

Un breve *excursus* tra le nanoparticelle: diversa natura, diverso utilizzo e diversi possibili approcci tossicologici

Valentina Galbiati, Martina Iulini

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano

UN BREVE EXCURSUS TRA LE NANOPARTICELLE: NATURA, UTILIZZO E APPROCCI TOSSICOLOGICI

Grazie alle loro proprietà fisiche uniche, negli ultimi decenni le nanoparticelle (NP) sono state prodotte in misura crescente per molte applicazioni industriali e biomediche. Data la loro presenza ubiquitaria e la conseguente inevitabile esposizione ad esse, le nanoparticelle ricoprono sempre di più un ruolo di notevole interesse anche da un punto di vista tossicologico.

Nel minisimposio tenutosi durante il 27° Congresso Nazionale della SITOX è stato fatto un *excursus* delle diverse possibili applicazioni delle nanoparticelle, partendo da un approccio di pura ricerca scientifica basata sull'utilizzo di un modello sperimentale esposto a differenti nanoparticelle, passando successivamente ad una visione terapeutica/medica di utilizzo delle nanoparticelle proteiche e la loro valutazione tossicologica, e concludendo con l'importante valutazione dell'aspetto regolatorio dei *carbon nanotubes*, nanoparticelle estremamente diffuse e dalla conformazione pressoché unica.

Nel lavoro proposto da **Davide Asnicar** (*Huntsman Marine Science Centre* in New Brunswick, Canada) dal titolo "*Approccio di valutazione dell'impatto di Nanoparticelle su organismi non target: la vongola filippina come caso di studio*" è emerso come, attraverso i processi produttivi e il loro utilizzo quotidiano, le NP possono essere rilasciate nell'ambiente attraverso i deflussi industriali e urbani, raggiungendo l'ambiente marino costiero ed entrando nella rete trofica marina. In questo modo, le NP rappresentano fattori di stress emergenti per gli organismi marini. Nel lavoro proposto le vongole della specie *Ruditapes philippinarum* sono state esposte per 7 giorni a tre singole nanoparticelle (fullerene C60, ossido di zinco e biossido di titanio), a due concentrazioni rilevanti per l'ambiente (1 e 10 µg/L). Al termine dell'esposizione, è stato utilizzato un approccio multi-biomarker al fine di stimare il potenziale stato di squilibrio tra specie reattive dell'ossigeno e difese antiossidanti, nonché del danno ossidativo che potrebbe

derivare dall'esposizione ai contaminanti. L'attività di enzimi antiossidanti (SOD, CAT, GST) e la quantificazione del danno ossidativo (PCC, LPO) sono stati misurati sia nelle branchie che nella ghiandola digestiva delle vongole. Nel complesso, la modulazione dell'attività dei tre enzimi indagati evidenzia un aumento dello stress ossidativo nelle vongole esposte alle nanoparticelle. Il danno ossidativo si manifesta solo dopo esposizione a FC60 e nTiO₂, ma evidenziando una differenza nel "mode of action" delle due molecole, interessando nel primo caso le proteine delle branchie, nel secondo i lipidi della ghiandola digestiva. Danni limitati alle macromolecole suggeriscono una difesa antiossidante adeguata a proteggere le cellule alle concentrazioni di NP testate in questo lavoro.

Successivamente, **Leopoldo Sitia** (Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche, Università degli Studi di Milano) con un intervento dal titolo "*Nanoparticelle proteiche impiegate nell'imaging e nel trattamento di tumori solidi: il caso della ferritina nanocage*" ha mostrato come le NP siano ampiamente utilizzate anche dal punto di vista terapeutico e diagnostico. I primi esempi di successo clinico di questa strategia sono in ambito tumorale: un esempio è Abraxane®, NP di albumina caricate con paclitaxel per il trattamento del tumore del polmone non a piccole cellule e Myocet® e Doxil®/Caelyx®, liposomi caricati con doxorubicina utilizzati per il trattamento di diversi tumori solidi [Batist G, Barton J, Chaikin P, Swenson C, Welles L. Myocet (liposome-encapsulated doxorubicin citrate): a new approach in breast cancer therapy. Expert Opin Pharmacother. 2002 Dec;3(12):1739-51. doi: 10.1517/14656566.3.12.1739. PMID: 12472371]. Come in tutti i campi, prima di arrivare alla clinica, un'enorme varietà di NP è stata proposta e studiata a livello pre-clinico. I ricercatori sono d'accordo che, a seconda dell'obiettivo desiderato, ad esempio diagnosi o terapia, tali parti-

celle debbano possedere caratteristiche diverse. In generale, per aumentarne le possibilità di successo, le NP devono possedere le seguenti caratteristiche: essere stabili in fluidi biologici, avere dimensioni tali da non essere sequestrate dal fegato o escrete dai reni, non essere tossiche e soprattutto avere un profilo farmacocinetico tale da raggiungere in maniera efficace il bersaglio [Hoshyar N, Gray S, Han H, Bao G. The effect of nanoparticle size on *in vivo* pharmacokinetics and cellular interaction. Nanomedicine (Lond). 2016 Mar;11(6):673-92. doi: 10.2217/nnm.16.5. Epub 2016 Mar 22. PMID: 27003448; PMCID: PMC5561790]. Una classe di NP molto promettente di cui si è discusso è formata dalle nanogabbie di ferritina. La ferritina è una proteina ubiquitaria, presente nell'organismo sia a livello plasmatico che intracellulare. La ferritina è formata da 24 subunità di due isoforme diverse, che si autoassemblano in una struttura a nanogabbia con il diametro del guscio esterno di 12 nm e una cavità interna di 8 nm. All'interno di tale cavità è possibile caricare diversi farmaci o agenti di contrasto rispettivamente per scopi terapeutici e diagnostici. Inoltre, è stato dimostrato che l'isoforma H ha una particolare affinità per il recettore di membrana per la Transferrina 1 (TfR1). Tale recettore è overespresso nella maggior parte delle cellule tumorali, per cui può essere utilizzato come target specifico dei tumori [Mainini, F.; Bonizzi, A.; Sevieri, M.; Sitia, L.; Truffi, M.; Corsi, F.; Mazzucchelli, S. Protein-Based Nanoparticles for the Imaging and Treatment of Solid Tumors: The Case of Ferritin Nanocages, a Narrative Review. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 2000. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122000>]. Infine, essendo un materiale biocompatibile, la sua tossicità è minima. Per tutte queste ragioni, ed essendo possibile produrre grandi quantità di ferritina H (HFn) in laboratorio per via ricombinante a basso costo, questo tipo di particelle è particolarmente interessante al fine di svi-

luppare nuovi agenti diagnostici e terapeutici in ambito oncologico. Nell'ambito del Congresso sono stati mostrati diversi esperimenti che dimostrano come l'HFn caricata con doxorubicina abbia dato risultati di efficacia paragonabili al già citato Doxil® in un modello di tumore al seno triplo negativo (TNBC). In parallelo, l'HFn caricata con verde di indocianina (ICG), un marcatore fluorescente già utilizzato in test clinici per chirurgia guidata da fluorescenza, ha permesso di migliorare la specificità di *targeting*, distinguendo con precisione i margini tumorali dal tessuto sano circostante in un modello preclinico di TNBC. Nonostante questi promettenti risultati preliminari, non è ancora ben chiaro come ottimizzare le caratteristiche delle NP post-sintesi al fine di garantire il successo di tali approcci per uno sviluppo clinico. Le interazioni con l'organismo, infatti, sono in grado di modificare in modo marcato le proprietà delle particelle, influenzandone la biodistribuzione, la stabilità e anche la tossicità.

Infine, anche l'aspetto regolatorio è stato affrontato grazie all'intervento di **Andrea Spinazzè** (Dipartimento di Scienza e Alta Tecnologia – DiSAT, Università degli Studi dell'Insubria) con una presentazione dal titolo *"Approccio probabilistico per la valutazione del rischio a nanomateriali: casi studio in scenari di esposizione occupazionale"*. Andrea Spinazzè ha mostrato un metodo in grado di applicare la procedura di *risk assessment* per lo studio di *nanoplatelets* di grafene (GNPs: *graphene nanoplatelets*) [Spinazzè, A., Cattaneo, A., Borghi, F., et al. (2019). Probabilistic approach for the risk assessment of nanomaterials: A case study for graphene nanoplatelets. Int J Hyg Environ Health, 222(1):76-83. doi: 10.1016/j.ijheh.2018.08.011] e nanotubi di carbonio (CNTs: *carbon nanotubes*) [Spinazzè A, Zellino C, Borghi F, et al. (2021). Carbon Nanotubes: Probabilistic Approach for Occupational Risk Assessment. Nanomaterials, 11(2):409. doi: 10.3390/nano11020409].

I NP sono stati scelti come casi studio a causa del loro largo utilizzo in numerose applicazioni tecnologiche e della contestuale mancanza di informazioni riguardo il potenziale impatto sulla salute derivante dall'esposizione a tali NP. La valutazione del rischio è stata effettuata applicando la procedura tipicamente suddivisa in quattro fasi propedeutiche: (I) identificazione del pericolo, (II) valutazione della relazione dose-risposta, (III) valutazione dell'esposizione e (IV) caratterizzazione del rischio [National Research Council. Risk assessment in the federal government. Managing the process; National Academy Press: Washington D.C., 1983]. Nel corso dell'intervento è emerso come è bene sottolineare che alcuni limiti possono influire nell'interpretazione dei risultati e i limiti principali dello studio riguardano: l'eterogeneità delle proprietà chimico-fisiche delle NP, che possono aver determinato un certo grado di incertezza nella fase di valutazione del pericolo, ma anche alcune assunzioni, necessarie nella definizione di distribuzioni parametriche, che inevitabilmente introducono incertezze nella struttura del modello usato per la valutazione del rischio ed, infine, la selezione delle fonti usate per la valutazione del pericolo le quali potrebbe avere introdotto un *bias* nella procedura di valutazione del rischio. Nonostante queste limitazioni, lo studio presenta alcuni punti di forza: questo approccio ha consentito di ottenere una stima di un valore raccomandato di esposizione per due NP (BMCh), e consente di tenere conto della variabilità derivante dall'incertezza dei dati usati come fonte di informazioni per le fasi di valutazione della relazione dose-risposta, valutazione dell'esposizione e caratterizzazione del rischio, includendo quindi questa variabilità intrinseca nella procedura di valutazione del rischio. Dunque, l'approccio utilizzato consente di quantificare la probabilità associata all'accadimento di un rischio potenziale, includendo anche l'incertezza ad

essa associata e riportandone quantitativamente l'impatto sul risultato finale. Per concludere un approccio probabilistico è stato applicato in studi di valutazione del rischio per l'esposizione a NP in diversi scenari di esposizione occupazionali. Simulazioni stocastiche sono state utilizzate per le fasi di valutazione dose-risposta, valutazione dell'esposizione e caratterizzazione del rischio, consentendo l'introduzione di fonti di incertezza, il cui impatto sulla procedura di *risk assessment* è stato successivamente quantificato mediante un'analisi di sensibilità. L'approccio probabilistico adottato ha permesso di definire quantitativamente la probabilità che si verifichi una condizione di rischio per ciascuno scenario investigato, consentendo la valutazione di specifiche misure di gestione del rischio.

Al termine degli interventi si è generata una discussione molto stimolante che ha portato alla luce alcuni problemi comuni a chi lavora con le NP. È emersa la necessità di standardizzare i metodi analitici utilizzati per la quantificazione delle NP, determinando linee guida che tutti gli esperimenti dovrebbero seguire affinché i risultati siano affidabili. Strumenti diversi danno risposte relative a caratteristiche diverse delle NP che meritano di essere prese in considerazione: forma, dimensioni, struttura, analisi della superficie, sostanze adsorbite, aggregati. È emerso come sia molto importante in questo tipo di studi analizzare le caratteristiche chimico-fisiche delle NP, il loro bioaccumulo a livello dei tessuti e i loro effetti come particelle separate o aggregate. È inoltre emerso che in ambito ecotossicologico/ambientale una delle sfide è introdurre il monitoraggio della presenza in acqua delle NP che rende difficile effettuare *risk assesment* per fornire dati a sostegno delle soglie normative e dello sviluppo di standard di qualità ambientale. Variazioni in parametri ambientali potrebbero alterare, infatti, la tossicità delle NP: in un contesto di cambiamento climatico nel quale stia-

mo vivendo, studi che valutino variazioni di effetto di un contaminante in base a temperatura, salinità, pH e ossigeno disciolto sono sicuramente necessari per predirne gli effetti.

Le nanoparticelle rappresentano un argomento di grandissima attualità e sicuramente riguarderanno il futuro prossimo di chi lavora nell'ambito della ricerca sperimentale e regolamentatoria. Un ambito sicuramente in continua evoluzione che lascia quindi aperte ancora moltissime possibilità di studio e approfondimento.