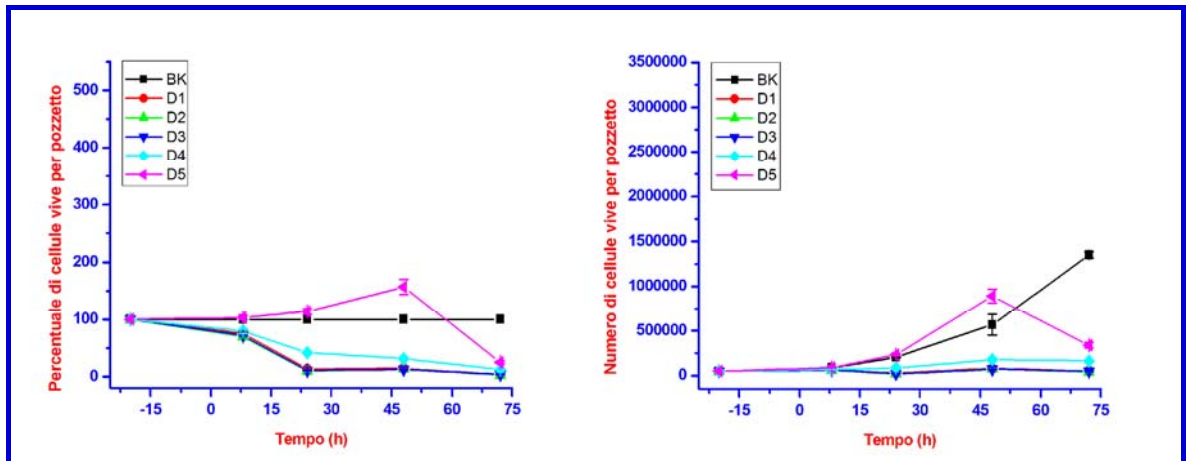


Figura 6.24. Percentuale (a sinistra) e numero (a destra) di cellule Colo-38 metabolicamente attive dopo l'esposizione alle diverse diluizioni di NC Pacli.

I grafici riportati in Figura 6.24 mostrano a sinistra, la percentuale, e a destra il numero di Colo-38 metabolicamente attive dopo esposizione alle NC-Pacli. Nel grafico a sinistra, si nota che, per quanto riguarda la D1, nelle prime 8 h di esposizione alle NP le cellule sembrano aver risentito della presenza delle NP. Infatti la percentuale di cellule metabolicamente attive è pari a $74,91 \pm 2,94$ %. Nelle ore successive, le cellule sembrano risentire ulteriormente della presenza delle NP, in quanto la percentuale di cellule metabolicamente attive diminuisce, fino ad arrivare, alle 24 h, al $13,23 \pm 0,50$ %. Alle 48 h, invece, la percentuale di cellule vive esposte alla D1 aumenta leggermente ($14,17 \pm 0,46$ %), per poi diminuire nuovamente nelle ultime 24 h di esposizione, dopo l'aggiunta della seconda dose di NP ($3,66 \pm 0,24$ %). Per quanto riguarda, invece, le cellule esposte alla D2, queste sembrano dare la stessa risposta alla presenza di NP delle cellule esposte alla D1. Infatti, già dalle 8 h si nota che le linee sono sovrapposte, e la percentuale di cellule metaboli-

camente attive è pari al $69,52 \pm 2,67$ %. Si osserva una sovrapposizione delle linee anche in corrispondenza delle 24, 48 e 72 h, dove è stata misurata una percentuale di cellule metabolicamente attive, rispettivamente, del $9,65 \pm 1,09$ %, $13,09 \pm 0,37$ %, e $2,97 \pm 0,15$ %. Di conseguenza, anche per le cellule esposte alla D2 si è avuta una diminuzione della percentuale di cellule metabolicamente attive dopo l'aggiunta della seconda dose di NP. Inoltre, anche le cellule esposte alla D3 mostrano un andamento che è sovrapposto a quello delle cellule esposte a D1 e a D2. Infatti, alle 8 h la percentuale di cellule vive è del $71,62 \pm 1,90$ %, per poi diminuire, fino ad arrivare alle 24 h al $10,57 \pm 0,84$ %. Si è osservato un aumento di tale percentuale alle 48 h, ed infine, alle 72 h, una ulteriore diminuzione ($3,66 \pm 0,64$ %). Le due diluizioni con minore concentrazione di NP, tra quelle testate, hanno mostrato di esplicare degli effetti differenti da quelle analizzate fin'ora (i.e., D1, D2, e D3). Infatti, la D4 e la D5 hanno determinato una tossicità molto inferiore rispetto alla D1, D2, e D3. Alle 8 h, è stata misurata una percentuale di cellule metabolicamente attive pari al $79,45 \pm 3,98$ %, per la D4, e del $103,17 \pm 3,16$ %, per la D5. Alle 24 h, mentre per la D4 si è osservata una diminuzione della percentuale di cellule vive rispetto alle 8 h ($41,59 \pm 0,48$ %), per la D5 si è avuto un aumento ($113,98 \pm 4,82$), ad indicare che la D5 ha avuto effetti meno tossici rispetto alla D4. Alle 48 h, la percentuale delle cellule metabolicamente attive esposte alla D4 diminuisce ulteriormente (si ricorda che per le diluizioni D1, D2, e D3, alla quarantottesima ora si è sempre osservato un aumento), fino ad arrivare al $31,53 \pm 2,92$ %. La percentuale di cellule metabolicamente attive, invece, per le cellule esposte alla D5, aumenta ulteriormente alle 48 h, fino al $157,17 \pm 13,47$ %. Tuttavia, l'aggiunta della seconda dose di NC-Pacli ha determinato una diminuzione delle cellule vive, sia per quelle esposte alla D4, che per quelle esposte alla D5. Soprattutto per le cellule esposte alla D5, si è passati da $157,17 \pm 13,47$ % alle 48 h, al $25,03 \pm 2,34$ % alle 72 h.

Dai grafici riportati emerge che gli effetti dell'aggiunta della seconda dose hanno sempre determinato un effetto negativo sulle cellule, infatti le percentuali di cellule diminuiscono sempre, dopo le 48 h. In particolare, per le diluizioni D1 – D4 la diminuzione delle cellule metabolicamente attive non è stata evidente come quella osservata per la D5, in cui la crescita delle cellule, fino alle 48 h, ha superato quella delle cellule non esposte alle NP, e poi, dopo l'aggiunta della seconda dose, la percentuale delle cellule metabolicamente attive è scesa drasticamente al di sotto del 100 %. Questo potrebbe indicare che una sola dose della D5 non esplica un effetto tossico sulle cellule, ma sono necessarie due dosi.

Inoltre è stata osservata una corrispondenza tra la concentrazione di NP e la tossicità esplicita. Infatti, in linea generale si può affermare che le diluizioni che hanno esplicitato la maggiore tossicità sono quelle a maggiore concentrazione di particelle (i.e., D1, D2, e D3), mentre la D4 e la D5 hanno determinato degli effetti meno tossici. Se si analizzano le percentuali di cellule metabolicamen-

te attive in corrispondenza di ogni tempo dell'esperimento (grafico a sinistra), si nota che alle 8 h la tossicità maggiore viene data dalla D2, a seguire dalla D3, e poi dalla D1. Queste tre diluizioni determinano effetti simili sulle cellule, tanto che le percentuali di cellule vive sono simili tra loro ($69,52 \pm 2,67$ % per la D2, $71,62 \pm 1,90$ % per la D3, e $74,91 \pm 2,94$ % per la D1). Lo stesso si osserva alle 24 h: è sempre la D2 ad esplicare l'effetto più tossico, e, a seguire, la D3, la D1, D4, e D5. Alle 48 h, invece, sebbene la minore vitalità cellulare sia stata misurata in corrispondenza dell'esposizione a D1, D2, e D3, la diluizione più tossica risulta essere la D3, e, a seguire la D2 e la D1, sebbene le differenze siano minime (rispettivamente: $12,51 \pm 0,66$ %, $13,09 \pm 0,37$ %, $14,17 \pm 0,46$ %). Infine, alle 72 h, dopo l'aggiunta della seconda dose di NP, la D2 si riconferma come la diluizione che determina la maggiore tossicità: le cellule metabolicamente attive esposte a questa diluizione erano, infatti, soltanto il $2,97 \pm 0,15$ %. A seguire, la D3 e la D1 hanno determinato un effetto molto simile sulle cellule, con percentuali di cellule vive molto basse (rispettivamente, $3,66 \pm 0,64$, e $3,66 \pm 0,24$). A seguire, la D4 e la D5 hanno determinato effetti meno tossici, sebbene la semina della seconda dose di NP abbia causato una diminuzione della percentuale di cellule vive, rispetto a quella misurata alle 48 h.

Nell'esperimento in cui le cellule Colo-38 sono state esposte alle NC Pacli, nella maggior parte dei casi le deviazioni standard, derivanti dalla media di quattro ripetizioni, sono risultate basse (i.e., inferiori al 5 % della media). In particolare, mentre alle 8 h sono state ottenute deviazioni standard inferiori al 5 % della media per tutte le diluizioni, alle 24, 48, e 72 h sono state ottenute alcune erano superiori al 5 %. Questo è accaduto per i valori di percentuale e numero di cellule ottenuti dall'esposizione a D2, D3, e D4.

6.4.3.8. Test di tossicità a tempo - terreni e nanoparticelle

Come spiegato nella rispettiva parte dei Metodi, questo esperimento è servito a verificare che le NP testate non fossero fluorescenti esse stesse, tanto da interferire con la fluorescenza del CTB data dall'attività metabolica delle cellule. I risultati di questo esperimento sono riportati Tabelle 6.18-6.22. I risultati si commentano da soli essendo compresi tra il 93 ed il 103%.

Tabella 6.21. Percentuale di fluorescenza del terreno M254 con NP rispetto al bianco (solo terreno).

Formulazione	Diluizione	% fluorescenza – M254			
		8 h	24 h	48 h	72 h
NP-Si)RHOD	TQ1	$98,53 \pm 4,27$			
NP-Si)RHOD/Hep	TQ1	$93,52 \pm 3,13$			

Tabella 6.22. Percentuale di fluorescenza del terreno RPMI 1640. con NP rispetto al bianco (solo terreno).

Formulazione	Diluizione	% fluorescenza – RPMI			
		8 h	24 h	48 h	72 h
NP-Si)RHOD	TQ1	98,15 ± 0,81			
NP-Si)RHOD/Hep	TQ1	99,45 ± 5,64			

Tabella 6.18. Percentuale di fluorescenza del terreno Epilife® con NP rispetto al bianco (solo terreno).

Formulazione	Diluizione	% fluorescenza - Epilife®			
		8 h	24 h	48 h	72 h
NP-Si	TQ	100,7 ± 3,4	100,5 ± 3,9	98,4 ± 2,2	100,3 ± 1,2
	D 5	100,6 ± 3,2	98,9 ± 0,3	96,9 ± 4,1	97,7 ± 2,1
NP-Au-s	TQ	102,8 ± 1,7	101,6 ± 0,7	99,2 ± 1,7	100,1 ± 1,0
	D 5	100,4 ± 2,2	101,9 ± 2,4	98,7 ± 3,8	100,2 ± 2,4
NP-Si)GS	TQ	101,6 ± 2,5	101,4 ± 2,6	98,6 ± 1,3	99,9 ± 1,2
	D 5	97,8 ± 1,6	101,1 ± 1,2	101,2 ± 3,7	98,3 ± 0,8

Tabella 6.19. Percentuale di fluorescenza del terreno Medium 254 con NP rispetto al bianco (solo terreno).

Formulazione	Diluizione	% fluorescenza - Medium 254			
		8 h	24 h	48 h	72 h
NP-Si	TQ	100,2 ± 2,5	98,3 ± 0,8	103,1 ± 2,0	97,8 ± 2,1
	D 5	100,7 ± 2,6	99,7 ± 0,5	101,7 ± 3,4	96,5 ± 1,4
NP-Au-s	TQ	99,3 ± 2,3	97,6 ± 1,2	100,8 ± 1,1	99,0 ± 2,7
	D 5	99,6 ± 2,7	98,1 ± 0,7	100,9 ± 3,2	96,9 ± 2,2
NP-Si)GS	TQ	99,5 ± 2,7	98,3 ± 5,7	101,0 ± 2,9	95,6 ± 2,4
	D 5	100,2 ± 2,5	98,3 ± 0,8	103,1 ± 2,0	97,8 ± 2,1

Tabella 6.20. Percentuale di fluorescenza del terreno RPMI 1640 con NP rispetto al bianco (solo terreno).

Formulazione	Diluizione	% fluorescenza – RPMI 1640			
		8 h	24 h	48 h	72 h
NP-Si	TQ	97,9 ± 4,5	97,3 ± 2,9	96,3 ± 2,9	94,6 ± 2,0
	D 5	99,3 ± 3,7	99,9 ± 1,8	98,8 ± 2,5	95,9 ± 3,1
NP-Au-s	TQ	97,8 ± 3,7	99,0 ± 6,4	96,7 ± 0,9	95,3 ± 0,2
	D 5	97,5 ± 2,7	99,7 ± 1,6	96,9 ± 1,7	93,4 ± 1,2
NP-Si)GS	TQ	99,3 ± 5,3	95,7 ± 0,8	97,3 ± 2,9	93,8 ± 1,2
	D 5	96,6 ± 1,2	95,8 ± 1,8	97,0 ± 3,5	95,2 ± 2,2

6.5. Bibliografia e note

- [1] Manuale d'uso scaricabile dal sito Promega, relativo al CTB <<http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/101/CellTiter-Blue%20Cell%20Viability%20Assay%20Protocol.pdf>> (21 Marzo 2013)
- [2] Zhang, L.W., Yang, J., Barron, A.R., Monteiro-Riviere, N.A. Endocytic mechanisms and toxicity of a functionalized fullerene in human cells. *Toxicol Lett* 191(2-3), 149-157 (2009).
- [3] Monteiro-Riviere, N.A., Inman, A.O., Zhang, L.W. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in human cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 234 (2), 222-235 (2008).
- [4] Huang, X., Teng, X., Chen, D., Tang, F., He, J. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. *Biomaterials* 31(3), 438-448 (2010).
- [5] Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W., Jahnen-Dechent, W. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 3(11), 1941-1949 (2007).
- [6] Tettey, C.O., Nagajyothi, P.C., Lee, S.E., Ocloo, A., Minth An, T.N., Sreekanth, T.V.M., Lee, K.D. Anti-melanoma, tyrosinase inhibitory and anti-microbial activities of gold nanoparticles synthesized from aqueous leaf extracts of *Teraxacum officinale*. *Int J Cosmet Sci* 34(2), 150-154 (2012).
- [7] Zhang, X., Chibli, H., Mielke, R., Nadeau, J. Ultrasmall gold-doxorubicin conjugates rapidly kill apoptosis-resistant cancer cells. *Bioconj Chem* 22(2), 235-243 (2011).
- [8] Xiao, L., Matzubayashi, K., Miwa, N. Inhibitory effect of the water-soluble polymer-wrapped derivative of fullerene on UVA-induced melanogenesis via downregulation of tyrosinase expression in human melanocytes and skin tissues. *Arch Dermatol Res* 299 (5-6), 245-257 (2007).
- [9] Mi-Kyung Lee, Soo-Jeong Lim, Chong-Kook Kim. Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of paclitaxel-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles. *Biomaterials* 28, 2137-214 (2007).
- [10] Zhao, B., Yin, J.-J., Bilski, P.J., Chignell, C.F., Roberts, J.E., He, Y.-Y. Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol* 241(2), 163-172 (2009).
- [11] Huang, X., Teng, X., Chen, D., Tang, F., He, J. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. *Biomaterials* 31(3), 438-448 (2010).
- [12] Huang, X., Zhuang, J., Teng, X., Li, L., Chen, D., Yan, X., Tang, F. The promotion of human malignant melanoma growth by mesoporous silica nanoparticles through decreased reactive oxygen species. *Biomaterials* 31(24), 6142-6153 (2010).
- [13] Chalkiadaki, G., Nikitovic, D., Berdiaki, A., Katonis, P., Karamanos, N.K., Tzanakakis, G.N. Heparin plays a key regulatory role via a p53/FAK-dependent signaling in melanoma cell adhesion and migration. *IUBMB Life* 63(2), 109-119 (2011).
- [14] Lu, S., Xia, D., Huang, G., Jing, H., Wang, Y., Gu, H. Concentration effect of gold nanoparticles on proliferation of keratinocytes. *Colloids Surf B Biointerfaces* 81(2), 406-411 (2010).
- [15] Schaeublin, N.M., Braydich-Stolle, L.K., Schrand, A.M., Miller, J.M., Hutchison, J., Schlager, J.J., Hussain, S.M. Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. *Nanoscale* 3(2), 410-420 (2011).

- [16] Conversazione personale con servizio tecnico Promega, 16 ottobre 2012.
- [17] Huang, H.-L., Hsing, H.-W., Lai, T.-C., Chen, Y.-W., Lee, T.-R., Chan, H.-T., Lyu, P.-C., Wu, C.-L., Lu, Y.-C., Lin, S.T., Lin, C.-W., Lai, C.-H., Chan, H.-T., Chou, H.-C., Chan, H.-L. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J Biomed Sci* 17(36), 1-10 (2010).
- [18] Russell, T., Pastan, I. Plasma membrane cyclic adenosine 3':5'-monophosphate phosphodiesterase of cultured cells and its modification after trypsin treatment of intact cells. *J Biol Chem* 248(16), 5835-5840 (1973).
- [19] Freshney, R.I. *Culture of animal cells. A manual of basic technique.* (Wiley, quinta edizione, 2005), p. 41.
- [20] Kiss, B, Biro, T., Czifra, G., Toth, B.I., Kertesz, Z., Szikszai, Z., Kiss, A.Z., Juhasz, I., Zouboulis, C.C., Hunyadi, J. Investigation of micronized titanium dioxide penetration in human skin xenografts and its effect on cellular functions of human skin-derived cells. *Exp Dermatol* 17(8), 659-667 (2008).
- [21] Xiao, L., Aoshima, H., Saitoh, Y, Miwa, N. Fullerene-polyvinylpyrrolidone clathrate localizes in the cytoplasm to prevent ultraviolet-a ray-induced DNA-fragmentation and activation of the transcriptional factor NF-kappaB. *J Cell Biochem* 111(4), 955-966 (2010).
- [22] O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267:5421-5426.
- [23] Erb RE, Ehlers MH. 1950. Resazurin reducing time as an indicator of bovine semen capacity. *J Dairy Sci* 33:853-864.
- [24] Lakowicz JR. (2006). *Principle of fluorescence spectroscopy.* 3rd edition, volume 1. New York: Springer Science + Business Media LLC.
- [25] Maduray, K., Karsten, A., Odhav, B., Nyokong, T. In vitro toxicity testing of zinc tetrasulfophthalocyanines in fibroblast and keratinocyte cells for the treatment of melanoma cancer by photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 103(2), 98-104 (2011).

CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi è stato caratterizzato da tre fasi principali. In un primo tempo, infatti, sono state sintetizzate e caratterizzate, diversi tipi di nanoparticelle inorganiche. La caratterizzazione mediante microscopia elettronica, analisi elementare all'EDS, e DLS, ha portato a concludere che la sintesi delle NP-GS e delle NP-Si)GS è avvenuta con successo, mentre la sintesi delle NP-Si)Au non è riuscita, sebbene si sia seguito fedelmente un protocollo riportato in letteratura.

Le NP-Si, se bene non siano state sintetizzate presso il nostro laboratorio, sono state comunque da noi caratterizzate ed è stata studiata la loro morfologia.

Un altro tipo di particelle (NP-Au) fornito da un collaboratore, è stato utilizzato come supporto per la coniugazione di molecole citotossiche (Azl 6 e 38) sintetizzate presso la nostra Università. La sintesi di questo complesso, da noi indicato come DNPC, ha avuto l'obiettivo di permettere il trasporto, attraverso un mezzo acquoso, di tali molecole citotossiche, altamente lipofile. Dai risultati ottenuti ad'oggi si può affermare che una certa percentuale di Azl6 e 38 venga coniugato alle NP-Au, ma è ancora in corso il perfezionamento del protocollo, di garantire la ripetibilità dell'esperimento.

In una seconda fase si sono coltivati tre fenotipi cellulari (due sani, ed uno tumorale), e si sono messi a punto tutti i protocolli per la loro subcultura ed il loro congelamento.

Nella terza fase, infine, le cellule coltivate sono state esposte alle NP inorganiche di nostra sintesi, ed anche ad altre NP fornite da alcuni nostri collaboratori. Inoltre, per confronto, le cellule sono state esposte a NP lipidiche contenenti paclitaxel o molecole citotossiche. Si è constatato che le NP inorganiche (NP-Si, NP-GS, NP-Si)GS) non risultano particolarmente tossiche per le cellule, sebbene le HEKa e le HEMa-LP risentano della presenza delle NP-Si in misura maggiore rispetto alle altre NP. Le NP-Si)Rhod esplicano un effetto tossico sulle HEMa-LP, mentre le NP-Si)RHOD Hep paiono avere un effetto molto blando su tutti e tre i fenotipi coltivati.

Le DNPC, coniugate sia con Azl 6, che con Azl 38, non sembrano esplicare un effetto tossico, ma occorrono futuri esperimenti di conferma.

Infine, tra le NP lipidiche, le NC Pacli esplicano un effetto tossico su tutti i fenotipi cellulari, mentre le NC non paiono influire sulla vitalità delle cellule.

Concludendo, quindi, data la bassa tossicità delle NP da noi sintetizzate ed utilizzate, si pongono i presupposti per l'utilizzo di tali NP come carrier di farmaci antitumorali, o per terapie mirate come l'ipertermia, usata nella cura dei tumori.

In questa appendice sono riportate le tabelle con i valori di p ottenuti dallo Student's t -test, per valori dispari.

In particolare, sono stati analizzati i dati provenienti dai test di tossicità descritti nel Capitolo 6, riguardanti NP-GS, NP-Si, e NP-Si)GS, e l'esposizione al "mezzo disperdente - H₂O". Sono stati messi a confronto, per ogni tipo cellulare esposto alle NP, i numeri di cellule derivanti da diverse diluizioni, con lo stesso tempo di esposizione, o, viceversa, derivanti dall'esposizione alla stessa diluizione, per diverse ore.

NP-GS**HEKa, 8h, diverse diluizioni**

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,19592	0,30814	0,12713	0,76592	0,72486
D2	0,60345				
D3	0,82266	0,36597			
D4	0,08263	0,17303	0,00624		
D5	0,23625	0,40712	0,12786	0,86182	

HEKa, 24 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,26645	0,47403	0,15599	0,01716	0,01476
D2	0,34605				
D3	0,40521	0,19469			
D4	0,04043	0,00065	0,62299		
D5	0,03205	0,00161	0,47763	0,49526	

HEKa, 48 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,26648	0,47401	0,15599	0,01718	0,01473
D2	0,34617				
D3	0,40526	0,19470			
D4	0,04048	0,00065	0,62306		
D5	0,03205	0,00161	0,47749	0,49195	

HEKa, 72 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,12428	0,42514	0,28890	0,09172	0,26417
D2	0,40336				
D3	0,41735	0,85757			
D4	0,85759	0,31622	0,30482		
D5	0,21587	0,97202	0,79637	0,11704	

HEKa, diluizione 1, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,01136		
48 h	0,01382	0,79779	
72 h	0,01907	0,25341	0,21374

HEKa, diluizione 2, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,00353		
48 h	0,00434	0,17179	
72 h	0,01743	0,12321	0,10752

HEKa, diluizione 3, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,07033		
48 h	0,08599	0,90037	
72 h	0,00394	0,04632	0,04084

HEKa, diluizione 4, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,28904		
48 h	0,58585	0,00000	
72 h	0,03401	0,04723	0,03958

HEKa, diluizione 5, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,78372		
48 h	0,95895	0,68291	
72 h	0,00166	0,00009	0,00008

NP-GS**HEMA-LP, 8h, diverse diluizioni**

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,50369	0,42664	0,92891	0,08430	0,11173
D2	0,69445				
D3	0,21490	0,20622			
D4	0,00111	0,00310	0,02462		
D5	0,00017	0,00190	0,02480	0,50803	

HEMA-LP, 24 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,10201	0,28927	0,51337	0,58612	0,70668
D2	0,09463				
D3	0,06600	0,43020			
D4	0,00543	0,01955	0,08893		
D5	0,02814	0,17812	0,61769	0,16689	

HEMA-LP, 48 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,00011	0,00086	0,00577	0,06152	0,01504
D2	0,02715				
D3	0,00306	0,09797			
D4	0,00009	0,00259	0,04653		
D5	0,00001	0,00180	0,08103	0,32182	

HEMA-LP, 72 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,00007	0,00121	0,00124	0,16064	0,39333
D2	0,04827				
D3	0,04061	0,94502			
D4	0,00004	0,00229	0,00236		
D5	0,000019	0,00103	0,00105	0,41017	

HEMA-LP, diluizione 1, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,01329		
48 h	0,02278	0,00201	
72 h	0,00082	0,00030	0,00589

HEMA-LP, diluizione 2, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,00151		
48 h	0,12629	0,11716	
72 h	0,86212	0,05545	0,3692

HEMA-LP, diluizione 3, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,01491		
48 h	0,03366	0,79917	
72 h	0,62992	0,04231	0,05121

HEMA-LP, diluizione 4, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,02191		
48 h	0,00446	0,19608	
72 h	0,00333	0,11464	0,68858

HEMA-LP, diluizione 5, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,05896		
48 h	0,00025	0,02809	
72 h	0,00042	0,00402	0,03188

NP-GS**Colo-38, 8h, diverse diluizioni**

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,16548	0,87003	0,50424	0,69138	0,01754
D2	0,25155				
D3	0,46235	0,64784			
D4	0,38014	0,81923	0,84242		
D5	0,01484	0,04034	0,03125	0,04999	

Colo-38, 24 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,00564	0,12448	0,02461	0,01987	0,38472
D2	0,00924				
D3	0,03599	0,10680			
D4	0,01980	0,07482	0,96445		
D5	0,02808	0,64000	0,15888	0,14718	

Colo-38, 48 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,00346	0,00656	0,01474	0,40668	0,84559
D2	0,22481				
D3	0,01048	0,06886			
D4	0,02239	0,04293	0,11796		
D5	0,00014	0,00047	0,00047	0,38144	

Colo-38, 72 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,000031	0,53729	0,77176	0,26037	0,00392
D2	0,08907				
D3	0,15595	0,59363			
D4	0,01513	0,96903	0,55337		
D5	0,00682	0,39013	0,32367	0,18417	

Colo-38, diluizione 1, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,00846		
48 h	0,00158	0,02382	
72 h	0,000004	0,00001	0,00005

Colo-38, diluizione 2, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,00078		
48 h	0,00149	0,33132	
72 h	0,04282	0,05282	0,05499

Colo-38, diluizione 3, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,00129		
48 h	0,00015	0,00208	
72 h	0,10472	0,11488	0,12678

Colo-38, diluizione 4, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,00073		
48 h	0,00373	0,01414	
72 h	0,00577	0,00709	0,01174

Colo-38, diluizione 5, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,00901		
48 h	0,000003	0,00100	
72 h	0,00143	0,00222	0,00496

NP-Si**HEKa, 8h, diverse diluizioni**

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,02095	0,07403	0,54486	0,97050	0,61162
D2	0,04198				
D3	0,02093	0,08873			
D4	0,00883	0,01865	0,41998		
D5	0,00537	0,00767	0,19539	0,53550	

HEKa, 24 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,00165	0,02243	0,01712	0,26378	0,01912
D2	0,02421				
D3	0,02075	0,91693			
D4	0,0913	0,58300	0,54565		
D5	0,00137	0,29768	0,20279	0,87065	

HEKa, 48 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,00065	0,00099	0,04942	0,024145	0,14904
D2	0,11452				
D3	0,00703	0,02057			
D4	0,00226	0,00479	0,25099		
D5	0,00775	0,02050	0,65107	0,54524	

HEKa, 72 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,00115	0,01574	0,57312	0,67545	0,40675
D2	0,00629				
D3	0,00983	0,09316			
D4	0,00004	0,00481	0,70660		
D5	0,00087	0,00812	0,25739	0,18332	

HEKa, diluizione 1, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,16172		
48 h	0,09997	0,48994	
72 h	0,07567	0,96073	0,39266

HEKa, diluizione 2, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,01747		
48 h	0,01748	0,55997	
72 h	0,00761	0,13249	0,06685

HEKa, diluizione 3, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,10557		
48 h	0,00686	0,03513	
72 h	0,01607	0,02999	0,12329

HEKa, diluizione 4, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,28171		
48 h	0,00230	0,15525	
72 h	0,00015	0,01471	0,00898

HEKa, diluizione 5, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,01637		
48 h	0,01450	0,04695	
72 h	0,00179	0,00271	0,01418

NP-Si**HEMA-LP, 8h, diverse diluizioni**

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,00008	0,04720	0,14063	0,36842	0,30284
D2	0,00011				
D3	0,00002	0,00400			
D4	0,00011	0,01835	0,62568		
D5	0,00002	0,00684	0,53737	0,97584	

HEMA-LP, 24 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,00001	0,02114	0,01240	0,13464	0,01881
D2	0,00004				
D3	0,00001	0,99187			
D4	0,00001	0,15627	0,10193		
D5	0,00001	0,79949	0,70468	0,16689	

HEMA-LP, 48 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,00000004	0,00336	0,07969	0,05867	0,68605
D2	0,00007596				
D3	0,00001424	0,08611			
D4	0,00001190	0,09424	0,91640		
D5	0,00001170	0,02015	0,27441	0,23195	

HEMA-LP, 72 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,000001068	0,02168	0,56513	0,39858	0,95668
D2	0,000003084				
D3	0,000000317	0,00732			
D4	0,000000007	0,00232	0,84713		
D5	0,000000039	0,00779	0,49680	0,23549	

HEMA-LP, diluizione 1, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,23678		
48 h	0,01912	0,00005	
72 h	0,28209	0,00191	0,00964

HEMA-LP, diluizione 2, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,01175		
48 h	0,01349	0,52289	
72 h	0,00030	0,01989	0,11602

HEMA-LP, diluizione 3, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,48552		
48 h	0,03751	0,01427	
72 h	0,00048	0,00013	0,04397

HEMA-LP, diluizione 4, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,20526		
48 h	0,03084	0,12497	
72 h	0,00027	0,00032	0,01738

HEMA-LP, diluizione 5, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,79546		
48 h	0,00443	0,00480	
72 h	0,00014	0,00014	0,59540

NP-Si**Colo-38, 8h, diverse diluizioni**

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,03396	0,4307	0,81534	0,28843	0,01767
D2	0,02269				
D3	0,02844	0,51963			
D4	0,03109	0,47755	0,32064		
D5	0,00749	0,06142	0,01408	0,83099	

Colo-38, 24 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,00132	0,03924	0,33263	0,86638	0,71185
D2	0,00153				
D3	0,00285	0,19583			
D4	0,01609	0,26101	0,65737		
D5	0,00039	0,00892	0,16651	0,71153	

Colo-38, 48 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,03454	0,47722	0,93684	0,37837	0,50924
D2	0,02402				
D3	0,02444	0,41009			
D4	0,00948	0,98648	0,29129		
D5	0,00718	0,77596	0,39053	0,68085	

Colo-38, 72 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,15812	0,20125	0,15279	0,16846	0,12929
D2	0,34438				
D3	0,99411	0,09205			
D4	0,90901	0,49663	0,89070		
D5	0,51949	0,01434	0,06386	0,50694	

Colo-38, diluizione 1, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,00737		
48 h	0,00118	0,00300	
72 h	0,00187	0,00243	0,00698

Colo-38, diluizione 2, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,00018		
48 h	0,00112	0,00275	
72 h	0,00006	0,00008	0,00147

Colo-38, diluizione 3, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,00066		
48 h	0,00031	0,00149	
72 h	0,00001	0,00003	0,00044

Colo-38, diluizione 4, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,01287		
48 h	0,00029	0,00175	
72 h	0,00453	0,00763	0,04130

Colo-38, diluizione 5, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,00007908		
48 h	0,00007261	0,00034626	
72 h	0,00000003	0,00000003	0,00010764

NP-Si)GS**HEKa, 8h, diverse diluizioni**

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,60060	0,70867	0,54029	0,60522	0,55708
D2	0,76016				
D3	0,92509	0,66578			
D4	0,99433	0,76728	0,91943		
D5	0,93685	0,67839	0,83526	0,94445	

HEKa, 24 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,6298	0,25394	0,27527	0,58100	0,12663
D2	0,49866				
D3	0,47772	0,81694			
D4	0,92563	0,17470	0,31039		
D5	0,20991	0,31907	0,50086	0,11106	

HEKa, 48 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,41361	0,54646	0,24704	0,14046	0,22708
D2	0,68189				
D3	0,82190	0,37486			
D4	0,52127	0,14695	0,45599		
D5	0,77172	0,33005	0,91493	0,51711	

HEKa, 72 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,88004	0,38878	0,56772	0,68683	0,68198
D2	0,42204				
D3	0,53638	0,85805			
D4	0,63835	0,81062	0,76986		
D5	0,63515	0,91938	0,83212	0,94081	

HEKa, diluizione 1, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,02496		
48 h	0,00816	0,06028	
72 h	0,01843	0,10125	0,7892

HEKa, diluizione 2, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,00563		
48 h	0,00096	0,00477	
72 h	0,00057	0,00195	0,18142

HEKa, diluizione 3, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,04002		
48 h	0,00224	0,01056	
72 h	0,03093	0,08172	0,34100

HEKa, diluizione 4, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,01266		
48 h	0,00253	0,00295	
72 h	0,01007	0,04024	0,19809

HEKa, diluizione 5, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,04357		
48 h	0,00046	0,00730	
72 h	0,01776	0,04603	0,34879

NP-Si)GS**HEMA-LP, 8h, diverse diluizioni**

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,2402	0,39613	0,79781	0,67053	0,47348
D2	0,80685				
D3	0,61793	0,75287			
D4	0,81067	0,93420	0,86603		
D5	0,12282	0,20882	0,53514	0,46685	

HEMA-LP, 24 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,36370	0,14312	0,85843	0,21894	0,17174
D2	0,52600				
D3	0,36612	0,15767			
D4	0,84633	0,61514	0,24388		
D5	0,56497	0,96980	0,18301	0,65795	

HEMA-LP, 48 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,65927	0,50425	0,84604	0,13875	0,36730
D2	0,17468				
D3	0,23366	0,39418			
D4	0,01597	0,24886	0,01093		
D5	0,04882	0,85044	0,04482	0,10356	

HEMA-LP, 72 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,35511	0,93969	0,21225	0,93339	0,47394
D2	0,39197				
D3	0,81244	0,27219			
D4	0,32476	0,98691	0,06432		
D5	0,86551	0,51504	0,99756	0,45466	

HEMA-LP, diluizione 1, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,10987		
48 h	0,87745	0,20794	
72 h	0,04957	0,25489	0,08024

HEMA-LP, diluizione 2, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,07881		
48 h	0,17429	0,80047	
72 h	0,00880	0,08946	0,31794

HEMA-LP, diluizione 3, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,77869		
48 h	0,44834	0,42515	
72 h	0,02870	0,00561	0,00428

HEMA-LP, diluizione 4, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,27032		
48 h	0,02285	0,02780	
72 h	0,01748	0,01185	0,70597

HEMA-LP, diluizione 5, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,27593		
48 h	0,04268	0,43833	
72 h	0,11743	0,38445	0,67793

NP-Si)GS**Colo-38, 8h, diverse diluizioni**

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,77319	0,16089	0,11018	0,30629	0,0776
D2	0,2575				
D3	0,29065	0,64335			
D4	0,41186	0,87440	0,84222		
D5	0,31676	0,51583	0,77618	0,73485	

Colo-38, 24 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,05249	0,08128	0,74954	0,53525	0,62561
D2	0,35103				
D3	0,02237	0,01390			
D4	0,03607	0,03391	0,41321		
D5	0,03441	0,04805	0,36652	0,25972	

Colo-38, 48 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,15926	0,21819	0,24323	0,52859	0,15411
D2	0,06130				
D3	0,06576	0,76168			
D4	0,09816	0,49684	0,45218		
D5	0,05384	0,93619	0,77022	0,39130	

Colo-38, 72 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,58113	0,34125	0,05808	0,72472	0,83469
D2	0,83463				
D3	0,44964	0,46852			
D4	0,44921	0,25520	0,55870		
D5	0,51465	0,31640	0,08453	0,90846	

Colo-38, diluizione 1, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,00374		
48 h	0,0000783	0,00122	
72 h	0,0000007	0,0000012	0,0000019

Colo-38, diluizione 2, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,00252		
48 h	0,0000264	0,0000344	
72 h	0,0000003	0,0000003	0,0000004

Colo-38, diluizione 3, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,000040750		
48 h	0,000008905	0,000070023	
72 h	0,000000007	0,000000004	0,000000029

Colo-38, diluizione 4, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,00129		
48 h	0,0000713	0,0000468	
72 h	0,0000003	0,0000002	0,0000003

Colo-38, diluizione 5, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,0008833		
48 h	0,0000002	0,00206	
72 h	0,0000002	0,0000008	0,0000004

Saggi tossicità - mezzo disperdente - H₂O (novembre 2012)**Colo-38, 8 h, diverse diluizioni**

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,61729	0,52340	0,17760	0,32847	0,03280
D2	0,43082				
D3	0,24600	0,64059			
D4	0,98416	0,27823	0,10404		
D5	0,37159	0,06893	0,02465	0,18233	

Colo-38, 24 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,59374	0,89272	0,46582	0,47440	0,13181
D2	0,80241				
D3	0,35768	0,54647			
D4	0,36547	0,52091	0,89720		
D5	0,12244	0,18881	0,33089	0,43207	

Colo-38, 48 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,42973	0,63645	0,60794	0,37549	0,08217
D2	0,27431				
D3	0,14306	0,93552			
D4	0,07934	0,78469	0,64504		
D5	0,01050	0,26171	0,12969	0,26022	

Colo-38, 72 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,44739	0,71700	0,77383	0,82837	0,16796
D2	0,70125				
D3	0,4691	0,87485			
D4	0,32328	0,78371	0,87368		
D5	0,03782	0,09419	0,06699	0,05859	

Colo-38, diluizione 1, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,01072		
48 h	0,00106	0,01939	
72 h	0,00192	0,00545	0,02268

Colo-38, diluizione 2, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,01034		
48 h	0,02659	0,08645	
72 h	0,00729	0,01928	0,35898

Colo-38, diluizione 3, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,00255		
48 h	0,00553	0,03550	
72 h	0,00087	0,00337	0,10884

Colo-38, diluizione 4, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,00852		
48 h	0,00528	0,02739	
72 h	0,00012	0,00088	0,13804

Colo-38, diluizione 5, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,00607		
48 h	0,00119	0,00703	
72 h	0,00134	0,00352	0,06022

HEMa-LP, 8 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,54948	0,33265	0,30456	0,99494	0,59141
D2	0,83493				
D3	0,84670	0,97316			
D4	0,57088	0,36664	0,34461		
D5	0,79083	0,53402	0,51001	0,63268	

HEMa-LP, 24 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,45458	0,32084	0,56146	0,82821	0,07596
D2	0,70732				
D3	0,91740	0,70522			
D4	0,45855	0,37121	0,52150		
D5	0,07781	0,07473	0,13805	0,13884	

HEMa-LP, 48 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,42037	0,77023	0,75073	0,55418	0,26431
D2	0,45538				
D3	0,62692	0,89958			
D4	0,74943	0,63462	0,81940		
D5	0,86371	0,21159	0,46268	0,55057	

HEMa-LP, 72 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,57127	0,30184	0,24054	0,23262	0,67332
D2	0,82030				
D3	0,81997	0,98717			
D4	0,82226	0,98236	0,99484		
D5	0,68744	0,41261	0,35900	0,35268	

HEMa-LP, diluizione 1, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,77749		
48 h	0,40007	0,33824	
72 h	0,37428	0,37203	0,37428

HEMa-LP, diluizione 2, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,75751		
48 h	0,16394	0,04594	
72 h	0,47260	0,51512	0,58593

HEMa-LP, diluizione 3, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,98948		
48 h	0,20470	0,21564	
72 h	0,37054	0,38413	0,68453

HEMa-LP, diluizione 4, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,95543		
48 h	0,06797	0,18518	
72 h	0,11534	0,24338	0,81309

HEMa-LP, diluizione 5, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,03223		
48 h	0,09517	0,27016	
72 h	0,01985	0,56576	0,12734

HEKa, 8 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,43576	0,31147	0,64385	0,09847	0,35799
D2	0,96247				
D3	0,77362	0,70023			
D4	0,50511	0,98499	0,33301		
D5	0,73295	0,73058	0,57841	0,93695	

HEKa, 24 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,27265	0,73714	0,02536	0,23520	0,07791
D2	0,16791				
D3	0,15380	0,01317			
D4	0,84778	0,14982	0,25554		
D5	0,36275	0,04699	0,65014	0,49622	

HEKa, 48 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,92115	0,28769	0,99487	0,56113	0,37789
D2	0,26147				
D3	0,91452	0,25147			
D4	0,64548	0,13612	0,46925		
D5	0,43980	0,10271	0,28599	0,60551	

HEKa, 72 h, diverse diluizioni

	D1	D2	D3	D4	D5
BK	0,19647	0,00383	0,01591	0,00536	0,0042
D2	0,00630				
D3	0,03879	0,66989			
D4	0,00992	0,20167	0,78795		
D5	0,00727	0,55030	0,44556	0,13898	

HEKa, diluizione 1, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,39211		
48 h	0,10806	0,22771	
72 h	0,00617	0,00780	0,17202

HEKa, diluizione 2, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,03068		
48 h	0,03187	0,16315	
72 h	0,01404	0,84002	0,13402

HEKa, diluizione 3, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,53113		
48 h	0,08610	0,01762	
72 h	0,09411	0,01167	0,73663

HEKa, diluizione 4, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,15068		
48 h	0,01217	0,20383	
72 h	0,00083	0,05805	0,37181

HEKa, diluizione 5, a diverse ore

	8 h	24 h	48 h
24 h	0,67537		
48 h	0,17743	0,13927	
72 h	0,11526	0,05375	0,70610