

PROGRAMMA STM- ANNO 2016
RELAZIONE SCIENTIFICA FINALE

Proponente: Dott.ssa Alessandra Aloisi **Fruitore:** Dott.ssa Chiara Cristina Toma

Istituto di afferenza: Istituto Nanoscienze (NANO-CNR)

Istituzione ospitante: Chair for Materials Science and Nanotechnology at TUD- Technische Universität Dresden (Germany) supervisione: prof.ssa Lucia Gemma Delogu, prof. Gianaurelio Cuniberti

Titolo del programma: Impatto di nanomateriali sul sistema immunitario

1. Background e obiettivi della ricerca

La Nanomedicina mira all'introduzione di terapie personalizzate e allo sviluppo di strumenti diagnostici altamente efficienti, per cui risulta un approccio promettente nella produzione di nuovi *tools* da introdurre nella pratica clinica. In questo panorama, numerosi studi sono volti allo sintesi di nanomateriali biocompatibili e biodegradabili, in grado di rilasciare molecole biologicamente attive in maniera controllata e selettiva [1]. Le vescicole polimeriche di dimensioni micro- e nano-metriche, opportunamente funzionalizzate, presentano tali caratteristiche per cui risultano di notevole interesse per applicazioni in ambito farmaceutico e biomedico [2,3]. Tuttavia i nanomateriali innovativi richiedono una caratterizzazione ad ampio spettro della possibile interazione con la materia biologica e, in particolare, in vista di una loro somministrazione per via sistemica, necessitano di essere caratterizzati soprattutto in termini di impatto sulle cellule del sistema immunitario, il primo elemento di interazione con l'organismo. A riguardo i dati riportati in letteratura sono abbastanza controversi e prendono in esame solo alcune categorie di nano-materiali, ad esempio capsule lipidiche e foglietti di grafene [4,5].

Alla luce di tali considerazioni, il progetto di ricerca svolto nell'ambito del programma STM ha avuto come obiettivo la valutazione della potenziale immunotossicità esercitata da nano-materiali di nuova sintesi, nello specifico, vescicole polimeriche progettate per applicazioni in ambito diagnostico e terapeutico.

Preliminarmente allo svolgimento del progetto in oggetto, vescicole polimeriche, con *core* di alginato e *shell* di chitosano, sono state sintetizzate, tramite dispositivo microfluidico, e caratterizzate dal punto di vista chimico-fisico presso il CNR NANO- Lecce (*supervisione: Dott.ssa Alessandra Aloisi, prof.ssa Rosaria Rinaldi*), in vista di un potenziale utilizzo delle stesse quali *carrier* di molecole funzionali nella pratica pre-clinica e clinica [6,7].

Successivamente, durante il periodo di ricerca presso la TUD, le vescicole sono state testate *ex vivo* su cellule umane del sistema immunitario (*Human peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs), estratte da sangue periferico di pazienti donatori. Mediante tecniche cito-fluorimetriche è stata valutata la vitalità e l'attivazione di PBMCs a seguito della somministrazione delle vescicole polimeriche, nonché l'entità di *uptake* delle stesse.

Tali esperimenti sono stati condotti tramite citofluorimetria, una metodica di laboratorio che permette di analizzare caratteristiche citologiche e/o biochimiche di cellule in sospensione acquisendo in contemporanea più parametri. Le cellule da analizzare sono poste all'interno di un flusso laminare che interseca una sorgente luminosa laser e, a seguito dell'interazione delle cellule con il laser, si registrano due distinti eventi di *scattering*: il *forward scatter* (FSC) ed il *side scatter* (SSC). L'intensità di FSC è proporzionale alle dimensioni ed alla forma delle cellule mentre l'intensità di SSC è strettamente connessa al grado di complessità delle cellule (densità e granulosità).

2. Attività svolte e risultati conseguiti

Due differenti tipologie di vescicole polimeriche sono state testate su PBMCs, ovvero vescicole con *shell* di chitosano di medio peso molecolare (CS medium MW) e vescicole con *shell* di chitosano di basso peso molecolare (CS low MW) e per ciascuna categoria si è effettuato il *loading* delle stesse con decorina, una proteina avente alto potenziale terapeutico.

Le vescicole sono state sintetizzate con questa configurazione poiché i polimeri che le costituiscono hanno struttura chimica nota ma si è voluto valutare l'influenza dei differenti pesi molecolari degli stessi, in merito alla formazione delle strutture polimeriche, analizzando soprattutto il *layer* esterno di chitosano, essendo esso in grado di influenzare la permeabilità delle vescicole e, di conseguenza, la reattività biologica delle stesse. Alla luce di tali considerazioni, presso il CNR NANO (Lecce) sono stati ottimizzati i protocolli di rivestimento dello *shell* (utilizzando chitosano a basso e a medio peso molecolare), successivamente si è proceduto al *loading* delle vescicole (sia a *shell* di medio che di *shell* di basso molecolare) con decorina, una proteina con dimostrata attività di soppressione della crescita tumorale, sia *in vivo* che *in vitro*, ad avere un ruolo di prevenzione nella formazione delle lesioni metastatiche [8].

Durante il periodo di ricerca presso la TUD, PBMCs derivanti da *buffy coat* di soggetti donatori sani sono stati isolati mediante centrifugazione in gradiente di densità seguendo il protocollo della metodica *Ficoll*. A seguito dell'estrazione, linfociti e monociti sono stati messi in coltura con opportuno *medium* di crescita e si è proceduto con l'allestimento dei seguenti esperimenti, volti a valutare l'impatto delle vescicole polimeriche su PBMCs:

- *uptake* di vescicole preventivamente marcate con *dye* fluorescente;
- indagini sulla vitalità di PBMCs (test citofluorimetrici con marcatori di necrosi ed apoptosi);
- monitoraggio dell'attivazione di PBMCs (analisi dell'espressione dei marcatori di CD25, CD69 e CD80)

L'esperimento di *uptake* ha dimostrato che le vescicole in esame sono dotate, nel complesso, per le diverse popolazioni, di una capacità di penetrazione all'interno di PBMCs pari a circa il 40% rispetto ai relativi controlli negativi. Tuttavia, a seguito di 24 ore di trattamento, si osservano *pathway* di *uptake* differenziali a seconda della sottopopolazione di PBMCs analizzata. Infatti, le vescicole CS medium MW prediligono i monociti e linfociti B mentre le vescicole CS low MW sono internalizzate in quantità inferiore rispetto alle precedenti e il loro *uptake* è significativo esclusivamente per i monociti.

Le indagini sulla vitalità di PBMCs post-trattamento con le vescicole (testate a tre timepoint: 6, 12, 24 ore) sono state condotte mediante analisi citofluorimetrica di PBMCs marcati con annessina V e 7-aminoactinomicina (7-AAD), per discriminare rispettivamente le cellule apoptotiche e necrotiche. Infatti, l'annexina V si lega alla membrana cellulare in maniera calcio-dipendente e, opportunamente coniugata, conferisce fluorescenza alle cellule apoptotiche; mentre la 7-AAD è un colorante non vitale che viene escluso dalle cellule vive nelle quali la membrana plasmatica è perfettamente integra. A seguito delle modificazioni di membrana del processo necrotico, la 7-AAD entra all'interno della cellula e complessa la doppia elica degli acidi nucleici. La colorazione con annexina V dimostra l'assenza di un significativo numero di cellule apoptotiche nei campioni trattati e la marcatura con 7-AAD rivela che i materiali somministrati non inducono una tossicità cellulare a conferma del fatto che le vescicole siano un *carrier* biocompatibile che non inficia la vitalità cellulare.

L'attivazione di PBMCs, con relativo avvio della cascata immunitaria, è un punto cruciale nello studio dell'impatto funzionale di nanomateriali su cellule mononucleate. Tale complesso di eventi è stato monitorato mediante l'espressione dei marker CD69, CD25 e CD80. CD69 è un membro della superfamiglia delle proteine *C-type lectin* ed è un antigene di superficie espresso nei primi stadi dell'attivazione, mentre CD25 (catena alfa del recettore per interleuchina 2) è un marcatore espresso durante gli stadi più tardivi di attivazione. Per quanto riguarda l'antigene CD80, esso è espresso da monociti e linfociti B per cui l'analisi della sua espressione consente di monitorare l'attivazione di tali sottopopolazioni di PBMCs e di stabilire come esse stesse, a loro volta, influenzino la reattività delle restanti sottopopolazioni. L'espressione di CD69, CD25 e CD80 nei campioni trattati con le vescicole è comparabile con quella dei campioni non trattati (controlli negativi) ed è inferiore a quella dei campioni trattati con lipopolisaccaride e Concanavalina A (controlli positivi), soprattutto

per brevi periodi di trattamento (6 e 12 ore). Anche a seguito del protrarsi del trattamento con vescicole per 24 ore non si registra un'attivazione significativa di PBMCs, tuttavia bisogna sottolineare che le vescicole CS medium MW inducono un aumento di espressione di CD69, soprattutto nei linfociti T, rispetto ai campioni non trattati e a quelli cui sono state somministrate le altre categorie di vescicole.

3. Considerazioni finali

Lo studio dell'impatto immunotossicologico delle vescicole polimeriche ha consentito di ottenere importanti risultati potenzialmente trasferibili alla pratica e pre-clinica e clinica. Inoltre, dal momento che gli esperimenti sono stati condotti *ex vivo*, si è fatto ricorso ad un sistema che approssima in maniera verosimile ed affidabile quello *in vivo*, evitandone però gli svantaggi costituiti da: problemi etici, elevato costo, tecniche *time-consuming*, quantità di nano-materiali da somministrare a livello sistemico.

Il periodo presso la TUD ha permesso di avviare una collaborazione tra i due enti partner del progetto e di approfondire una linea di ricerca di comune interesse. Gli esperimenti illustrati sono stati condotti sulla frazione cellulare di PBMCs trattati con le vescicole ed ulteriori studi vengono condotti sulla frazione "surnatante" per valutare, mediante approccio proteomico, l'espressione di citochine e fattori secreti nel *medium* di coltura da PBMCs trattati con le vescicole in esame. Questi ulteriori esperimenti si rendono necessari per approfondire l'impatto immunotossicologico dei nanomateriali sintetizzati, per identificare i *pathway* biologici coinvolti e far sì che le vescicole polimeriche sintetizzate si configurino come un valido *carrier* per applicazioni di *drug delivery*, anche in combinazione con altri materiali quali grafene e nanoparticelle magnetiche.

I risultati ottenuti nell'ambito del programma STM e quelli derivanti dagli esperimenti in corso saranno oggetto di pubblicazione su rivista scientifica internazionale.

4. Bibliografia

- [1] Godsey M. E., Suryaprakash S. & Leong K. W., *Materials innovation for co-delivery of diverse therapeutic cargos*. RSC Adv 3, 2013; 24794–24811.
- [2] Sun J. and Tan H., *Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications*. Materials, 2013; 6: 1285-1309.
- [3] Luo Y., Wang Q., *Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery*. International Journal of Biological Macromolecules, 2014; 64: 353– 367.
- [4] Farace C., Sánchez-Moreno P., Orecchioni M., Manetti R., Sgarrella F., Asara Y., Peula-García JM., Marchal JA., Madeddu R., Delogu LG. *Immune cell impact of three differently coated lipid nanocapsules: pluronic, chitosan and polyethylene glycol*. Scientific Reports, 2016; 5:6:18423.

- [5] Orecchioni M., Jasim DA., Pescatori M., Manetti R., Fozza C., Sgarrella F., Bedognetti D., Bianco A., Kostarelos K., Delogu LG., *Molecular and Genomic Impact of Large and Small Lateral Dimension Graphene Oxide Sheets on Human Immune Cells from Healthy Donors*. Advanced Healthcare Materials, 2016; 21;5(2):276-87.
- [6] Aloisi A., Sallustio F., Toma C.C, Marulli E., Curci C., Schena F.P. and Rinaldi R. *Alginate-chitosan synthetic vesicles as a promising inhibin-A delivery system for acute kidney injury therapy*. Journal of Nanomaterials& Molecular Nanotechnology (2015)- 6th International Congress Nanotechnology in Biology & Medicine.
- [7] Sallustio F., Aloisi A. , Curci C., Toma C.C., Marulli E., Serino G., Cox S.N., De Palma G., Rinaldi R., Schena F.P. *Inhibin A and decorin secreted by adult renal stem/progenitor cells through the TLR2 engagement induce renal tubular cell regeneration- Nephrology Dialysis Transplantation* (2016) - 53rd ERA-EDTA Congress.
- [8] Neill T., Schaefer L., Iozzo R., *Decorin as a multivalent therapeutic agent against cancer*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2016; 97 174–185.