



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PAVIA**

Corso di Laurea Magistrale interdipartimentale in  
Biotecnologie mediche e farmaceutiche

**Caratterizzazione dell'attività biologica di  
nanoparticelle composite a base di B<sub>4</sub>C come  
vettore di boro nella Boron Neutron Capture  
Therapy (BNCT)**

Relatore

*Prof.ssa Silva Bortolussi*

Correlatore

*Dott.ssa Patrizia Sommi*

*Dott.ssa Maria Paola Demichelis*

Tesi di Laurea Magistrale di

*Valentina Forlingieri*

Matricola n. *492015*

Anno Accademico 2021/2022



# INDICE

<b>PREFAZIONE</b> .....	<b>1</b>
<b>SCOPO DEL PROGETTO</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>4</b>
I.1 BNCT .....	4
I.2 NANOMEDICINA E NANOPARTICELLE.....	6
I.2.1 STRUTTURA DELLE NANOPARTICELLE .....	7
I.2.2 SUPERFICIE, <i>SHELL</i> E <i>CORE</i> .....	12
I.2.3 <i>PROTEIN CORONA</i> .....	13
I.3 MECCANISMI GENERALI DI ENDOCITOSI ED ESOCITOSI .....	14
I.3.1 INTERNALIZZAZIONE DELLE NANOPARTICELLE NELLE CELLULE.....	16
I.4 COLTURE CELLULARI .....	19
<b>CAPITOLO 1</b> .....	<b>21</b>
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	<b>21</b>
1.1 CARBURO DI BORO.....	21
1.1.1 SINTESI NANOPARTICELLE DI CARBURO DI BORO.....	21
1.1.2 QUANTIFICAZIONE DEL CARBURO DI BORO TRAMITE ICP.....	23
1.2 COLTURE CELLULARI .....	24
1.2.1 TRATTAMENTO DELLE CELLULE CON LE NANOPARTICELLE .....	24
1.3 TEST MTT .....	25
1.3.1 PROTOCOLLO ASSORBANZA MTT AL PLATE READER .....	26
1.3.2 PROTOCOLLO FLUORESCENZA AL PLATE READER .....	27
1.4 CAMERA DI BÜRKER.....	29
1.5 SEM - MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE - .....	30
1.5.1 PROTOCOLLO VISUALIZZAZIONE CELLULE SEM.....	31
1.6 CONFOCALE - MICROSCOPIO OTTICO - .....	32
1.6.1 PROTOCOLLO VISUALIZZAZIONE CELLULE CONFOCALE .....	34
1.7 CITOFLUORIMETRIA.....	35

1.8	TEM – MICROSCOPIO ELETTRONICO A TRASMISSIONE – .....	36
1.8.1	PROTOCOLLO VISUALIZZAZIONE CELLULE.....	37
1.9	QUANTIFICAZIONE DEL BORO NELLE CELLULE .....	38
1.9.1	QUANTIFICAZIONE IN CELLULE JURKAT TRAMITE ICP.....	38
1.9.2	QUANTIFICAZIONE IN CELLULE HeLa TRAMITE ICP .....	39
1.10	MISURE DELLA CONCENTRAZIONE DI BORO CON TECNICHE NUCLEARI	
	39	
1.9.1	PROTOCOLLO PREPARAZIONE CELLULE DA IRRAGGIARE .....	44
<b>CAPITOLO 2.....</b>		<b>46</b>
<b>RISULTATI OTTENUTI.....</b>		<b>46</b>
2.1	CARATTERIZZAZIONE DELLE NANOPARTICELLE DI B <sub>4</sub> C .....	46
2.1.1	QUANTIFICAZIONE DEL BORO NELLE FeBNP TRAMITE ICP .....	47
2.2	HELA E JURKAT .....	48
2.2.1	CAPTAZIONE DELLE FeBNP E VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ .....	48
2.2.2	VALUTAZIONE DELL'INTERAZIONE NANOPARTICELLE-CELLULE MEDIANTE MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE (SEM).....	52
2.2.3	VALUTAZIONE DELL'INTERAZIONE NANOPARTICELLE-CELLULE MEDIANTE L'ANALISI DELLA COMPONENTE FLUORESCENTE DELLE FeBNP <sub>3</sub> X.....	56
	1) ANALISI SPETTROFLUORIMETRICA.....	56
	2) ANALISI CITOFLUORIMETRICA.....	62
2.2.4	VERIFICA DELL'INTERNALIZZAZIONE DELLE NANOPARTICELLE NELLE CELLULE MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCALE E MICROSCOPIO ELETTRONICO A TRASMISSIONE (TEM).....	63
	1) MICROSCOPIO CONFOCALE.....	63
	2) MICROSCOPIO ELETTRONICO A TRASMISSIONE (TEM) .....	66
2.2.5	QUANTIFICAZIONE DEL BORO INTERNALIZZATO .....	70
	1) QUANTIFICAZIONE DEL CARBURO DI BORO IN CELLULE JURKAT (ICP).....	70
	2) QUANTIFICAZIONE DEL CARBURO DI BORO IN CELLULE HeLa (ICP) .....	71
	3) AUTORADIOGRAFIA NEUTRONICA IN CELLULE JURKAT E HeLa .....	72

<b>CAPITOLO 3.....</b>	<b>76</b>
<b>CONSIDERAZIONI FINALI E PROSPETTIVE FUTURE .....</b>	<b>76</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>81</b>
<b>RINGRAZIAMENTI .....</b>	<b>85</b>

# PREFAZIONE

---

## SCOPO DEL PROGETTO

Il presente lavoro di tesi si inserisce in un progetto molto più ampio che ha lo scopo di studiare ed ottimizzare una terapia oncologica innovativa che viene proposta in alternativa o in associazione alle classiche tecniche di chemioterapia e radioterapia. Il metodo proposto si basa su un nuovo approccio per realizzare la BNCT (*Boron Neutron Capture Therapy*), fondato sulla veicolazione di nanoparticelle di boro da parte di TIL (linfociti infiltranti il tumore) isolati da pazienti oncologici che migrano in cellule neoplastiche grazie alla fisiologica elevata affinità TIL-cellule tumorali. In questo modo, si può effettuare un trattamento efficace, altamente selettivo e che limiti gli effetti collaterali.

La BNCT è una terapia che avviene in due fasi: arricchimento delle cellule tumorali con adeguate concentrazioni dell'isotopo 10 del boro ( $^{10}\text{B}$ ) e successivo irraggiamento con neutroni di bassa energia. Il  $^{10}\text{B}$  ha una probabilità di interagire con i neutroni di bassa energia molto più alta rispetto agli altri elementi del tessuto biologico. La reazione che avviene, quindi, è una cattura, che emette particelle alfa (ione di  $^4\text{He}$ ) e un nucleo di  $^7\text{Li}$ . Pertanto, l'effetto terapeutico è dovuto al fatto che i prodotti della reazione di cattura neutronica sono particelle ad alto trasferimento lineare di energia (LET), poco penetranti, capaci di causare danni irreversibili alla cellula in cui avviene la reazione. Il rilascio energetico risulta quindi limitato a una regione circoscritta, di dimensioni confrontabili con un caratteristico diametro cellulare (tipicamente 5-9  $\mu\text{m}$ ) e ciò consente di compromettere le funzioni vitali delle cellule tumorali senza causare danno alle cellule circostanti, potenzialmente sane.

Mediante uno studio interdisciplinare tra il dipartimento di Chimica, Fisica e Medicina Molecolare dell'Università degli Studi di Pavia, sono state sintetizzate nanoparticelle composite compatibili con sistemi biologici da utilizzare come vettori di  $^{10}\text{B}$ . Le nanoparticelle utilizzate, sono costituite da due fasi:  $\text{B}_4\text{C}$  (utilizzato come vettore di  $^{10}\text{B}$ ), e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , attivo in risonanza magnetica (MRI); di conseguenza, nel testo saranno chiamate

“*FeBNP*”. Lo studio dell’internalizzazione NP-cellula si è svolto dapprima in cellule Jurkat, linea linfocitaria, e in cellule HeLa, coltivate in adesione, per poi traslare i risultati ottimali ottenuti in cellule linfocitarie umane CD8<sup>+</sup> provenienti da paziente. Quest’ultime ci sono state fornite dal centro oncologico Istituto Romagnolo per lo Studio dei Tumori "Dino Amadori" - IRST IRCCS, di Meldola (FC), con cui si è avviata una collaborazione per la realizzazione del presente progetto. La (Figura 1) rappresenta il concetto terapeutico della BNCT, su cui si basano gli studi descritti in questa tesi.

L’innovazione risiede nei seguenti due aspetti:

1. Utilizzo di nanoparticelle di boro (BNP) come alternativa ai composti borati attualmente usati nelle applicazioni cliniche di BNCT
2. Utilizzo di cellule linfocitarie quali vettori di boro, in grado di assicurare un “*delivery*” altamente specifico al tumore.

La vera innovazione del presente lavoro consiste nella nuova strategia di veicolazione del boro. Si propone di sostituire la Borofenilalanina (BPA), attualmente utilizzata nelle applicazioni cliniche di BNCT come trasportatore del boro, con nanomateriali contenenti <sup>10</sup>B, e veicolati tramite un *carrier* cellulare, i linfociti. I linfociti T riconoscono il tumore e naturalmente si concentrano nel target. L’idea è quindi di caricare il boro in colture cellulari di linfociti prelevati dal paziente, per poi re-immetterli e sfruttare la loro specificità per ottenere un rapporto di concentrazione di boro tra tumore e tessuti sani più alto. Tale sostituzione innova completamente la modalità di veicolazione, in quanto, non più chimica, ma biologica, con due vantaggi principali: ottenimento di un assorbimento molto specifico e somministrazione di cellule già caricate di boro precedentemente, che riduce il tempo di preparazione per il paziente. Infatti, l’impiego di vettori chimici richiede la somministrazione di grandi volumi di soluzioni e quindi un tempo di almeno due ore di infusione.

Le diverse fasi di questo studio hanno compreso la sintesi delle BNP (sintesi e analisi chimico fisiche), lo studio dell’interazione BNP-cellule (test internalizzazione, valutazione vitalità cellulare), quantificazione e *imaging* della distribuzione del boro tramite metodo nucleare (irraggiamento neutronico, analisi post irraggiamento).

Oltre alla messa a punto della sintesi delle FeBNP, uno dei primi obiettivi è stato quello di stabilire la concentrazione e le tempistiche ottimali per l’internalizzazione delle nanoparticelle nelle cellule, in modo da poter raggiungere una concentrazione minima

terapeutica pari a  $25-30 \mu\text{g } ^{10}\text{B/g}$  di tumore ( $\sim 10^9$  atomi/cellula). Sono state effettuate analisi biologiche e chimico-fisiche tramite microscopia a fluorescenza, assorbanza, confocale, dynamic light scattering (DLS), microscopia elettronica a scansione (SEM) e microscopia elettronica a trasmissione (TEM).

In seguito, è stato valutato l'assorbimento del  $^{10}\text{B}$  da parte delle cellule. Le misure di concentrazione e l'*imaging* della distribuzione del boro sono state ottenute tramite analisi chimica, mediante ICP ottico, e irraggiamento neutronico di campioni cellulari presso il reattore nucleare del L.E.N.A (Laboratorio Energia Nucleare Applicata). In particolare, campioni biologici precedentemente trattati con  $^{10}\text{B}$  sono stati, nel caso dell'analisi ICP, digeriti per quantificare il contenuto in B captato dalle cellule, oppure, mediante autoradiografia neutronica, esposti ad un campo di neutroni termici in contatto con rivelatori sensibili alle particelle secondarie cariche che sono rivelate per fornire informazioni sulla quantità e sulla distribuzione di boro nei pellet cellulari.

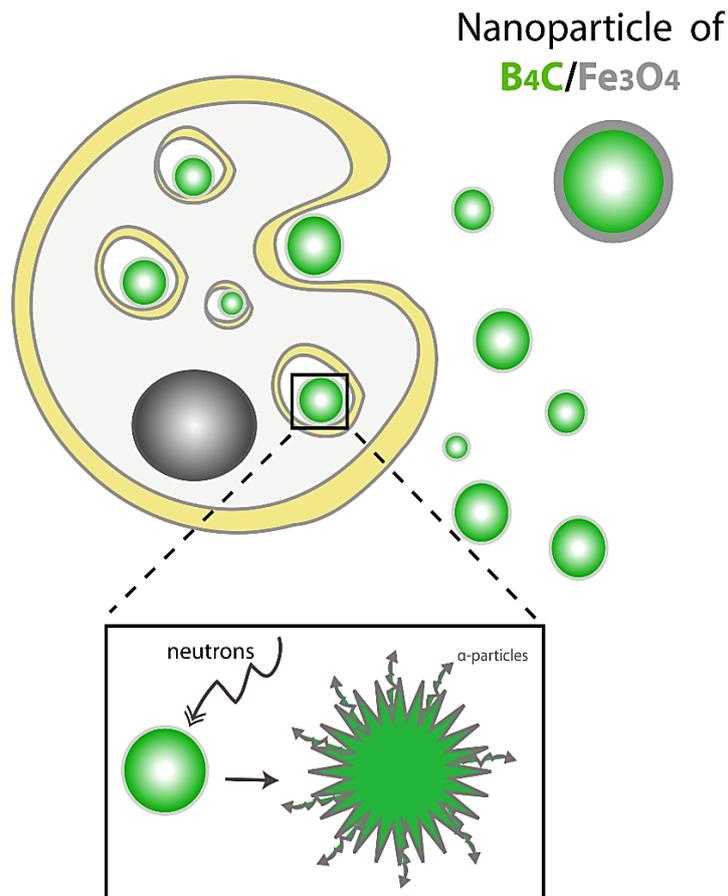


Figura 1: Rappresentazione grafica del progetto di tesi. In verde, nanoparticelle ferro-borate che vengono internalizzate da cellule con successivo irraggiamento e formazione di particelle  $\alpha$  che causano danni irreversibili nella cellula in cui avviene la reazione

# INTRODUZIONE

---

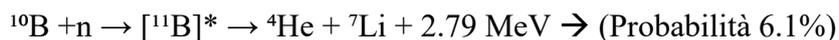
## BNCT, NANOMEDICINA E COLTURE CELLULARI

In questo capitolo sono presentati i principi di base di (I.1) BNCT, (I.2) nanoparticelle, nanomedicina, (I.3) meccanismi di internalizzazione e (I.4) colture cellulari. Di ciascuno di questi aspetti sarà considerata l'applicazione in ambito medico, al fine di descrivere come, in questo progetto di tesi, siano state sfruttate tutte queste componenti nell'ottica di proporre una radioterapia innovativa.

### I.1 BNCT

La BNCT (*Boron Neutron Capture Therapy*) è una radioterapia che sfrutta l'elevata sezione d'urto di cattura neutronica del nuclide stabile  $^{10}\text{B}$  per il trattamento di tumori resistenti a terapie tradizionali<sup>1</sup>. La terapia utilizza due elementi indipendenti, singolarmente non letali: un farmaco contenente  $^{10}\text{B}$  (*carrier*) capace di concentrarsi in maggior misura nel tumore e un flusso di neutroni di bassa energia. La BNCT si basa, quindi, sulla reazione di cattura neutronica da parte del  $^{10}\text{B}$  (isotopo che ha una abbondanza naturale del 20%)<sup>2</sup>. Specificatamente, l'assorbimento del neutrone comporta la formazione del nuclide instabile  $^{11}\text{B}^*$  che decade producendo particelle secondarie  $\alpha$  ( $^4\text{He}$ ) e un nucleo di  $^7\text{Li}$ . Nel 94% delle reazioni parte dell'energia viene emessa anche come radiazione  $\gamma$ .

La reazione nucleare è così schematizzata:



Le particelle secondarie prodotte hanno un'elevata energia di trasferimento lineare (LET) e causano danni letali alle strutture cellulari. L'elevato LET implica, inoltre, che queste particelle ( $\alpha$ ,  $^7\text{Li}$ ) abbiano un *range* breve all'interno dei tessuti biologici, che varia da 4.5 a 10  $\mu\text{m}$ , di conseguenza, la loro energia viene depositata in una regione limitata alla singola cellula contenente  $^{10}\text{B}$  o alle prime vicine. Tutto ciò consente di danneggiare

selettivamente cellule tumorali precedentemente arricchite in  $^{10}\text{B}$ , risparmiando le cellule sane circostanti che hanno assorbito concentrazioni più basse di boro (Figura 2). Nei tessuti sono presenti altri elementi che possono contribuire alla deposizione di energia per cattura neutronica, come idrogeno e azoto, secondo le seguenti reazioni:

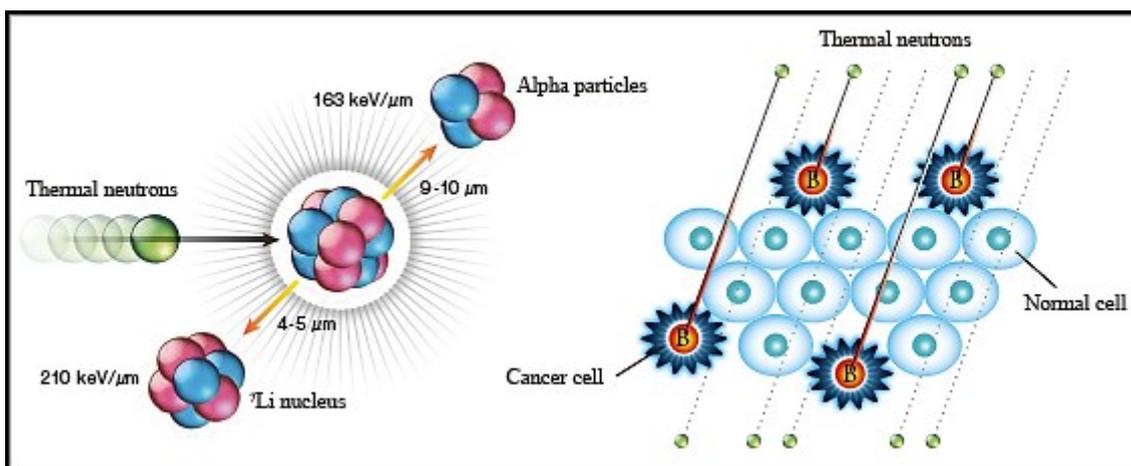
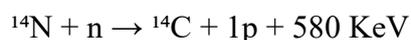
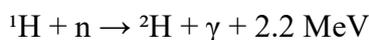


Figura 2<sup>3</sup>: Cattura neutronica con formazione di particelle secondarie basata su reazioni di cattura del  $^{10}\text{B}$  con conseguente danneggiamento delle cellule tumorali.

Inoltre, esiste sempre una componente di radiazione gamma (fotoni) nel fascio di neutroni, che quindi è responsabile di una ulteriore deposizione di dose indifferenziata a tutti i tessuti, indipendentemente dalla concentrazione del boro (così come le reazioni di cattura nell'idrogeno e nell'azoto sopra descritte).

Infine, se si irraggia il paziente con neutroni di energia intermedia (epitermici), in modo che questi perdano energia nei tessuti e arrivino alla profondità del tumore con l'energia che massimizza la probabilità di cattura nel boro, ci sarà deposizione di dose per scattering dei neutroni sull'idrogeno. Questa reazione produce protoni di energia media uguale alla metà del neutrone incidente.

Il danno biologico causato dalla BNCT è quindi dovuto alla deposizione di energia da parte di tre radiazioni ionizzanti che differiscono per LET:

- Raggi  $\gamma$ : prodotti a seguito della cattura neutronica da parte di  $^{10}\text{B}$  e  $^1\text{H}$ , che hanno basso LET, e dalla componente di fotoni presente nel campo neutronico;

- Protoni: prodotti a seguito della cattura neutronica da parte di  $^{14}\text{N}$ , e per scattering dei neutroni in  $^1\text{H}$ , che hanno LET intermedio;
- Particelle cariche più pesanti:  $^4\text{He}$ ,  $^7\text{Li}$  e  $^{14}\text{C}$  rilasciate come prodotto della reazione di cattura del  $^{10}\text{B}$  e  $^{14}\text{N}$ , che hanno alto LET

Per ottimizzare la deposizione di dose ed ottenere un effetto terapeutico è quindi necessario ottenere un rapporto di concentrazione di boro il più alto possibile tra tumore e tessuti sani, in modo da minimizzare la dose dovuta a protoni e fotoni rispetto a quella del boro.

La terapia a cattura neutronica offre diversi vantaggi rispetto alla radioterapia convenzionale. Innanzitutto, quello di poter trattare efficacemente e selettivamente i tessuti tumorali riducendo al minimo gli effetti secondari legati ad eventuali danni arrecati a tessuti sani circostanti. Inoltre, le particelle  $\alpha$  e i nuclei di litio possono distruggere indistintamente sia cellule in fase di divisione che cellule mature, senza richiedere l'apporto di ossigeno, al contrario di quanto avviene nelle radioterapie tradizionali a fotoni. Queste, infatti, agiscono in forma indiretta, attraverso lo sviluppo di radicali liberi che a loro volta danneggiano il tumore. Le radioterapie ad alto LET, invece, causano danni cellulari per interazione diretta con il DNA cellulare.

## I.2 NANOMEDICINA E NANOPARTICELLE

Nell'ambito della ricerca scientifica, i materiali nanometrici sono attivamente studiati e rappresentano un settore tecnologico ed economico in larga espansione. Negli ultimi anni, si è assistito a una crescita senza precedenti della ricerca e delle applicazioni nel settore delle nanoscienze e delle nanotecnologie. C'è un crescente ottimismo sul fatto che la nanotecnologia, applicata alla medicina, porterà progressi significativi nella diagnosi e nel trattamento delle malattie<sup>3</sup>. La nanomedicina, in particolare, rappresenta l'applicazione medica delle nanotecnologie, un settore che si occupa della comprensione e del controllo della materia con dimensioni tra  $1$  e  $100\text{ nm}$ . La nanomedicina, in particolare, si occupa di sviluppare materiali nanometrici da utilizzare come agenti terapeutici, diagnostici, di *imaging* o multifunzionali (teranostici). Le nanoparticelle (NP) e i materiali nanostrutturati hanno caratteristiche chimico-fisiche distinte da quelle del materiale di origine (*bulk*), quali variazioni nel punto di fusione, nella conducibilità elettrica e termica, nell'attività catalitica, nell'assorbimento e nello *scattering* della luce

indotto dalla nanostruttura. Queste proprietà possono essere sfruttate per superare alcune delle limitazioni tipiche degli agenti terapeutici e diagnostici tradizionali<sup>4</sup>.

Il motivo per cui queste nanoparticelle sono attraenti per scopi medici è dovuto alle loro peculiari caratteristiche chimico-fisiche, come il loro rapporto superficie/massa che è molto più grande di quello di particelle con dimensioni superiori, le loro proprietà quantistiche e la capacità di assorbire e trasportare altri composti. Generalmente le nanoparticelle sono definite come materiale particolato potenzialmente in grado di penetrare le barriere fisiologiche (come cute, epitelio intestinale, apparato respiratorio, barriera ematoencefalica) in modo da essere internalizzate dalle cellule ed accumulate nel citoplasma e nei compartimenti subcellulari, dove possono influire sulla fisiologia cellulare. A tal proposito, un requisito fondamentale delle NP per l'utilizzo in ambito medico è la stabilità in ambito biologico, ossia, la capacità di non andare incontro a fenomeni di agglomerazione, precipitazione e complessazione<sup>5</sup>, riducendo e/o annullando i vantaggi offerti dalle dimensioni nanometriche.

### 1.2.1 Struttura delle nanoparticelle

Le nanoparticelle possono essere suddivise in diverse classi e sottoclassi in base alla loro struttura, capacità di funzionalizzazione, forma, carica superficiale e risposta del paziente. Possono essere suddivise in tre macrocategorie, a seconda del materiale di cui sono composte (Figura 3):

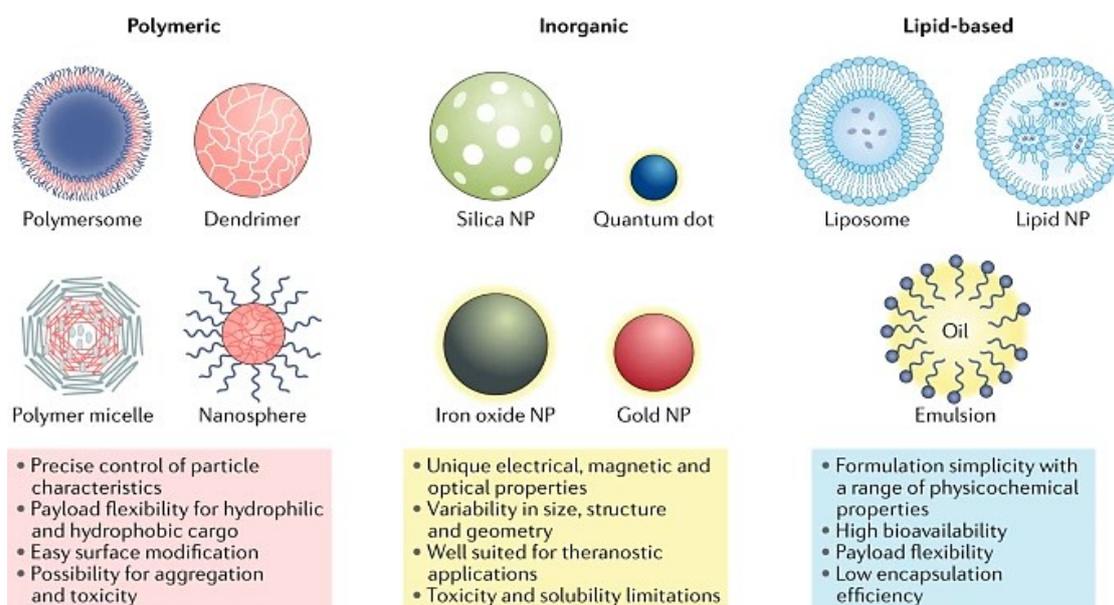


Figura 3: Forma e struttura di varie classi di nanoparticelle (NP) con le loro relative sottoclassi<sup>7</sup>

## NP A BASE DI LIPIDI

Le NP a base lipidica includono varie sottoclassi. Sono tipicamente sferiche composte da un doppio strato lipidico che delimita un compartimento interno. Fanno parte dei nanomateriali più utilizzati nei sistemi di *delivery*, offrono molti vantaggi, tra cui la semplicità di formulazione e formazione, la biocompatibilità, l'elevata biodisponibilità, la capacità di trasportare grandi volumi di materiale all'interno della loro cavità e una gamma di proprietà fisico-chimiche che possono essere controllate per modulare le loro caratteristiche biologiche. Per questi motivi, le NP a base lipidica sono le più comunemente utilizzate in nanomedicina e approvate dalla FDA (*Federal and Drug Administration*).

- LIPOSOMI: Sono uno dei sottoinsiemi delle NP a base lipidica. Sono composti da fosfolipidi che possono formare strutture vescicolari unilamellari e multilamellari. Ciò consente al liposoma di trasportare e rilasciare farmaci idrofili, idrofobici e lipofili al loro interno. La loro stabilità, in vitro e in vivo, dipende dalla dimensione delle NP, dalla carica superficiale, dalla composizione lipidica, dal numero di strati e dalle funzionalizzazioni superficiali (con leganti molecolari o polimeri). Perché possano essere rapidamente assorbiti dal sistema reticoloendoteliale, i liposomi spesso presentano modifiche superficiali volte a prolungare il tempo di circolazione nell'organismo ed aumentare la probabilità che possano raggiungere il loro target finale. L'utilizzo dei liposomi come veicolo di farmaci offre numerosi vantaggi rispetto alle tecnologie tradizionali, come, la possibilità di ridurre le dosi dei farmaci aumentando la selettività verso gli organi bersaglio, e la riduzione degli effetti collaterali potenzialmente dannosi.

- NANOPARTICELLE LIPIDICHE (LNP): sono strutture simili ai liposomi ampiamente utilizzate per il *delivery* di acidi nucleici. Differiscono dai liposomi tradizionali perché formano strutture micellari all'interno del nucleo della particella, una morfologia che può essere modificata in base alla formulazione e ai parametri di sintesi. Le LNP sono tipicamente formate da quattro componenti principali: i lipidi cationici (o ionizzabili) che permettono al liposoma di evitare il passaggio negli endosomi, i fosfolipidi per la struttura delle particelle, il colesterolo per la stabilità e la fusione con le membrane e i lipidi PEGilati per migliorare la stabilità e la circolazione. L'efficacia del rilascio dell'acido nucleico insieme alla loro semplice sintesi, alle dimensioni ridotte e alla stabilità del siero, hanno reso le LNP particolarmente importanti nelle applicazioni di terapia genetica

personalizzata. Le LNP ionizzabili sono una piattaforma ideale poiché hanno una carica quasi neutra a pH fisiologico, ma si caricano nei compartimenti endosomiali acidi, promuovendo la fuga endosomiale per la somministrazione intracellulare. Tuttavia, nonostante questi vantaggi, i sistemi LNP possono ancora essere limitati dal basso carico di farmaco e dalla biodistribuzione che si traduce in un elevato assorbimento da parte del fegato e della milza

## NP POLIMERICHE

Le NP polimeriche possono essere sintetizzate da materiali naturali o sintetici, nonché, da monomeri o polimeri preformati, consentendo un'ampia varietà di possibili strutture e caratteristiche. Possono essere formulati per consentire un controllo preciso e sono generalmente buoni veicoli *delivery* perché biocompatibili con parametri di formulazione semplici. Le NP polimeriche sono sintetizzate utilizzando varie tecniche, come, l'emulsificazione (spostamento o diffusione del solvente), la nanoprecipitazione, la gelificazione ionica e la microfluidica, che si traducono tutti in prodotti finali diversi. Le NP polimeriche hanno anche capacità di rilascio di farmaci variabili. Le sostanze terapeutiche possono essere incapsulate all'interno del nucleo delle NP, intrappolate nella matrice polimerica, coniugate chimicamente al polimero o legate alla superficie NP. Ciò consente il *delivery* di vari materiali inclusi composti idrofobi e idrofili, nonché piccole molecole, macromolecole biologiche, proteine e vaccini, rendendo le NP polimeriche ideali per il *delivery* di farmaci. Modulando proprietà come composizione, stabilità, responsività e carica superficiale, l'efficacia del caricamento e la cinetica di rilascio di queste terapie possono essere controllate con precisione. Nel complesso, le NP polimeriche sono candidate ideali per il rilascio di farmaci perché biodegradabili, idrosolubili, biocompatibili, biomimetiche e stabili durante la conservazione. Le loro superfici possono essere facilmente modificate per un targeting aggiuntivo, consentendo loro di fornire farmaci, proteine e materiale genetico a tessuti mirati, il che le rende utili nella medicina del cancro, nella terapia genica e nella diagnostica. Tuttavia, gli svantaggi delle NP polimeriche includono un aumento del rischio di aggregazione e tossicità delle particelle. Solo un piccolo numero di nanomedicinali polimerici è attualmente approvato dalla FDA e utilizzato in clinica, ma i nanovettori polimerici sono attualmente sottoposti a test in numerosi studi clinici.

- NANOCAPSULE e NANOSFERE: Le nanocapsule sono le forme più comuni di NP polimeriche. Sono cavità circondate da una membrana o guscio polimerico. Le nanosfere, invece, sono sistemi a matrice solida. All'interno di queste due grandi categorie, le NP sono ulteriormente suddivise in polimeri, micelle e dendrimeri.

Le nanocapsule polimeriche sono membrane realizzate utilizzando copolimeri a blocchi anfifilici. Sono paragonabili ai liposomi e sono spesso localmente reattive; hanno una migliore stabilità ed efficienza di ritenzione del carico il che li rende veicoli efficaci per la consegna di terapie al citosol. Alcuni polimeri, comunemente copolimerizzati per queste applicazioni, includono il poli-etilenglicole (PEG) e il poli-dimetilsilossano (PDMS). Le micelle polimeriche sono anche copolimeri a blocchi tipicamente reattivi, si auto-assemblano per formare nanosfere con un nucleo idrofilo e un rivestimento idrofobo: questo serve a proteggere il carico acquoso del farmaco e a migliorare i tempi di circolazione. Le micelle polimeriche possono anche essere miste e presentare, nel monostrato, molecole che intercalano ed espongono funzionalità idrofile. In questo caso, possono caricare vari tipi terapeutici, dalle piccole molecole alle proteine, ed essere utilizzate per la somministrazione di terapie antitumorali negli studi clinici.

I dendrimeri sono polimeri iperramificati con complesse architetture tridimensionali per le quali, la massa, le dimensioni, la forma e la chimica della superficie possono essere altamente controllate. I gruppi funzionali attivi presenti all'esterno dei dendrimeri consentono la coniugazione di biomolecole o agenti di contrasto sulla superficie, mentre i farmaci possono essere caricati all'interno. I dendrimeri possono contenere molti tipi di carico, ma sono più comunemente studiati per la consegna di acidi nucleici e piccole molecole. Per queste applicazioni vengono comunemente utilizzati polimeri caricati come la poli-etilenimina (PEI) e la poli-ammidoammina (PAMAM). Diversi prodotti a base di dendrimeri sono attualmente in sperimentazione clinica come agenti teranostici, agenti di trasfezione, gel topici e agenti di contrasto.

I polimeri caricati possono essere utilizzati anche per formare NP non dendrimeriche. I polielettroliti ne sono un esempio: sono nanoparticelle formate da due polielettroliti di carica opposta che si assemblano in nanostrutture se si trovano nelle condizioni adeguate. I polielettroliti sono stati incorporati in numerose formulazioni di NP per migliorare proprietà come la biodisponibilità e il trasporto della mucosa. Sono anche intrinsecamente reattivi e possono essere utili per il rilascio intracellulare.

## NP INORGANICHE

I nanomateriali inorganici utilizzati in ambito medico presentano un *core* inorganico, costituito da materiali come oro, ferro e silice, e un *layer* esterno costituito da molecole o polimeri organici che li stabilizzano in sospensione e/o forniscono funzionalità. Le loro applicazioni sono differenti, come la veicolazione di farmaci, *l'imaging*, e dipendono, sia dal materiale da cui è costituito il *core*, sia dalle funzionalizzazioni superficiali. Queste NP inorganiche sono formulate con precisione e possono essere progettate per avere un'ampia varietà di dimensioni, strutture e geometrie. Inoltre, le NP inorganiche hanno proprietà fisiche, elettriche, magnetiche e ottiche uniche, dovute alle proprietà del materiale nanostrutturato. A causa delle loro proprietà magnetiche, radioattive o plasmoniche, le NP inorganiche possono essere utilizzate per applicazioni legate alla diagnostica, all'*imaging* e alle terapie fototermiche. Presentano una buona biocompatibilità e stabilità, inoltre, soddisfano applicazioni di nicchia che richiedono proprietà irraggiungibili dai materiali organici. Tuttavia, nel caso delle formulazioni che utilizzano metalli pesanti, le applicazioni cliniche sono limitate a causa della loro alta solubilità e tossicità.

- NP D'ORO (AuNP): sono le più studiate ed utilizzate in varie forme come nanosfere, nanotubi, nanostelle, nanogusci e nanogabbie. Gli AuNP possiedono elettroni liberi sulla loro superficie che oscillano continuamente a una frequenza dipendente dalla loro dimensione e forma, conferendo loro proprietà fototermiche. Queste NP sono anche facilmente funzionalizzabili, garantendo loro proprietà aggiuntive e capacità di *delivery*.

- OSSIDO DI FERRO: è un altro materiale comunemente utilizzato nella sintesi di NP inorganiche e costituiscono la maggior parte delle nanomedicine inorganiche approvate dalla FDA. Le NP magnetiche di ossido di ferro composte da magnetite ( $Fe_3O_4$ ) o maghemite ( $Fe_2O_3$ ) possiedono proprietà superparamagnetiche in base alle dimensioni. Sono utilizzate come agenti di contrasto, veicoli per la somministrazione di farmaci e nelle terapie a base termica e numerose NP inorganiche sono già approvate dall'FDA, o in fase di trial clinico.

Altre NP inorganiche comuni includono il fosfato di calcio e le NP di silice mesoporosa, che sono state entrambe utilizzate con successo per la somministrazione di acidi nucleici e farmaci. I *quantum dots*, tipicamente costituiti da materiali semiconduttori come il

silicio, sono NP utilizzate principalmente nelle applicazioni di *imaging* in vitro, ma mostrano risultati promettenti anche per la diagnostica in vivo<sup>7</sup>.

### I.2.2 Superficie, *shell* e *core*

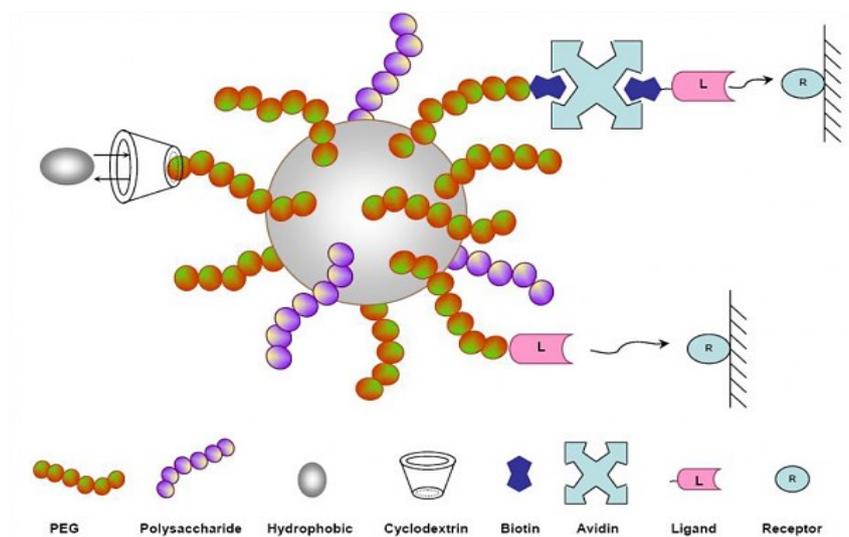


Figura 4 Aggiunta/modifica di funzionalità superficiali per il controllo del rilascio e il targeting<sup>8</sup>

Una nanoparticella può essere considerata divisa in diversi strati: uno strato superficiale (in aggiunta al *coating*) spesso funzionalizzato; un guscio (*shell*) esterno; e il materiale che forma il *core*. Spesso ci si riferisce solo al materiale che forma il *core* della nanoparticella, in quanto questa è la parte che spesso determina le proprietà chiave della nanoparticella stessa, rendendola specifica per un particolare utilizzo (Figura 4).

Ogni nanoparticella è caratterizzata da un elevato rapporto area superficiale/volume che le permette di avere proprietà uniche. Nel caso di una nanoparticella magnetica, utilizzata per applicazioni in nanomedicina, essa sarà costituita da un nucleo magnetico di materiale inorganico e da un rivestimento superficiale scelto in base alla sua applicazione finale e al mezzo nel quale dovranno rimanere in sospensione. Più piccole sono le nanoparticelle, maggiore è l'area superficiale che potrà essere sfruttata per il rilascio di componenti attivi localizzati sulla superficie stessa, ma maggiore sarà anche la tendenza ad aggregare. Per prevenire l'aggregazione la superficie delle nanoparticelle deve essere funzionalizzata. La funzionalizzazione della superficie è dunque un passaggio critico che consiste nel trattare la nanoparticella con un rivestimento (*coating*) che ne facilita la dispersione nel mezzo acquoso (tale è considerato ogni ambiente biologico). In alcuni casi questi rivestimenti sono costituiti da surfattanti che formano interazioni di *Van der Waals*

transienti con la superficie e restano in equilibrio con le molecole di surfattante libero. In altri casi, invece, una molecola o uno ione vengono legati alla superficie della nanoparticella al fine di favorire la stabilizzazione della sospensione particellare.

### **I.2.3 Protein corona**

In un sistema biologico, le interazioni tra le nanoparticelle e le proteine giocano un ruolo fondamentale nel comportamento delle NP e sul loro effetto<sup>9</sup>. Quando un nanomateriale è somministrato per via endovenosa questo può adsorbire proteine e lipidi sulla sua superficie in modo più o meno specifico a seconda della natura dei gruppi funzionali coinvolti nell'interazione e del tempo di circolazione del materiale. L'adsorbimento delle proteine è governato dalle affinità proteina-NP e dalle interazioni proteina-proteina. L'insieme delle proteine adsorbite sulla superficie della nanoparticella è chiamato "*protein corona*". La sua presenza può modificare le proprietà del materiale mascherandone l'identità e talvolta impedendo la funzione della nanoparticella stessa. Al contrario, l'adesione controllata di proteine specifiche può essere tuttavia sfruttata per favorire la reattività della nanoparticella in ambiente biologico, come ad esempio l'attraversamento delle barriere fisiologiche (barriera ematoencefalica) e l'internalizzazione da parte della cellula. In generale però la formazione della corona proteica è un evento indesiderato in grado di alterare il comportamento della nanoparticella, prevenendone l'efficacia. Per sfuggire all'adesione aspecifica di proteine sulla superficie delle NP, si ricorre al *capping* del nanomateriale, ovvero alla sua funzionalizzazione superficiale. Questo permette al nanomateriale di essere stabile in sospensione, e di essere mascherato agli occhi del sistema immunitario, al fine di limitarne l'opsonizzazione. La stabilizzazione della sospensione tramite introduzione di un agente cappante avviene per effetto sterico e/o elettrostatico<sup>10</sup>. L'agente cappante può essere introdotto in fase di sintesi o in una fase successiva. Nel primo caso esso rappresenta anche un mezzo di controllo delle dimensioni e della forma dei nanomateriali. Una classe di molecole ampiamente utilizzate come agenti cappanti è quella dei polimeri anfifilici di origine naturale (come il destrano e il chitosano) o sintetica (quali l'acido poliacrilico (PAA) o il polietilenglicole (PEG)). La modifica della superficie con polietilenglicole (PEG) permetta una maggiore persistenza nel torrente circolatorio inibendo il riconoscimento e la fagocitosi da parte del sistema fagocitico mononucleare.

La caratterizzazione chimico fisica delle nanoparticelle viene valutata mediante diffrazione X (XRD), per analizzare la composizione, *dynamic light scattering* (DLS), microscopia elettronica a scansione (SEM) e microscopia elettronica a trasmissione (TEM), per valutarne dimensione, forma e stato di aggregazione.

### I.3 MECCANISMI GENERALI DI ENDOCITOSI ED ESOCITOSI

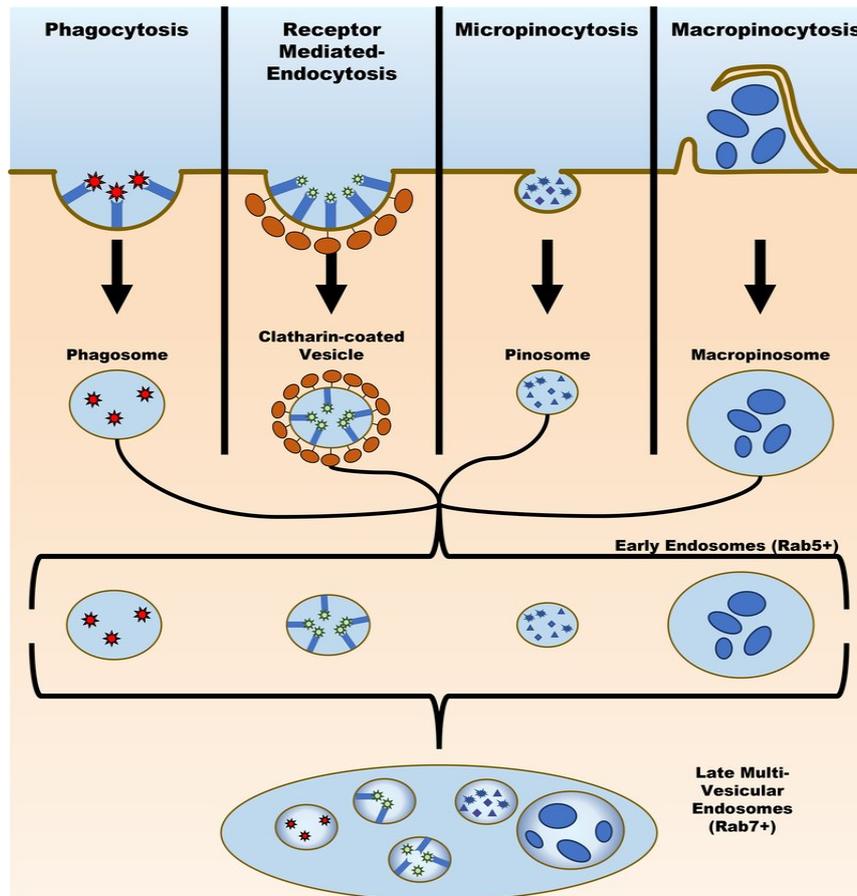


Figura 5: Interazioni nanoparticella-cellula che permettono la loro internalizzazione<sup>3</sup>

Soluti e acqua possono essere trasportati all'interno della cellula mediante endocitosi ed essere liberati dalla cellula mediante esocitosi. In entrambi i processi la membrana plasmatica resta intatta e le vescicole che si formano consentono il passaggio dei contenuti tra compartimenti cellulari. L'endocitosi comprende tre meccanismi (Figura 5). Il primo, pinocitosi, consiste nell'assunzione non specifica di piccole molecole e acqua. Questo processo rappresenta una proprietà essenziale delle cellule endoteliali che rivestono l'interno dei capillari ed è responsabile di parte dello scambio di liquidi che avviene attraverso i vasi sanguigni. Il secondo meccanismo, fagocitosi, consente l'assunzione di

particelle di grandi dimensioni come batteri e detriti cellulari. La fagocitosi rappresenta un'importante caratteristica delle cellule del sistema immunitario come neutrofili e macrofagi. Spesso questi ultimi hanno sulla loro superficie dei recettori che si legano al frammento *Fc* delle immunoglobuline. I batteri vengono rivestiti di anticorpi (opsonizzazione), si legano alle membrane dei macrofagi attraverso il frammento *Fc* delle immunoglobuline e vengono fagocitati per poi essere distrutti all'interno della cellula. Il terzo meccanismo, endocitosi mediata da recettori, consente l'assunzione nella cellula di specifiche molecole. In questa forma di endocitosi le molecole si legano a particolari recettori sulla superficie cellulare. L'endocitosi interessa varie proteine accessorie.

L'esocitosi può essere costitutiva o regolata. La prima avviene per esempio nelle plasmacellule durante la secrezione di immunoglobuline o nei fibroblasti durante l'essudazione di collagene. La secrezione regolata, invece, si osserva nelle cellule endocrine, nei neuroni e nelle cellule delle ghiandole esocrine come le cellule acinose del pancreas. In queste cellule il prodotto della secrezione (ormone, neurotrasmettitore, enzima digestivo), dopo la sintesi e l'elaborazione del RER e nell'apparato di Golgi, viene accumulato in vescicole secretorie nel citoplasma fino a che uno specifico stimolo ne determina la secrezione. Tali segnali sono ormonali o neurali. Una volta che la cellula ha ricevuto lo stimolo, la vescicola secretoria si fonde con la membrana plasmatica e libera il proprio contenuto nel liquido extracellulare. La fusione della vescicola con la membrana è mediata da varie proteine accessorie come il gruppo delle SNARE. Il processo di secrezione è comunemente determinato da un aumento del  $[Ca^{2+}]$  intracellulare, con due importanti eccezioni: la secrezione di renina da parte delle cellule iuxtaglomerulari del rene e quella dell'ormone paratiroideo PTH che sono determinata da una diminuzione del  $[Ca^{2+}]$  intracellulare<sup>11</sup>.

### I.3.1 Internalizzazione delle nanoparticelle nelle cellule

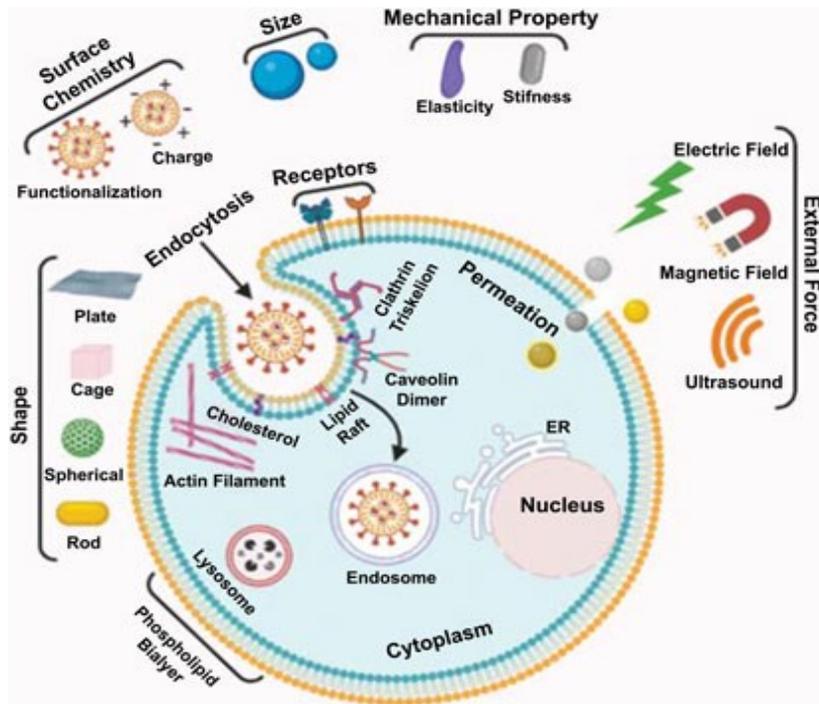


Figura 6: Meccanismi di endocitosi cellulare<sup>13</sup>

La medesima via di internalizzazione dell'acqua e dei soluti è utilizzata anche dalle NP per penetrare nelle cellule. Affinché le NPs svolgano la loro funzione nel “*drug delivery*”, è infatti fondamentale che riescano a raggiungere le cellule target e ad essere internalizzate.

L'internalizzazione efficiente e controllata delle NP nelle cellule dipende dalle loro proprietà fisico-chimiche e dalla dinamica della membrana plasmatica. L'interazione NP-cellula è un meccanismo complesso che avviene principalmente mediante i comuni processi di endocitosi cellulare<sup>12</sup> (Figura 5 e 6). I meccanismi di trasporto delle nanoparticelle attraverso le membrane cellulari possono avvenire mediante trasporto passivo, come nel caso della pinocitosi e della fagocitosi, oppure, mediante trasporto attivo, come nel caso dell'endocitosi mediata da recettori. Quest'ultimo è un meccanismo più specifico dove la NP viene riconosciuta da un recettore, in genere un peptide di membrana, che la trasporta attivamente attraverso il doppio strato fosfolipidico. Un targeting specifico si ottiene funzionalizzando la superficie delle nanoparticelle in modo che esse interagiscano con un componente di membrana presente esclusivamente o principalmente sulle cellule (target) che si intendono raggiungere. In generale, la maggior parte dell'internalizzazione è dovuta all'endocitosi mediata dal recettore (RME), in

particolare la fagocitosi, l'endocitosi mediata da clatrina (CME) e l'endocitosi mediata dalla caveolina (Cav. ME). La scelta dipende dalle dimensioni della nanoparticella e dalle loro caratteristiche di superficie. In seguito, sulla membrana, la particella viene invaginata generando una cascata di segnali a valle. L'internalizzazione delle nanoparticelle da parte delle cellule si svolge in tre fasi: l'adesione superficiale, che avvia il conseguente processo di endocitosi, il passaggio negli endosomi precoci e la traslocazione negli endosomi tardivi o nei lisosomi.<sup>13</sup>

Fattori che possono influenzare l'internalizzazione sono le dimensioni, la forma, la carica superficiale e la funzionalizzazione.

La chimica superficiale, in particolare, ha un grosso impatto per l'internalizzazione della nanoparticella. Se si considera una classificazione basata sulla sola internalizzazione di nanoparticelle in funzione della loro carica superficiale, si può osservare che quelle neutre e quelle anioniche vengono internalizzate in maniera decisamente meno efficiente rispetto a quanto accade per nanoparticelle cationiche. Inoltre, la funzionalizzazione, influenza anche come a nanoparticella viene internalizzata dalla cellula: quelle anioniche seguono la via mediata da caveole, mentre quelle neutre e cationiche prediligono meccanismi indipendenti da clatrina e da caveolae. Questo è legato all'alta affinità che mostrano le specie cationiche per le cariche negative dei proteoglicani espressi sulla superficie della maggioranza delle cellule. Tuttavia, è importante sottolineare il fatto che molti sistemi cationici hanno mostrato di indurre danno mitocondriale ed apoptosi, con conseguenze negative in merito alla loro biocompatibilità e al possibile uso clinico (Figura 6). Al contrario, è stato riscontrato che una lunga esposizione causa un decremento importante dell'uptake, legato all'effetto tossico del polimero cationico nei confronti della cellula. Le particelle anioniche potrebbero avere meno effetti tossici, tuttavia la loro forte interazione con le proteine (incluse quelle del sistema immunitario) rende difficoltosa la loro possibile applicazione biomedica.

Le dimensioni della nanoparticella influenzano anche la via di assorbimento. Per nanoparticelle di dimensione intorno ai 100 nm, il meccanismo principalmente implicato sembra essere l'endocitosi clatrina-dipendente: un sistema molto selettivo che necessita del riconoscimento tra un ligando (che in questo caso potrebbe essere rappresentato da una molecola che funzionalizza la superficie della NP) e un recettore specifico di membrana. Una volta avvenuto il legame si ha la formazione di invaginazioni rivestite di

clatrina responsabili dell'endocitosi del nanomateriale. L'*uptake* di nanoparticelle con dimensioni inferiori ai 50 nm, avviene attraverso l'endocitosi mediata da caveole. In questo caso l'interazione delle NP con la membrana plasmatica innesca la formazione di piccole invaginazioni a forma di fiasca, chiamate appunto caveolae, perché rivestite dalla caveolina. Oltre alle dimensioni, un altro parametro fondamentale che influenza l'*uptake* delle NP è la carica superficiale determinata dalle caratteristiche del materiale o dalla presenza di eventuali agenti cappanti in superficie. È stato osservato come le nanoparticelle cariche positivamente siano internalizzate prevalentemente via macropinocitosi, mentre l'endocitosi indipendente da clatrina e la caveolina è il meccanismo sfruttato da NP cariche negativamente. Poiché la membrana cellulare presenta carica negativa, le NP cariche positivamente sono internalizzate più facilmente rispetto a quelle negative o neutre. Tuttavia, questo le rende potenzialmente più tossiche, in quanto in grado di provocare danni alla membrana cellulare<sup>14</sup>. Come precedentemente affermato, quando si progettano nanoparticelle per uso in vivo si deve prestare attenzione alla composizione molecolare della superficie esterna per modulare l'interazione con la membrana cellulare. In casi particolari, possono essere prese in considerazione specifiche molecole che si legano ai recettori per l'endocitosi mediata da recettori, oppure, peptidi-permeanti che promuovono il passaggio della membrana cellulare. Il rivestimento superficiale può avere un profondo effetto sull'assorbimento delle nanoparticelle, nonché sulla percezione della tossicità. Ad esempio, il rivestimento di nanoparticelle d'oro con acrilico ha notevolmente migliorato l'assorbimento nelle cellule. Inoltre, studi sui *quantum dot* (Qdot) mostrano che i rivestimenti superficiali delle nanoparticelle con Qdot associato a COOH possono avere un profondo impatto sul loro assorbimento cellulare. In particolare, il rivestimento di Qdot con polietilenglicole (PEG) impedisce il rilascio di ioni tossici, rendendo sicuri Qdot che altrimenti non potrebbero essere usati in ambiente biologico a causa della loro elevata tossicità<sup>15</sup>.

## **I.4 COLTURE CELLULARI**

Le colture cellulari rappresentano un utile strumento in campo biomedico; infatti, costituiscono uno dei principali metodi per studiare il comportamento delle cellule al di fuori dell'organismo vivente, in condizioni artificiali. Gli esperimenti eseguiti su cellule in coltura vengono definiti "in vitro" per distinguerli da quelli "in vivo" che sono eseguiti sull'organismo vivente. Gli utilizzi delle colture cellulari sono vari e questa tecnica è notevolmente sfruttata in diversi ambiti della ricerca scientifica.<sup>16</sup> La storia delle colture cellulari risale ai primi studi effettuati nel XIX secolo e poi perfezionati nel XX secolo quando si allestì la coltura cellulare della cellula HeLa, la prima linea tumorale di origine umana. Sono diversi i fattori che hanno determinato l'evoluzione di questa tecnica, come, l'utilizzo di antibiotici nel terreno di crescita per contrastare eventuali contaminazioni; l'avanzamento e il perfezionamento della tecnologia associata a strumenti e al materiale di consumo; il miglioramento delle tecniche di isolamento e di coltura; l'utilizzo di terreni sintetici a formulazione definita che permettono di mantenere condizioni di coltura costanti.<sup>17</sup> Nell'organismo vivente, infatti, le cellule si mantengono vitali grazie all'apporto di sostanze nutritive, garantito dal sistema vascolare che, tramite la rete capillare, nutre il tessuto a livello cellulare e rimuove i prodotti di scarto, derivati dal metabolismo cellulare. In vitro le funzioni dell'apparato vascolare sono vicariate dal terreno di coltura, un mezzo liquido altamente nutritivo. Esso è costituito da sostanze di base, quali glucosio, amminoacidi, vitamine, sali minerali ed elementi presenti in traccia, necessari per le normali funzioni fisiologiche della cellula, e dal siero animale, che sostiene la crescita e la proliferazione cellulare.

Esistono diversi tipi di colture cellulari: le colture cellulari primarie e le linee cellulari a crescita continua. Le prime sono composte da cellule che derivano da un espianto di tessuto o organo e sono in grado di duplicarsi solo per un numero limitato di passaggi, poi vanno incontro a senescenza; infatti, questo tipo di coltura viene detto "a vita finita". Le linee cellulari a crescita continua, invece, sono composte da cellule in grado di replicarsi per un numero illimitato di passaggi. Una linea cellulare si ottiene da una coltura primaria stabilizzata che ha subito il processo di immortalizzazione, mediante agenti chimici o virali. Altri tipi di colture cellulari sono la linea cellulare clonale, che deriva da una singola cellula (clone) che produce una popolazione omogenea per mitosi, oppure, le colture d'organo o istotipiche, che rappresentano piccole porzioni di organo o di tessuto coltivate in vitro. In questo caso si mantiene inalterato il rapporto tra le diverse

componenti cellulari, ma hanno vita breve poiché i nutrienti contenuti nel terreno e l'ossigeno non riescono a raggiungere in maniera efficace le porzioni più interne dell'organo o del tessuto. In questa categoria vi sono le colture isotipiche ottenute prima isolando le cellule e poi riaggregandole utilizzando scaffold artificiali, in modo da ricreare una struttura simile al tessuto. La co-coltura, rappresenta, invece, un tipo di coltura cellulare in cui in uno stesso sistema sono presenti due tipi cellulari diversi in modo da aumentare la complessità del modello in vitro.

Le cellule possono crescere in adesione o in sospensione. Le cellule adese (epiteliali, fibroblasti, endoteliali) crescono su un supporto. La morfologia di queste cellule può essere fibroblastoide, caratterizzata da lunghi prolungamenti, o epitelioidi, caratterizzata da cellule poligonali. Le cellule che crescono in sospensione sono quelle del sistema immunitario e i loro precursori (linfociti, linfoblasti). La morfologia può essere sferoidale. Utilizzando supporti o *scaffold* particolari è possibile far crescere le cellule ricreando condizioni più vicine possibile al vivo, simulando la struttura e l'architettura tridimensionale dell'ambiente naturale (ad esempio ricreando vasi o capillari).

# CAPITOLO 1

---

## MATERIALI E METODI

### 1.1 CARBURO DI BORO

Nel presente lavoro di tesi sono state utilizzate come vettori di  $^{10}\text{B}$  nanoparticelle ferroborate (FeBNPs), sintetizzate in collaborazione con il Dipartimento di Chimica dell'Università di Pavia. La produzione è volta all'ottenimento di nanomateriali compositi e multifunzionali costituiti da un vettore di  $^{10}\text{B}$  e un agente di contrasto attivo nell'*imaging* di risonanza magnetica (MRI). Nello specifico, le FeBNPs sono formate da nanomateriali di carburo di boro ( $B_4C$ ) e ossidi di Fe ( $Fe_3O_4$ ). Al fine di rendere i nanomateriali stabili in sospensione e compatibili con i sistemi biologici, la loro superficie è funzionalizzata con acido poliacrilico (PAA). Si tratta di un polimero idrosolubile e biocompatibile che permette la stabilizzazione sterica ed elettrostatica dei nanomateriali in sospensione, grazie alla presenza di numerosi gruppi carbossilato carichi negativamente.

Il carburo di boro presenta un elevato punto di fusione (superiore a  $2400\text{ }^\circ\text{C}$ ), una notevole resistenza chimica e un'ampia sezione di cattura neutronica. Tali caratteristiche lo rendono adatto all'utilizzo come assorbitore di neutroni (ad esempio nelle barre di controllo nei reattori), e come materiale abrasivo. Il carburo di boro è un composto estremamente stabile e può essere decomposto tramite l'utilizzo di acidi ossidanti come  $\text{HF}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e  $\text{HNO}_3$ . Può reagire con ossidi metallici (Fe, Ni, Ti, Zr) ad alte temperature a dare monossido di carbonio e boruri metallici.

#### 1.1.1 Sintesi nanoparticelle di carburo di boro

I nanomateriali compositi utilizzati in questo progetto sono stati ottenuti tramite la nucleazione eterogenea di ossidi di ferro super paramagnetici (SPION) sul core di  $B_4C$  NPs.

Questo metodo si basa sull'idea che il carburo di boro funga da centro di nucleazione per le SPION. La presenza degli ossidi di Fe permette non solo di rendere il nanomateriale composito attivo come agente di contrasto nell'MRI, ma anche di stabilizzarlo in fase acquosa. Il carburo di boro è infatti insolubile in acqua, e non presenta gruppi funzionali in grado di legare i gruppi idrofili degli agenti cappanti biocompatibili. Gli ossidi di Fe invece, presentano in superficie gruppi idrossido, che permettono l'interazione con i gruppi carbossilato dell'acido poliacrilico, rendendo stabili le B<sub>4</sub>C NPs in ambiente acquoso e fisiologico.

La sintesi è realizzata a partire dalla dispersione di polveri commerciali di B<sub>4</sub>C (*Iolitec Nanomaterials*) in sospensione acquosa, ottenuta tramite omogeneizzazione con ultraturrax a 6900 rpm, ottenendo una concentrazione di B<sub>4</sub>C pari a 9 mg/ml. Successivamente, un determinato volume della sospensione di B<sub>4</sub>C NPs è diluito in dH<sub>2</sub>O sterile, filtrata tramite l'utilizzo di una siringa monouso e di un filtro *minisart sterile*, 0.2 µm, fino a un volume di 15 ml.

Contestualmente, è preparata una soluzione contenente 0.36 g di FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (purezza 97%, Sigma Aldrich, 236489) e 0.2 g di FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (purezza 99%, Sigma Aldrich, 44939), disciolti in HCl 0.4 M. Viene preparata inoltre una soluzione di polimero sciogliendo 0.93 g di acido poliacrilico PAA (Mw ~ 2000 Da, 50 wt %, Sigma Aldrich) in 4.7 ml di acqua.

La soluzione acida di sali di Fe è aggiunta alla sospensione di nanomateriali di B<sub>4</sub>C. Successivamente, sono aggiunti 2 ml di NH<sub>4</sub>OH (28%-30%, Sigma Aldrich, 338818) mantenendo il tutto sotto agitazione a 630 rpm in bagno termostato a 30 °C. La precipitazione è immediata ed è descritta dalla seguente reazione:



Infine, segue l'aggiunta della soluzione di PAA, e la sospensione è mantenuta sotto agitazione per 1 ora. Al termine della sintesi, è necessario frazionare e lavare la sospensione per eliminare agglomerati di nanoparticelle instabili e reagenti in eccesso. La sospensione è quindi centrifugata a 31366 rpm per 1 ora a 20 °C, è eliminato il surnatante ed il pellet è ri-disperso in dH<sub>2</sub>O sterile. La sospensione ottenuta dal pellet è successivamente centrifugata a 1000 rpm al fine di ottenere la precipitazione di agglomerati di nanoparticelle. Il surnatante costituisce la frazione di interesse (1000-31366 rpm), e il pellet è scartato. Sono state sintetizzate FeBNP contenenti due diverse

quantità di carburo di boro, al fine di ottenere una sospensione stabile e ricca di  $^{10}\text{B}$ : le “FeBNP 1X” e “FeBNP 3X” ottenute a partire rispettivamente da 6 e 18 mg di B4C NPs.

I nanomateriali prodotti sono stati funzionalizzati con un fluoroforo al fine di valutarne l'interazione con i sistemi biologici. Nel nostro caso la funzionalizzazione delle FeBNPs è stata realizzata utilizzando il fluoroforo DiI (DiIC18(3)), seguendo un metodo diffusivo originariamente proposto da *Santra et al.*<sup>18</sup> che permette l'intercalazione del fluoroforo nei domini idrofobici dell'acido poliacrilico. La funzionalizzazione è stata realizzata tramite la lenta aggiunta di 500  $\mu\text{l}$  di una soluzione di DiI 1.2 mg/ml in DMSO a 10 ml di NPs sotto agitazione costante (1000 rpm). La sospensione è mantenuta sotto agitazione per 1 ora, al cui termine il campione è centrifugato a 31366 rpm e il pellet ottenuto è risospeso in  $d\text{H}_2\text{O}$  sterile.

### 1.1.2 Quantificazione del carburo di boro tramite ICP

La procedura di digestione dei nanomateriali prevede che 330  $\mu\text{l}$  di sospensione di nanoparticelle siano aggiunti a 6 ml di una miscela di acidi ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$  1:1). La sospensione è successivamente posta nel reattore a microonde MARS (Microwave Accelerated Reaction System), e scaldata a 220 °C per 15 minuti a una pressione di 80 bar. Al termine della digestione si attende che i vessel tornino a temperatura ambiente. Successivamente, sono aggiunti 0.5 ml di una soluzione di mannitolo ( $15.8 \cdot 10^5$  mg/l), si agitano i vessel e si aspetta per 10 minuti. Questo permette la complessazione del B nel campione digerito tramite il mannitolo, evitando l'allontanamento di composti volatili del boro durante la fase di evaporazione degli acidi. Successivamente, infatti, si trasferisce il contenuto dei vessel in becher scaldati a 100 °C per 1 ora. Questo permette di allontanare gli acidi senza dover diluire eccessivamente il campione. Al termine del riscaldamento, il campione è trasferito in falcon da 15 ml e diluito fino a un volume finale di 10 ml. I volumi utilizzati per la digestione delle nanoparticelle sono gli stessi utilizzati per gli esperimenti standard con le cellule; dunque, 330  $\mu\text{l}$  di sospensione di nanoparticelle sono portate a un volume pari a quello della sospensione cellulare.

## 1.2 COLTURE CELLULARI

In questo lavoro di tesi sono state utilizzate, come modello sperimentale in vitro, le cellule Jurkat, una linea cellulare di linfociti T immortalizzati originariamente ottenuta dal sangue periferico di un donatore affetto da leucemia a cellule T. Sono state impiegate inoltre anche cellule HeLa, cellule epiteliali umane derivate da tumore della cervice uterina. (Figura 7).

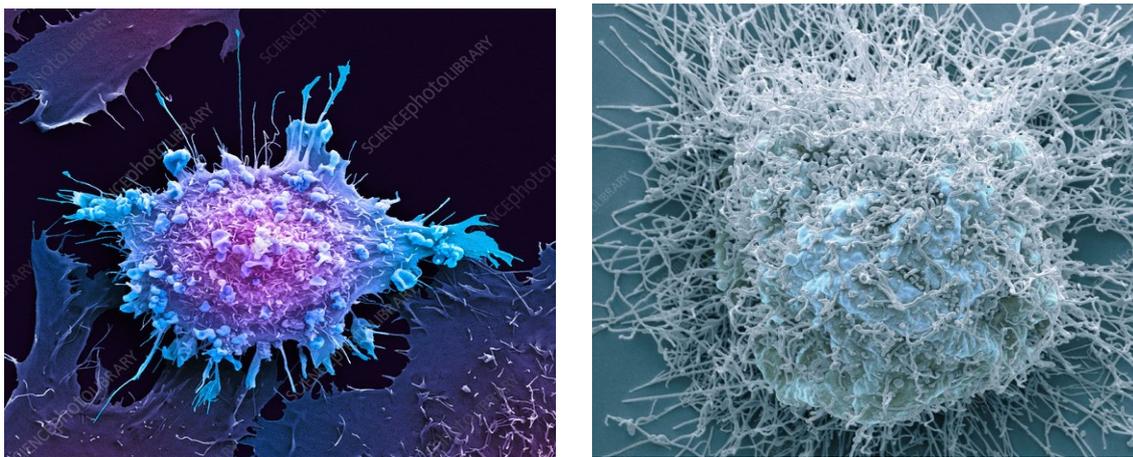


Figura 7: A destra Linea HeLa visualizzata al SEM, a sinistra Linea Jurkat visualizzata al SEM<sup>19-20</sup>

Entrambe le linee cellulari sono state coltivate in fiasche da 25 cm<sup>2</sup> (T25). Il mezzo di coltura utilizzato per le Jurkat è composto da: terreno *RPMI.1640* (Lonza, BioWhittaker) addizionato con 10 % *FBS* (siero bovino fetale, Gibco Invitrogen), *L-glutamina* 2 mM e *Penicillina/Streptomicina* 1 mM (Gibco Invitrogen). Invece, il mezzo di coltura per le HeLa è composto da: terreno *D-MEM* (Lonza, BioWhittaker) addizionato con 10 % *FBS* (siero bovino fetale, Gibco Invitrogen) e *L-glutamina* 2 mM (Gibco Invitrogen).

Le linee cellulari sono state mantenute a 37 °C con il 5 % di CO<sub>2</sub>.

### 1.2.1 Trattamento delle cellule con le nanoparticelle

Per gli studi di interazione nanoparticelle-cellule, a seconda dei casi, le cellule sono state mantenute in fiasche T25, oppure, in piastre Petri da 35 mm e/o in piastre da 96 pozzetti.

Le nanoparticelle sono aggiunte alle cellule in terreno completo alle concentrazioni e per i tempi indicati, caso per caso, nella sezione Risultati. A seconda delle tecniche utilizzate, vengono usate FeBNP fluorescenti o non fluorescenti. Al termine di ogni incubazione viene eliminato il mezzo di coltura contenente le nanoparticelle libere.

Nel caso delle cellule Jurkat, con crescita in sospensione, la sospensione cellulare è centrifugata a *160 g* per *5 minuti* e il surnatante eliminato. Il pellet di cellule è quindi risospeso in PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e nuovamente centrifugato per eliminare tracce residue di nanoparticelle non adese. Questo passaggio è ripetuto due volte.

Nel caso delle cellule HeLa, con crescita in adesione, al termine dell'incubazione si elimina il mezzo di coltura contenente le nanoparticelle e il monostrato è lavato *2 volte* con *PBS*.

Le cellule così trattate sono pronte per essere processate per i diversi test/analisi, come descritto nei paragrafi specifici di questa sezione.

### **1.3 TEST MTT**

Il test MTT è un saggio colorimetrico utilizzato per valutare se una specifica molecola o composto ha effetti sulla vitalità cellulare. Questo test si basa sul principio, tale per cui, il sale di tetrazolio MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio), di colore giallo, viene trasformato dalle cellule metabolicamente attive a formare formazano. In particolare, l'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, attivo solo nelle cellule metabolicamente vitali, taglia l'anello di tetrazolio dell'MTT trasformandolo da sostanza di colore giallo in sostanza di colore blu, il formazano (Figura 8). Il formazano, che si accumula all'interno della cellula sotto forma di precipitato insolubile, deve essere solubilizzato per essere successivamente quantificato. I metodi utilizzati a questo scopo sono differenti ed includono l'uso di DMSO, isopropanolo acidificato, DMF, SDS e/o combinazioni di detergenti e solventi organici.

La spettroscopia ultravioletta/visibile o spettroscopia UV-Vis è una tecnica spettroscopica di assorbimento molecolare comunemente utilizzata in chimica analitica. Nei nostri esperimenti abbiamo impiegato il *Plate Reader Clariostar*, uno strumento che permette di combinare un'ampia gamma di tecniche di rivelazione, tra cui: fluorescenza, luminescenza e assorbanza.

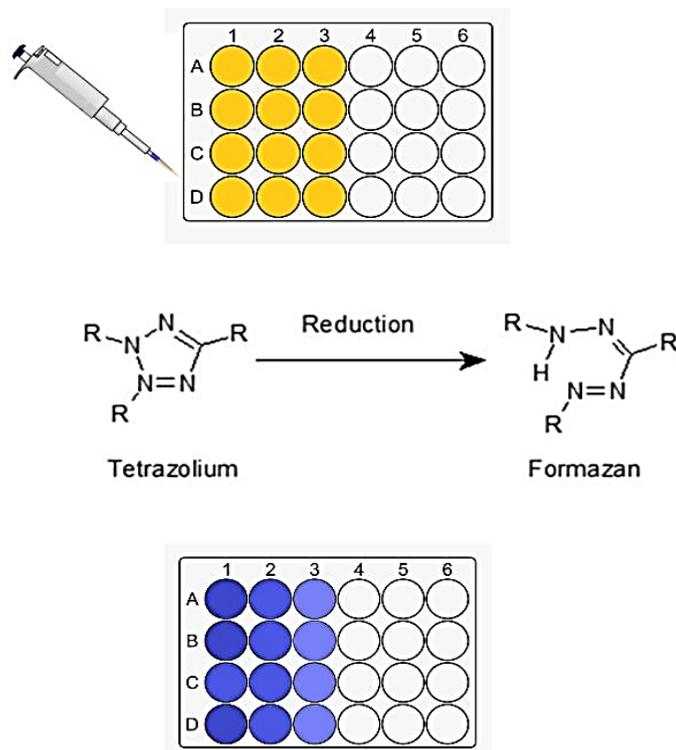


Figura 8: Piastre multi-well 96 pozzetti in cui avviene la reazione di riduzione dell'MTT in sale formazano<sup>21</sup>.

### 1.3.1 Protocollo assorbanza MTT al Plate Reader

Si utilizza una piastra multiwell 96 pozzetti. Le cellule vengono seminate per avere in ogni pozzetto  $1 \cdot 10^5$  cellule in  $100 \mu\text{l}$ . Le cellule Jurkat vengono trasferite nei pozzetti alla diluizione indicata, mentre le cellule HeLa vengono seminate, nei pozzetti il giorno prima del trattamento/test alla concentrazione di  $5 \cdot 10^4$  cellule per  $\text{ml}$ . Si ripete ogni condizione tre volte in modo da avere tre letture diverse dello stesso campione. Le condizioni di controllo sono cellule senza nanoparticelle. Il solo DMSO è usato come bianco. Si sono inoltre considerate altre condizioni di controllo, quali (1) campioni con cellule senza MTT; (2) campioni solo con terreno; (3) campioni solo con DMSO.

A seconda delle condizioni si incubano le cellule con le nanoparticelle FeBNPs, come precedentemente descritto (paragrafo 1.2).

La soluzione di MTT viene preparata lontano dalla luce diretta facendo sciogliere  $5 \text{ mg}$  di sale in  $1 \text{ ml}$  di PBS per ottenere una concentrazione di  $5 \text{ mg/ml}$ . La soluzione ottenuta viene prelevata con una siringa e sterilizzata filtrandola con un filtro  $0,2 \text{ mm}$ .

Ad ogni campione/pozzetto viene aggiunto MTT in un rapporto di 1:10 e si pone la piastra in incubatore per 1.30 ore. Al termine si aggiungono 150  $\mu$ l di DMSO in ciascun pozzetto e si colloca la piastra in agitazione a 170 rpm per 30 minuti a temperatura ambiente.

La piastra è letta al Plate Reader impostando i seguenti parametri (Figura 9):

Measurement type	Absorbance
Settling time [s]:	0,5
Reading direction:	unidirectional, vertical left to right, top to bottom
Target temperature [°C]:	25
Target concentration O2 [%]:	set off
Target concentration CO2 [%]:	set off
Excitation	570 nm

Figura 9: Parametri impostati al Plate Reader Clariostar per eseguire un Test MTT per la vitalità cellulare

Ogni campione è analizzato in triplo e dalle misurazioni è stato poi ricavato il valore medio. La vitalità cellulare è stata calcolata come rapporto espresso in percentuale tra il segnale dei campioni trattati e i controlli, entrambi sottratti del bianco

### 1.3.2 Protocollo fluorescenza al Plate Reader

Mediante l'utilizzo dello spettrofotometro *Plate Reader Claiostar* è possibile effettuare anche la rilevazione in fluorescenza che prevede l'eccitazione di una specie all'interno del campione. L'emissione di fluorescenza durante la diseccitazione del fluoroforo è successivamente rilevata grazie ad un sistema di emissione che separa la fluorescenza dalla luce di eccitazione tramite un monocromatore, che misura il segnale usando come rilevatore un tubo fotomoltiplicatore. Rispetto alle misure in assorbanza le misure in fluorescenza hanno maggiore sensibilità e offrono una gamma di applicazioni vasta. Il grande vantaggio di questa tecnica, rispetto alla spettrofotometria tradizionale, consiste nella possibilità di realizzare numerosi test contemporaneamente grazie alle micropiastre dotate di un elevato numero di pozzetti.

Si utilizza una piastra *multiwell 12* pozzetti. Si prepara la sospensione cellulare di partenza tale per cui si ottiene in ogni pozzetto, corrispondente a una condizione,  $2 \cdot 10^6$  cellule in 2 ml. Si ripete ogni condizione due volte. Per ogni condizione il campione di controllo è costituito da cellule in assenza di nanoparticelle, mentre il bianco è costituito dal PBS.

A seconda delle condizioni di esperimento predisposte si incubano le cellule con le nanoparticelle FeBNPs, come precedentemente descritto (paragrafo 1.4).

Successivamente, sono poste in ogni pozzetto  $1 \cdot 10^6$  cellule in 1 ml di PBS. La piastra è dunque lasciata riposare in incubatore a 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>. Al termine, segue la lettura tramite *Plate Reader*.

*La piastra è letta al Plate Reader impostando i seguenti parametri (Figura 10):*

Measurement type:	Fluorescence (FI)
Scan mode:	orbital averaging
Scan diameter [mm]:	7 e/o 14
Settling time [s]:	0,5
Reading direction:	unidirectional, vertical left to right, top to bottom
Target temperature [°C]:	25
Target concentration O2 [%]:	set off
Target concentration CO2 [%]:	set off
Excitation	535-20
Dichroic filter	550
Gain	1000 e/o 2000

*Figura 10: Parametri impostati al Plate Reader Clariostar per verificare la fluorescenza data dalle nanoparticelle incubate con cellule.*

## 1.4 CAMERA DI BÜRKER

La camera di Bürker è uno strumento che permette di contare le cellule di una soluzione. Presenta una camera dallo spessore di  $10\text{ mm}$ , dove si introduce la sospensione cellulare. La superficie della camera è suddivisa in  $9$  quadrati di  $1\text{ mm}$  di lato. Ciascuno dei nove quadrati comprende:  $16$  quadrati grandi della superficie di  $1/25$  di  $\text{mm}^2$ ; ogni quadrato è suddiviso in  $9$  quadrati piccoli della superficie di  $1/400$  di  $\text{mm}^2$  e  $24$  rettangoli della superficie di  $1/100$  di  $\text{mm}^2$  (Figura 11).

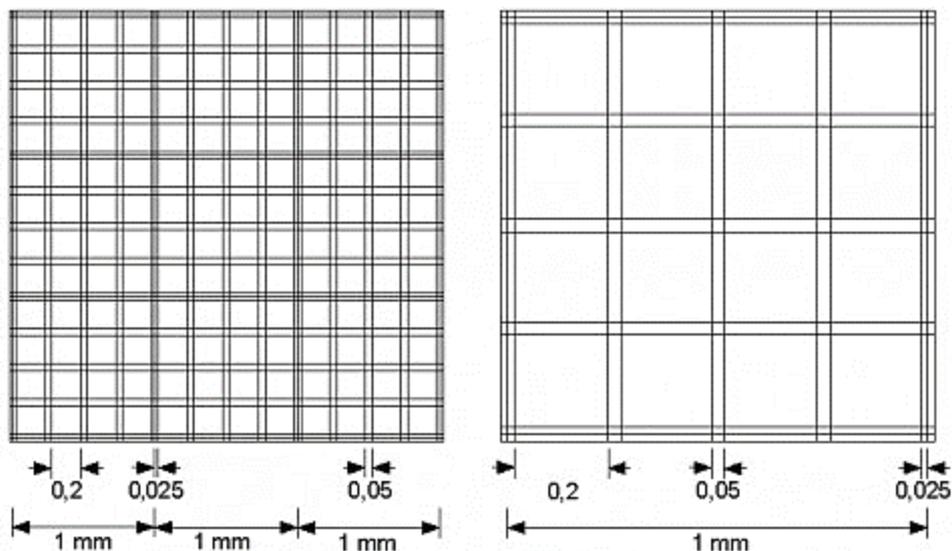


Figura 11: Camera di Bürker<sup>22</sup>

Per la conta vengono prelevati  $20\ \mu\text{l}$  di sospensione cellulare dopo aver ben risospeso le cellule e aggiunto  $20\ \mu\text{l}$  del *Trypan blue*, un colorante in grado di colorare selettivamente le cellule morte. Questo è possibile poiché le cellule vitali, avendo la membrana intatta, non permettono la penetrazione del *Trypan blue* nel citoplasma; al contrario, nelle cellule morte questo penetra facilmente, rendendole blu. Per procedere alla conta vengono caricati  $7,5\ \mu\text{l}$  nella camera di Bürker (Figura 12).

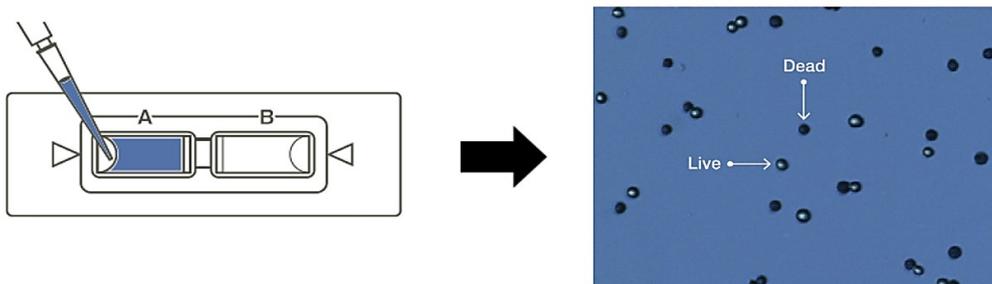


Figura 12: Inserimento della soluzione cellulare con *Trypan Blue* nella camera di Bürker e successiva conta cellulare. In blu sono evidenziate le cellule morte<sup>23</sup>.

Dopo aver contato le cellule nei diversi campi, si ottiene il valore medio che si moltiplica per il fattore di diluizione (2 nel nostro caso), e per 10, per avere il numero di cellule in 1  $\mu$ l; infine, per 1000 per avere il numero di cellule espresso per 1 ml.

### 1.5 SEM - microscopio elettronico a scansione -

Il microscopio elettronico a scansione è utilizzato per la caratterizzazione di superfici. Quando un fascio di elettroni primario incide sul campione sono generati diversi segnali, tra cui elettroni backscattered (BSE), secondari (SE) e fotoni X utilizzati per l'analisi morfologica, topografica ed elementare (microanalisi EDS) della superficie del campione in esame. Il SEM è costituito da un cannone elettronico, una colonna ottica in cui si trovano due lenti condensanti, una lente obiettivo e le bobine di scansione, il portacampioni e un rivelatore (*detector*). Alcuni strumenti utilizzano un *detector* di Everhart-Thornley per raccogliere sia i BSE che i SE, altri utilizzano due *detector* separati. Inoltre, alcuni strumenti sono dotati di un *detector* di raccolta di SE posto anche sulla lente obiettivo, in modo da raccogliere gli *in-beam* SE. Al fine di indirizzare gli elettroni sul campione e permettere la scansione del fascio, è necessario che lo strumento lavori in alto vuoto, generalmente ottenuto grazie a una pompa a diffusione<sup>6</sup> (Figura 13).

Gli elettroni primari sono generati da cannoni elettronici che possono lavorare per effetto termoionico oppure per emissione di campo. Il potenziale di accelerazione raggiunge i 30 kV. Le lenti elettromagnetiche hanno tre scopi principali: ridurre la dimensione del pennello elettronico, produrre un movimento di scansione sulla superficie del campione e correggere le aberrazioni sferica, cromatica e di astigmatismo. Queste aberrazioni possono creare dischi di confusione e sfocatura dell'immagine, e derivano dalle diverse distanze focali e velocità degli elettroni più lontani dall'asse ottico, oltre che dall'asimmetria delle lenti. L'interazione tra il fascio primario e il campione produce diversi segnali.

Nel nostro caso, le cellule sono state visualizzate raccogliendo elettroni *backscattered* (BSE), ovvero elettroni del fascio primario che urtano elasticamente gli atomi del campione, ed elettroni secondari (SE) emessi dagli atomi del campione a seguito di una collisione anelastica e assorbimento dell'energia dell'elettrone incidente. I BSE hanno energie più elevate dei SE ed è possibile lavorare a voltaggio di accelerazione maggiori e ottenere informazioni provenienti da strati più profondi rispetto quanto risulta possibile

con l'utilizzo di SE. È dunque sconsigliato utilizzare potenziali di accelerazione elevati durante la raccolta di SE per avere una buona risoluzione. Le informazioni ottenibili con i SE sono dunque topografiche e morfologiche. Le informazioni ottenibili con i BSE sono invece informazioni di contrasto, la cui natura è prevalentemente composizionale. Per consentire l'analisi SEM il campione deve avere una buona conducibilità elettronica e deve essere collegato a terra. È possibile analizzare campioni isolanti rivestendoli di un sottile strato di materiale conduttore tramite sputtering o evaporazione in vuoto. Nel nostro caso i campioni sono isolanti ed è stata depositata grafite tramite evaporazione in vuoto tra due elettrodi di grafite riscaldati dal passaggio di corrente ad alto amperaggio. Il vantaggio dell'utilizzo della grafite come materiale di ricopertura (piuttosto che altri materiali comuni come l'oro) è il basso peso atomico del C che non interferisce con l'analisi EDX.

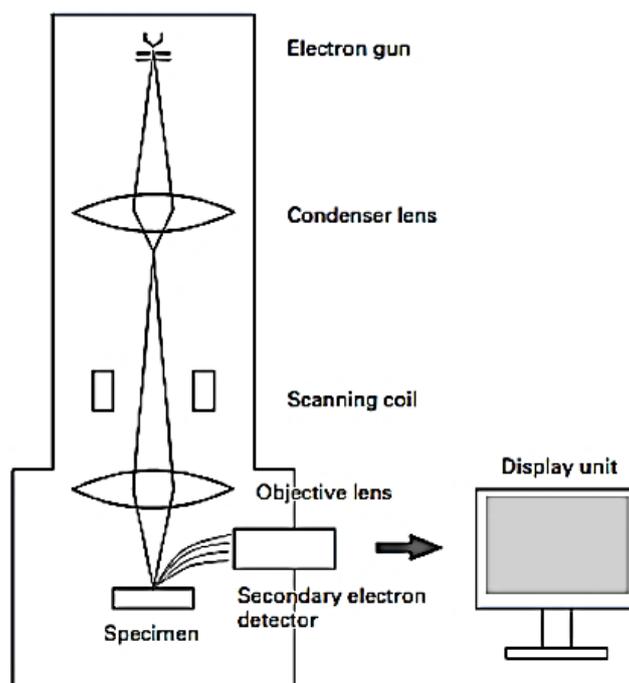


Figura 13: dal cannone elettronico gli elettroni sono convogliati e accelerati lungo la colonna

### 1.5.1 Protocollo visualizzazione cellule SEM

Le cellule vengono seminate in petri da 35 mm e quindi trattate con le nanoparticelle (nel caso delle cellule HeLa) o fatte aderire alle petri successivamente all'incubazione (nel caso delle cellule Jurkat). Per l'incubazione con le nanoparticelle si usa una concentrazione di  $5 \cdot 10^5$  cellule su 1 ml in un volume totale di 2 ml per condizione.

L'incubazione delle cellule Jurkat con le nanoparticelle FeBNPs avviene in provette da *15 ml* a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in  $5\% \text{ CO}_2$ . Nel caso delle cellule HeLa, le cellule seminate il giorno prima dell'incubazione con una diluizione *1:20* (a partire da una concentrazione di  $5 \cdot 10^5$  cellule su *1 ml*), e le NP sono aggiunte alle cellule aderite alla petri..

Per poter osservare le cellule Jurkat al SEM, devono essere fatte aderire sul fondo di una petri. Per fare ciò, alla fine del trattamento, il pellet viene risospeso in *2 ml* di *PBS* e la sospensione cellulare depositata in petri da *35 mm* viene mantenuta in incubatore a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in  $5\% \text{ CO}_2$  per *1.30 ore*.

Al termine dell'incubazione con le NP, le cellule sono fissate con *glutaraldeide* al  $2,5\%$  preparata a partire da una soluzione al  $25\%$  e diluita con *Sodio Cacodilato*  $0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH } 7.3$ . Una volta rimosso il *PBS*, le cellule vengono fissate con *1 ml* di *glutaraldeide*  $2,5\%$  per *2.30 ore* a temperatura ambiente. Tutta la procedura viene eseguita in cappa chimica. Al termine dell'incubazione si effettua il lavaggio delle cellule con *1 ml* di *Sodio Cacodilato*  $0,5 \text{ M}$  a  $\text{pH } 7.3$  seguito da due lavaggi con *EtOH* al  $70\%$  e *EtOH* al  $100\%$ . Prima della caratterizzazione in microscopia a scansione elettronica, i campioni sono lasciati a temperatura ambiente *overnight*, per farli asciugare completamente.

## **1.6 CONFOCALE - microscopio ottico -**

L'uso di fluorocromi in analisi biologiche permette di identificare cellule e componenti sub-cellulari distinguendoli facilmente dal resto degli elementi non fluorescenti. La fluorescenza è un fenomeno fisico che consiste nell'emissione di luce da parte di una sostanza fluorescente sottoposta ad irraggiamento poiché gli elettroni atomici assorbono l'energia della radiazione che li colpisce e saltano ad un livello energetico superiore. Dopo un brevissimo intervallo di tempo, dell'ordine dei  $10^{-8}$  s, tali elettroni tornano al livello energetico iniziale, restituendo buona parte dell'energia precedentemente assorbita sotto forma di fotoni. La lunghezza d'onda di tali fotoni corrisponde a luce visibile<sup>24</sup>.

Il confocale è un microscopio ottico utilizzato per lo studio tridimensionale di strutture biologiche. Questo strumento, per eccitare le molecole, impiega una sorgente luminosa molto intensa, il laser. La luce emessa dai fluorocromi eccitati dal laser viene catturata dalle lenti dell'obiettivo, attraversa lo specchio diroico e raggiunge il fotomoltiplicatore, che trasforma l'intensità luminosa in un segnale elettrico di intensità proporzionale. Tra lo specchio diroico ed il fotomoltiplicatore, il fascio luminoso attraversa un diaframma

(o pinhole), che impedisce alla luce proveniente dalle zone fuori fuoco di raggiungere il fotomoltiplicatore. In questo modo, solo il segnale luminoso relativo al piano di fuoco viene registrato e utilizzato nella formazione dell'immagine finale. In particolare, sono effettuate le scansioni per ogni piano e la loro sovrapposizione dei vari piani, eseguita via software, consente di ricostruire un'immagine complessiva dell'intero volume (Figura 14).

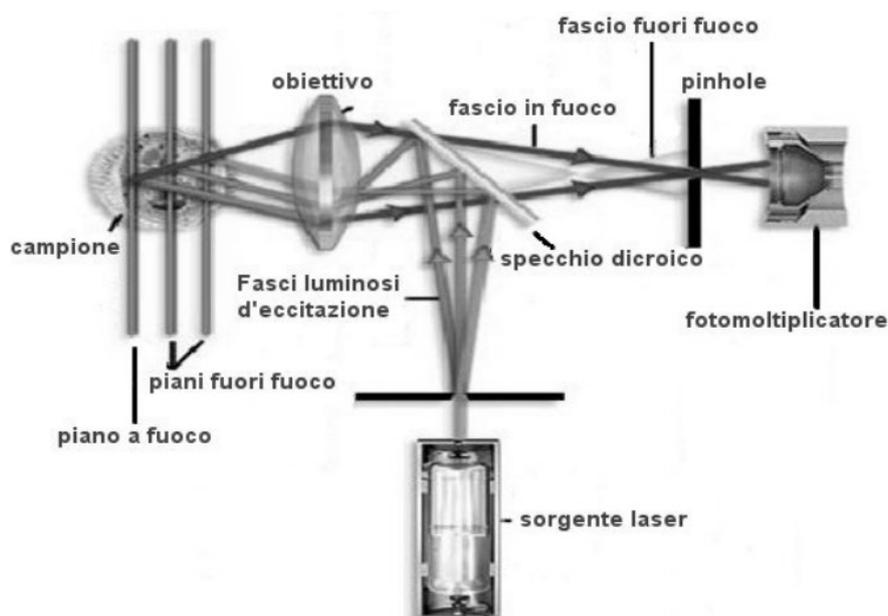


Figura 14: Microscopio confocale a scansione laser. La luce emessa o riflessa dal campione viene foccheggiata dall'obiettivo del microscopio e raccolta da un sistema di due fotomoltiplicatori<sup>25</sup>

Per il nostro progetto abbiamo marcato le FeBNPs ed il nucleo delle cellule in esame. Per quest'ultimo abbiamo utilizzato l'*Hoechst 33342*, un bis-benzimide, utilizzato come colorante fluorescente per il DNA. Il composto organico presenta lunghezza d'onda di eccitazione massima a  $346\text{ nm}$  e lunghezza d'onda di emissione massima a  $460\text{ nm}$ ; dopo il legame con il DNA a doppio filamento, la lunghezza d'onda di eccitazione massima è  $350\text{ nm}$ , la lunghezza d'onda di emissione massima è  $461\text{ nm}$  (Figura 15).

Per le nanoparticelle abbiamo utilizzato il Dil (DiIC18(3)), un fluoroforo lipofilo appartenente alla classe delle indo-carbocianine, solitamente prodotto come sale perclorato (per i dettagli si veda il Capitolo 2, sottoparagrafo 2.2.4). Presenta lunghezza d'onda di assorbimento massimo a  $549\text{ nm}$  e lunghezza d'onda di emissione massima a  $565\text{ nm}$ .

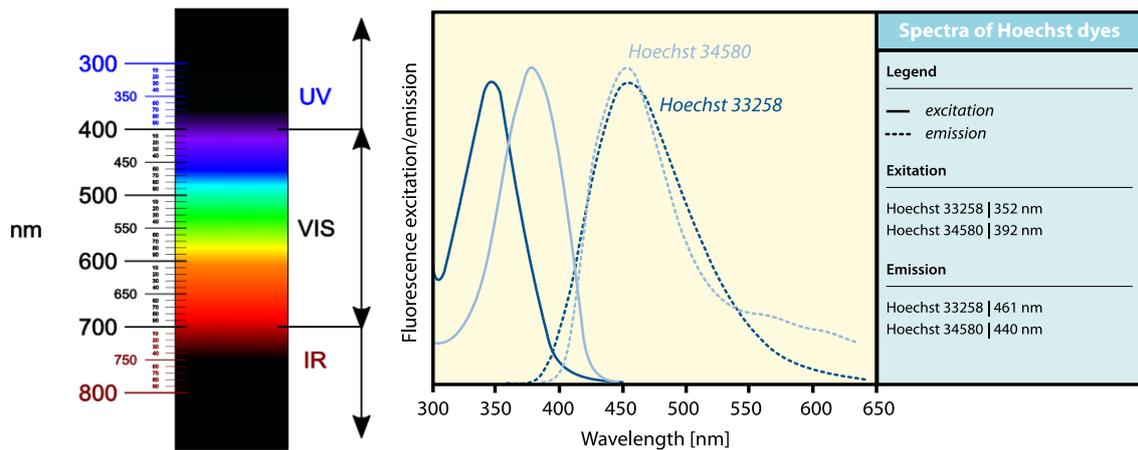


Figura 15: A destra lo spettro del visibile. A sinistra gli spettri di eccitazione-emissione di coloranti Hoechst<sup>26</sup>

### 1.6.1 Protocollo visualizzazione cellule Confocale

Per l'osservazione delle cellule al confocale, le cellule vengono fatte crescere in particolari petri da 35 mm con fondo in vetro, oppure, su vetrini alloggiati nelle petri da 35 mm. A seconda delle condizioni di esperimento predisposte si incubano le cellule con le nanoparticelle FeBNPs, come precedentemente descritto (paragrafo 1.2).

Per poter osservare le cellule Jurkat al confocale, devono essere fatte aderire sul fondo di una petri. Per fare ciò, alla fine del trattamento, il pellet viene risospeso in 2 ml di PBS e la sospensione cellulare depositata in petri da 35 mm viene mantenuta in incubatore a 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> per 1.30 ore.

Al termine dell'incubazione con le nanoparticelle fluorescenti, le cellule adese in petri con il fondo in plastica vengono fissate con 1 ml di formaldeide al 4 % per 15 minuti a temperatura ambiente, preparata partendo dalla formaldeide al 16 % e diluita con PBS. Al termine della fissazione si effettuano due lavaggi con PBS, per poi incubare il tutto con 1 ml di HOECHST 1:2000 in PBS per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo due successivi lavaggi in PBS, le cellule vengono lasciate in PBS a 4°C fino al momento dell'analisi.

**Le analisi sono state eseguite presso il laboratorio del Centro Grandi Strumenti dell'Università di Pavia** ed è stato utilizzato il microscopio confocale *Leica TCS SP8* dotato di obiettivo ad immersione ad olio *HC PL APO CS2 40x/1.30* (*Leica Microsystems*). Le immagini sono state poi processate usando i software *ImageJ* (*National Institutes of Health*).

## 1.7 CITOFUORIMETRIA

Il citofluorimetro è uno strumento che permette un'analisi veloce ed automatica di popolazioni cellulari in sospensione, misurandone le caratteristiche fisiche e/o biochimiche (volume, granulosità, fluorescenza). Consente di quantificare e memorizzare contemporaneamente più parametri per ogni cellula che compone la popolazione. Il citofluorimetro è costituito da quattro elementi: un sistema fluidico per il trasporto del campione nella cella di analisi; un sistema di eccitazione che può essere costituito da una o più sorgenti luminose; un sistema ottico elettronico che raccoglie ed elabora i segnali; un computer che, tramite specifici programmi, permette il controllo dello strumento ed infine, l'analisi dei dati da parte di un operatore mediante una rappresentazione grafica.

Nel momento in cui le cellule passano attraverso il laser si generano un segnale di diffrazione ed un segnale di rifrazione/riflessione. Il segnale di diffrazione è captato dal sensore che raccoglie luce nel canale dello *scatter* frontale (detto anche *forward scatter*) e che fornisce informazioni sul volume cellulare. Il segnale di rifrazione/riflessione è captato dal sensore che raccoglie la luce dello *scatter* laterale (detto anche *side scatter*, a 90°) e fornisce informazioni in merito alle granulosità all'interno delle cellule. Per entrambi i segnali l'intensità dello *scatter* è proporzionale a dimensione e forma delle cellule analizzate. Quando la luce incidente colpisce la cellula, tutto ciò che è presente all'interno del citoplasma determina la rifrazione o riflessione della luce; pertanto, la fluorescenza è direttamente proporzionale alla complessità del citoplasma (Figura 16).

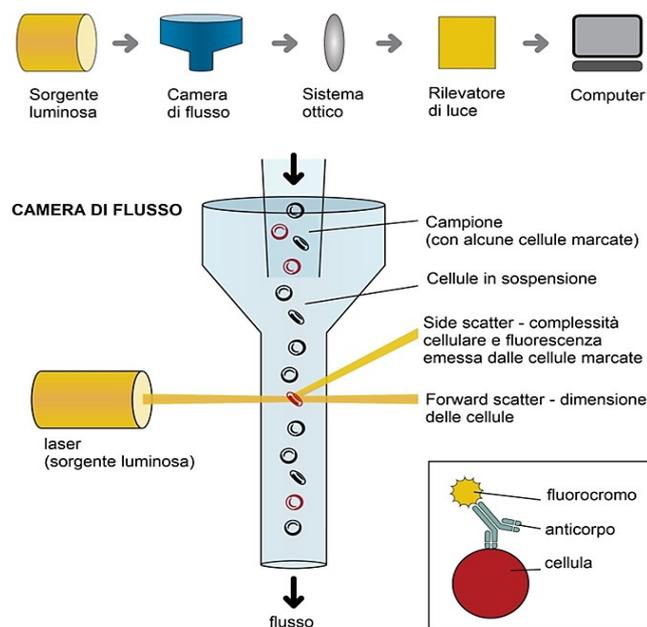


Figura 16: Componenti base del citofluorimetro<sup>27</sup>

### **1.7.1 Protocollo preparazione cellule da visualizzare al citofluorimetro**

Al termine del trattamento con le nanoparticelle, le cellule sono trasferite in provette da *15 ml* e centrifugate a *120 g* per *5 minuti*. Il pellet ottenuto è lavato in PBS e, dopo ulteriore centrifugazione, le cellule sono fissate in formalina *10 %* (ottenuta diluendo *1:4* una soluzione di *formaldeide 16 %* (methanol-free, Euroclone #12606, in PBS) a temperatura ambiente per *15 minuti*. Al termine della fissazione le cellule sono centrifugate a *140 g* per *5 minuti* e risospese in PBS. La procedura è stata ripetuta per due volte. Dopo centrifugazione a *1000 g* le cellule sono permeabilizzate risospingendole in *saponina 0.2 %* (Sigma Aldrich #S7900) in PBS (PBS/saponina) per *10 minuti*. Al termine dell'ultima centrifugazione, il pellet è risospeso in *1 ml* di PBS e conservato a *4 °C* fino al momento della lettura. **Le analisi di citofluorimetria sono state eseguite presso il laboratorio del Centro Grandi Strumenti dell'Università di Pavia. È stato utilizzato lo strumento BD FACSLyric flow cytometer dotato di laser a 488 nm.**

Per l'acquisizione sono utilizzati i seguenti canali:

- FSC: per avere informazioni sulle dimensioni delle cellule;
- SSC: per avere informazioni sulla complessità delle cellule;
- BL2 (*590/40 nm*): per rivelare i campioni contenenti FCNP.

Per ogni campione sono acquisiti almeno *50.000 eventi*. Tutti gli esperimenti sono condotti in triplo e i grafici riportati nella sezione Risultati sono l'esito di un esperimento rappresentativo.

### **1.8 TEM – microscopio elettronico a trasmissione –**

La microscopia a trasmissione elettronica (TEM) permette di ottenere informazioni riguardanti la topografia, la morfologia, la composizione e la cristallografia del campione.

Il microscopio è strutturalmente simile al SEM; un cannone elettronico posto in cima alla colonna emette elettroni ad alta tensione che sono focalizzati sul campione. Tuttavia, il SEM raccoglie segnali di superficie (BSE, ES, fotoni X), mentre il TEM raccoglie gli elettroni trasmessi. Dunque, il TEM raccoglie gli elettroni incidenti che interagiscono con uno spazio definito “volume di interazione” con il campione. Il volume di interazione dipende da tre fattori: numero atomico del materiale, tensione di accelerazione e angolo

di incidenza del fascio. Per focalizzare gli elettroni in un pennello fine che incide sul campione, il TEM impiega un sistema di lenti elettromagnetiche. Nello specifico, lungo la colonna, si trovano due lenti a condensazione, due lenti obiettivo e due lenti a proiezione. Ciascuna di queste è correlata a un'apertura che ha il compito di collimare i raggi elettronici, sia quello incidente che quello trasmesso. Il raggio trasmesso, dopo aver attraversato il campione, è quindi collimato su uno schermo fluorescente, solitamente costituito da solfuro di zinco (Figura 17).

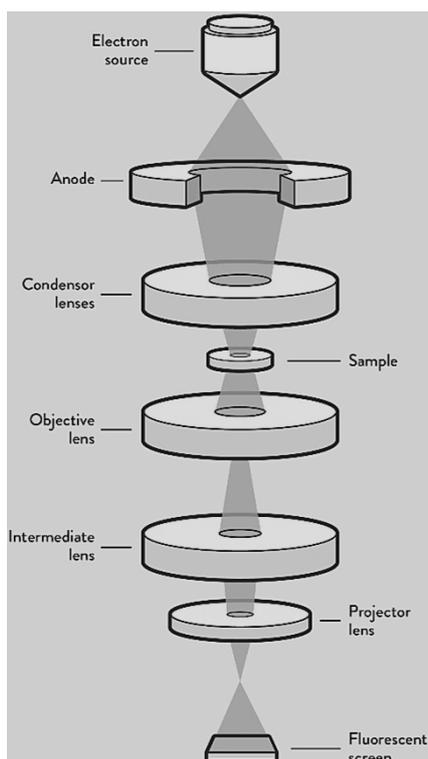


Figura 17: Schema semplificato di un microscopio elettronico a trasmissione.

### 1.8.1 Protocollo visualizzazione cellule

Al termine dell'incubazione delle cellule con le nanoparticelle ed i lavaggi in PBS, si effettua un ulteriore lavaggio in tampone *Sodio Cacodilato 0,1 M; 7.4 pH*. Le cellule vengono poi fissate in *750 µl* di *glutaraldeide* al 2 % in tampone *Sodio Cacodilato 0,1 M 7.4 pH* per *30 minuti* a temperatura ambiente in agitazione.

Al termine della fissazione le cellule Jurkat vengono pellettate e lavate due volte in *Sodio Cacodilato 0,1 M; 7.4 pH* prima di essere trasferite in un'epENDORF. Questa viene centrifugata per *1/2 minuti* a *13000 rpm* a temperatura ambiente. Senza risospendere il pellet si cambia il fissativo aggiungendone del nuovo.

Il tutto si conserva a 4 °C *overnight* e il giorno dopo si sostituisce la glutaraldeide con 500 µl di Sodio Cacodilato 0,1 M; 7.4 pH, dove viene lasciato fino al momento della post fissazione. È importante ricordare che le soluzioni tampone e fissativo devono essere preparate fresche, al massimo il giorno prima della fissazione.

Per la post-fissazione il campione è posto per 1 ora in soluzione acquosa di *tetrossido di osmio al 2 %*. Dopo diversi lavaggi in *acqua bidistillata*, i pellet sono posti in soluzione di *acetato di uranile all'1 %* per 1 ora a temperatura ambiente. I campioni sono così disidratati aumentando la percentuale di etanolo (70 %, 80 %, 90 %, 100 % e acetone per 10 minuti ciascuno) e, infine, incorporati nella *resina Epon*. Dopo l'indurimento a 60 °C per 48 ore, sono state ottenute sezioni sottili dei campioni incorporati utilizzando un ultramicrotomo *UltraCut E (Reichert)* e posizionato su griglie di rame da 300 maglie.

Le sezioni sono poi osservate utilizzando il *Talos L120C G2*, un microscopio elettronico a trasmissione (*Thermo Fisher Scientific*) ad una tensione di accelerazione di 120 kV, dotato di una sorgente termoionica in esaboruro di lantanio e una camera CMOS Ceta Thermofischer 4kx4k bottom-mount.

## 1.9 QUANTIFICAZIONE DEL BORO NELLE CELLULE

La quantificazione dell'internalizzazione del boro dalle cellule è stata eseguita utilizzando l'analisi ICP-OES (Spettrometria di Emissione Ottica) e irraggiamenti neutronici. Questi ultimi permettono anche di valutarne la distribuzione mediante *imaging*, come vedremo successivamente (paragrafo 1.10).

### 1.9.1 Quantificazione in cellule Jurkat tramite ICP

Per la quantificazione del boro mediante analisi ICP-OES, le cellule Jurkat sono state coltivate in fiasche T25 e diluite nel medium per ottenere una concentrazione di  $6 \cdot 10^5$  cellule/ml. Successivamente le cellule sono state incubate con 0,33 ml di FeBNP aggiunti direttamente al terreno. L'incubazione ha avuto luogo per 2 ore. Al termine dell'incubazione, la sospensione è stata centrifugata a 180 rpm per 5 minuti, il surnatante è stato scartato e le cellule sono state lavate con 5 ml di PBS. Dopo il lavaggio, le cellule sono state risospese in 1,5 ml di PBS. I campioni ottenuti sono stati quindi digeriti in una miscela 1:1 = HNO<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in recipienti di Teflon da 50 ml. Le digestioni sono state effettuate utilizzando il sistema a microonde *Mars Microwave* a 220 °C per 15 minuti ad

una pressione di 80 Bar. Terminata la digestione, il campione stato lasciato raffreddare a temperatura ambiente e sono stati aggiunti 790 mg di mannitolo a ciascun campione per evitare la perdita di composti volatili del boro. Infine, i campioni sono diluiti 1:10 in acqua tri-distillata e analizzati tramite il metodo delle aggiunte standard.

### 1.9.2 Quantificazione in cellule HeLa tramite ICP

Per la quantificazione del boro mediante analisi ICP-OES, le cellule HeLa sono state coltivate in fiasche T25 e diluite nel medium per ottenere una concentrazione di  $6 \cdot 10^5$  cellule/ml. Il giorno successivo, le cellule sono state incubate con 1,8 ml di FeBNP aggiunti direttamente al terreno. L'incubazione ha avuto luogo per 30 minuti e 2 ore. Al termine dell'incubazione, il terreno è stato rimosso, e le cellule sono state lavate due volte con 5 ml di PBS. Al termine dei lavaggi, le cellule sono state trattate con tripsina, al fine di staccarle dal fondo della fiasca, e una volta terminata l'incubazione con tripsina, sono stati aggiunti 10 ml di terreno e la sospensione è stata centrifugata a 180 rpm per 5 minuti. Al termine della centrifuga, il surnatante è stato scartato e le cellule sono state lavate con 5 ml di PBS. Dopo il lavaggio, le cellule sono state risospese in 1,5 ml di PBS. I campioni ottenuti sono stati quindi digeriti in una miscela 1:1 = HNO<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in recipienti di Teflon da 50 ml. Le digestioni sono state effettuate utilizzando il sistema a microonde Mars Microwave a 220 °C per 15 minuti ad una pressione di 80 Bar. Terminata la digestione, il campione stato lasciato raffreddare a temperatura ambiente e sono stati aggiunti 790 mg di mannitolo a ciascun campione per evitare la perdita di composti volatili del boro. Infine, i campioni sono diluiti 1:10 in acqua tri-distillata e analizzati tramite il metodo delle aggiunte standard.

### 1.10 MISURE DELLA CONCENTRAZIONE DI BORO CON TECNICHE NUCLEARI

I neutroni possono essere suddivisi in tre classi in funzione della loro energia: neutroni termici (energia media  $E = 0.025 \text{ eV}$ ), epitermici ( $E < 10 \text{ keV}$ ) e veloci ( $E > 10 \text{ keV}$ ). Quando sono utilizzati in terapia, è necessario considerare che i neutroni perdono energia rapidamente attraversando i tessuti, per cui solo una frazione è in grado di raggiungere i tumori situati in profondità. L'utilizzo di neutroni termici è, per tutto questo motivo, limitato al trattamento di tumori della cute. Per raggiungere tumori profondi si utilizzano neutroni epitermici che sono moderati dai tessuti che attraversano in modo che alla profondità del tumore ci sia un flusso sufficiente di neutroni termici, che massimizzano

la probabilità di interazione con il boro. I neutroni veloci sono invece nocivi perché producono protoni ad alto LET, attraverso la reazione di scattering, che sono citotossici. Al fine di produrre neutroni epitermici è necessario porre filtri e moderatori tra la sorgente e il paziente, in modo da moderare l'energia dei neutroni e veloci ed eliminare neutroni indesiderati. I reattori nucleari producono fasci di neutroni sufficientemente intensi da permetterne l'utilizzo in BNCT clinica e infatti sono stati utilizzati per trial clinici in diversi paesi. Tuttavia, per trattare modelli radiobiologici come le colture cellulari, è preferibile disporre di un campo o di un fascio di neutroni termici, visto che lo spessore dello strato cellulare è ridotto. In questo modo, i neutroni interagiscono con le cellule senza la necessità di essere ulteriormente moderati e quindi il flusso a disposizione non viene depresso interponendo materiali tra la sorgente e il campione. Gli esperimenti di irraggiamento neutronico di questa tesi sono stati condotti nel reattore nucleare TRIGA (Training, Research, Isotope production, General Atomics) Mark II del Laboratorio Energia Nucleare Applicata (LENA) dell'Università deli Studi di Pavia (Figura 18).

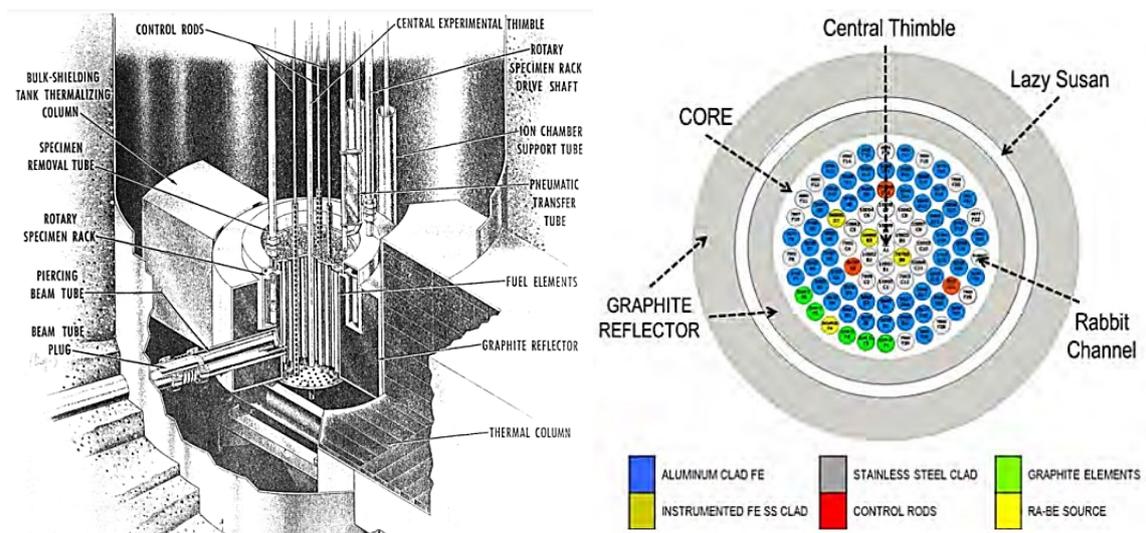


Figura 18: A sinistra il disegno a sezione del nocciolo TRIGA Mark II. Sono visibili gli elementi di combustibile, il riflettore, il porta-campioni rotante, la grafite della colonna termica e uno dei canali orizzontali. A destra Mappa del nocciolo e legenda<sup>28</sup>

Il reattore è costituito da un *core* dove avviene la reazione di fissione nucleare, un sistema di raffreddamento, una schermatura delle radiazioni prodotte dal processo di fissione e un sistema di regolazione dei processi. Il *core* si trova sul fondo di una piscina cilindrica contenente l'acqua di raffreddamento ed è circondato da uno schermo in cemento e da un riflettore radiale di grafite, che ha il compito di ridurre le fughe di neutroni dal nocciolo. L'acqua ha funzione di fluido termovettore, moderatore e schermo verticale per le radiazioni. Il trasferimento di potenza termica dalle barre di combustibile all'acqua di

raffreddamento del sistema contenuta all'interno della vasca avviene per convezione naturale. Il *core* consiste in un reticolo di 90 elementi combustibili contenete uranio disposti su cinque anelli concentrici intorno al canale centrale. Il controllo del reattore è assicurato tramite l'inserimento e l'estrazione di tre barre di controllo di materiali che assorbono neutroni termici (carburo di boro o grafite borata).

Il TRIGA Mark II ha una potenza di  $250\text{ kW}$  in regime stazionario. Il reattore utilizza elementi di combustibile solido che contengono l'8.5 % in peso di Uranio (arricchito al 19.95 % in  $^{235}\text{U}$ ), finemente disperso in una matrice metallica di idruro di zirconio. I neutroni che diffondono nel combustibile interagiscono, per scattering elastico, con gli atomi di idrogeno posti nella struttura cristallina del ZrH; quelli con elevata energia ( $0.13\text{ eV}$ ) vedono gli atomi di H come nuclei liberi e possono cedere loro parte della propria energia per scattering elastico, mentre quelli con energia in prossimità delle energie termiche ( $0.07\text{ eV}$ ) vedono l'atomo di H come legato e interagiscono con l'intera molecola in modo quantizzato. Pertanto, i neutroni possono essere moderati, attraverso urti elastici con gli atomi della struttura cristallina, solo per energie superiori ai  $0.13\text{ eV}$ . In caso contrario può accadere che sia l'atomo di H a cedere parte della sua energia e di conseguenza il neutrone è accelerato. L'aumento dell'energia cinetica del neutrone comporta una riduzione della sezione d'urto di fissione dell' $^{235}\text{U}$  e un abbassamento della densità dei neutroni termici. Le reazioni nucleari a catena che avvengono in un reattore sono avviate tramite una sorgente che produce i neutroni necessari a innescare la fissione dell'uranio. Quando l'*Uranio 235* assorbe un neutrone si divide in due nuclei più leggeri e rilascia energia termica, raggi gamma e neutroni liberi. Una porzione di tali neutroni è successivamente assorbita da altri atomi di uranio e inizia altre reazioni di fissione che rilasciano a loro volta ulteriori neutroni. Il flusso di neutroni emesso viene termalizzato grazie al contributo degli atomi di idrogeno presenti nell'acqua del moderatore.

Il reattore è dotato di diversi canali di irraggiamento interni ed esterni al nocciolo del reattore. I canali d'irraggiamento interni penetrano verticalmente nel nocciolo e sono il Canale Centrale e il Canale Rabbit. Il primo è utilizzato per la realizzazione di analisi per attivazione neutronica, per la produzione di radioisotopi o per altre applicazioni in cui è necessario un flusso elevato di neutroni. Il Canale Rabbit, invece, permette di analizzare anche campioni irraggiati contenenti radioisotopi con vita media piuttosto breve, tipicamente dell'ordine delle decine di secondi. Le postazioni d'irraggiamento esterni sono il porta-campioni rotante (Lazy Susan), i Canali Orizzontali (A, B, C e D), la

Colonna Termica e la Colonna Termalizzante. La postazione “Lazy Susan” è costituita da un porta-campioni rotante posizionato nella parte superiore del riflettore di grafite e incapsulato in alluminio. Essa può accogliere contemporaneamente 80 campioni, viene utilizzata principalmente per la realizzazione di analisi per attivazione neutronica e per la produzione di radioisotopi, garantendo un irraggiamento uniforme dei campioni. I quattro Canali Orizzontali (A, B, C, e D) vengono utilizzati principalmente per esperimenti di fisica di base e applicata. La Colonna Termica consiste essenzialmente in una cavità nella quale il campo neutronico risulta isotropo e prevalentemente termico. In essa è stata ricavata una facility di irraggiamento, protetta da due porte scorrevoli di calcestruzzo-borato (*shutter*). La Colonna Termica è utilizzata prevalentemente per attività di ricerca nell’ambito della BNCT (Boron Neutron Capture Therapy). La Colonna Termalizzante è anch’essa costituita da una cavità riempita di grafite posizionata a  $180^\circ$  rispetto alla Colonna Termica e permette di irraggiare anche campioni di notevoli dimensioni<sup>29</sup>.

**Autoradiografia neutronica:** L’autoradiografia neutronica è una tecnica nucleare che si basa sull’irraggiamento neutronico di campioni contenenti elementi che catturano neutroni. Un rivelatore passivo (Solid State Nuclear Track Detector, SSNTD) rivela le particelle cariche secondarie prodotte dalla cattura neutronica e da opportuna analisi si ricavano informazioni sulla concentrazione e sulla distribuzione di quegli elementi nel campione. Nel caso in questione si sfrutta la cattura neutronica in boro e si rivelano le alfa e gli ioni litio prodotti, utilizzando come SSNTD il CR39 (poliallil-diglicolcarbonato).

Quando le particelle secondarie prodotte dalla cattura nel boro passano attraverso il detector, creano un’elevata densità spaziale di ionizzazione, generando difetti (tracce) nel materiale. Al fine di rendere le tracce visibili in microscopia ottica, i SSNTD vengono sottoposti ad un *etching* chimico in soluzione basica. L’*etching* intacca più velocemente i siti difettivi del detector, evidenziando così le tracce derivanti dall’attraversamento di particelle cariche. Le tracce così ottenute si visualizzano con microscopio ottico. Nel nostro caso, abbiamo utilizzato un microscopio *Leica M205 FA* accoppiato a tavolino *Prior Scan* e al software *ImagePro Plus (versione 7.0)*. L’irraggiamento ha luogo nella posizione alla fine della colonna termica del reattore prossima all’apertura TRIGA Mark II, ben caratterizzata dal punto di vista del campo neutronico.

L' autoradiografia neutronica per BNCT messa a punto a Pavia prevede diversi protocolli di irraggiamento e di *etching* a seconda del tipo di informazione che si intende ottenere. Infatti, con un irraggiamento ad alta fluensa neutronica (potenza massima del reattore, 2 ore di irraggiamento) e *etching* con una soluzione di *NaOH* 6,25 M a 70 °C per 20 minuti (Figura 19), le tracce si sovrappongono e si ottiene una mappa qualitativa della distribuzione del boro nel campione (*imaging*)<sup>30</sup>. Questo è utile per studiare l'uniformità dell'assorbimento del boro in un campione di cellule o di tessuto e per ottenere informazioni preliminari sull'effettivo *uptake* di boro da parte del modello biologico impiegato. Irraggiando con fluense più basse (2 kW per 30 minuti) e con *etching* in soluzione *PEW 40* a 70 °C per 10 minuti (Figura 20), invece, le tracce restano separate; grazie all'utilizzo del tavolino motorizzato, si possono fare foto consecutive del campione e si contano le tracce. L'output in questo caso è la densità media superficiale di tracce, che si confronta con una curva di calibrazione che riporta la densità media superficiale in funzione della concentrazione di boro. Tale curva si ottiene usando campioni biologici che contengono una concentrazione nota di boro. Quest'ultima tecnica si applica a Pavia anche a campioni allo stato liquido (Figura 21). In quest'ultimo caso il setup di irraggiamento è costituito da una porta campioni di plexiglass con un elemento superiore contenente 16 alloggiamenti per campioni da 1 ml e da un elemento inferiore con quattro alloggiamenti per i rivelatori. Anche in questo caso, la fluensa neutronica e il protocollo di *etching* sono ottimizzati per ottenere tracce separate e contabili via software. Per i liquidi si irraggia a una potenza di 20 kW per 30 minuti.

È importante maneggiare con cura i CR39 durante il processo di pulizia evitare di danneggiare la superficie o di introdurre nuovi contaminanti. Per una corretta esecuzione dei protocolli è necessario preparare la soluzione di *etching* e portarla a temperatura con l'utilizzo di un apposito bagno termostatico. Si attendono 2 ore per avere una temperatura stabile e procedere con la rilevazione delle tracce.

Figura 19: Dosi per la soluzione NaOH

Composti	Peso (%)	Peso (g)
<i>NaOH</i>	20	37.5
<i>dH<sub>2</sub>O</i>	80	150.0

Figura 20: Dosi per la soluzione PEW 40

Composti	Peso (%)	Peso (g)
<i>KOH</i>	0.15	22.5
<i>C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O</i>	0.40	60.0
<i>dH<sub>2</sub>O</i>	0.45	67.5

Dopo il trattamento nella soluzione chimica si lavano i campioni con acqua corrente per circa 1 minuto in un altro porta-campioni in modo che si eliminano le restanti tracce della soluzione utilizzata. Alla fine del lavaggio si asciuga delicatamente il CR39 con un apposito panno di carta. È necessario evitare graffi sulla superficie.

L'acquisizione delle immagini delle tracce si ottiene usando il *Microscopio Leica*, accoppiato alla piattaforma motorizzata *Prior stage* e il software *ImagePro plus* installato su un computer Windows collegato alla fotocamera del microscopio Leica e al tavolino motorizzato *Prior*. Vengono scattate e acquisite almeno *40 immagini* successive di tutto il campione in modo da essere poi analizzate con uno script di analisi scritto in linguaggio *Python*.

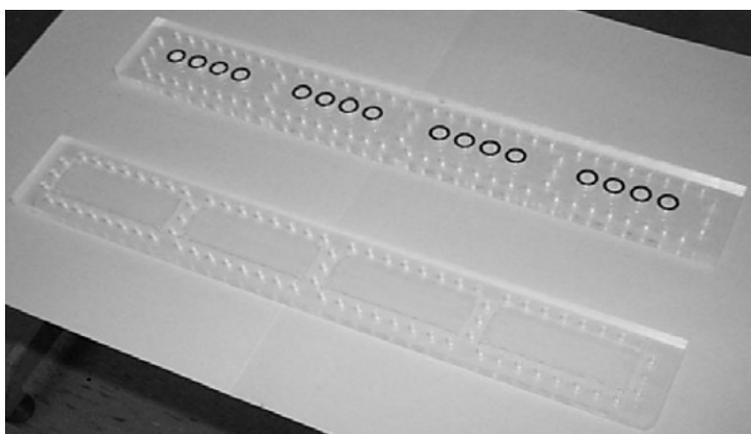


Figura 21: Sistema per l'alloggiamento dei campioni liquidi da sottoporre ad irraggiamento<sup>31</sup>

### 1.9.1 Protocollo preparazione cellule da irraggiare

Per l'allestimento delle cellule da irraggiare al reattore TRIGA al LENA si crea la mix di partenza (soluzione cellulare + terreno): per ogni condizione si ottengono  $5 \cdot 10^5$  cellule su  $1 \text{ ml}$  in un volume totale di  $6 \text{ ml}$  per condizione. L'incubazione ed i lavaggi con PBS avvengono come da protocollo precedentemente descritto (paragrafo 1.2).

Al termine, il surnatante viene eliminato ed il pellet si risospende in  $50 \mu\text{l}$  di PBS. Questo volume viene quindi posto su supporti di mylar a forma di disco di  $1.4 \text{ cm}$  di diametro precedentemente trattati in EtOH per evitare contaminazioni e pesati su una bilancia da laboratorio. La goccia viene fatta asciugare *overnight* a temperatura ambiente. Il giorno dopo il campione secco è pesato in modo da calcolare il netto delle cellule (Figura 22).

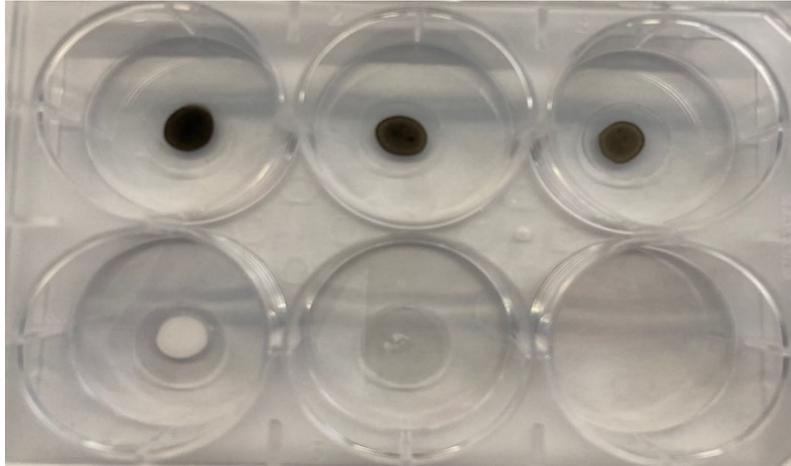


Figura 22: Cellule incubate con FeBNPs a diverse concentrazioni e poste sul mylar e fatte asciugare overnight

Le misure di concentrazione del boro e l'*imaging* della sua distribuzione nei campioni cellulari così preparati sono ottenute con autoradiografia neutronica. I dischetti di mylar con il pellet cellulare secco sono irraggiati a contatto con i rivelatori passivi CR39, come mostrato nella (Figura 22 e 23), nella colonna termica del TRIGA. Successivamente, i campioni vengono sviluppati mediante l'uso di soluzioni chimiche *PEW* o *NaOH*, rispettivamente per rilevamenti quantitativi e qualitativi come descritto sopra.

La collocazione dei campioni sul *CR39* è mostrata in (Figura 23); massimo quattro campioni per vetrino. La numerazione per la loro identificazione parte da destra. Sullo stesso lato, nell'angolo superiore, si apporta un taglio.



Figura 23: Preparazione di campioni contenenti cellule su CR-39 per essere sottoposti ad irraggiamento

# CAPITOLO 2

---

## RISULTATI OTTENUTI

### 2.1 CARATTERIZZAZIONE DELLE NANOPARTICELLE DI B<sub>4</sub>C

Le proprietà chimico-fisiche delle nanoparticelle di carburo di boro funzionalizzate con ossido di Fe (FeBNP) sono state caratterizzate tramite diffrazione di raggi X (XRD), Dynamic Light Scattering (DLS) e Microscopia elettronica in trasmissione (TEM). Il pattern XRD ha permesso di determinare la fase delle SPION prodotte e le dimensioni medie dei cristalliti, pari a  $5.0 \pm 0.9$  e  $3.7 \pm 0.4$  nm per le FeBNP 1X e 3X rispettivamente. Il DLS ha consentito di misurare il raggio idrodinamico delle FeBNPs in sospensione e nel terreno di coltura, e il TEM di osservarne la morfologia e determinare la co-localizzazione delle SPION e delle B<sub>4</sub>C NPs. Dall'analisi DLS i campioni risultano monodispersi, e presentano un raggio idrodinamico medio pari a  $51 \pm 10$  nm nel caso delle "FeBNP1X", e  $57 \pm 4$  nm nel caso delle "FeBNP3X"; la funzionalizzazione con acido poliacrilico è stata verificata tramite le misure di potenziale zeta che permettono di ottenere la carica superficiale dei nanomateriali in sospensione, pari a  $-46 \pm 0.7$  mV per le FeBNPs. La caratterizzazione del raggio idrodinamico, misurato in terreno di coltura completo, ha evidenziato che la dimensione media delle FeBNPs "3X" aumenta durante l'incubazione, e che il campione risulta polidisperso, probabilmente a causa dell'adsorbimento delle proteine del siero contenuto nel mezzo di coltura (protein corona). Le dimensioni idrodinamiche delle "FeBNPs3X" dopo 30 minuti e 2 ore di incubazione sono rispettivamente pari a  $76 \pm 32$  e  $73 \pm 27$  nm (Figura 24).

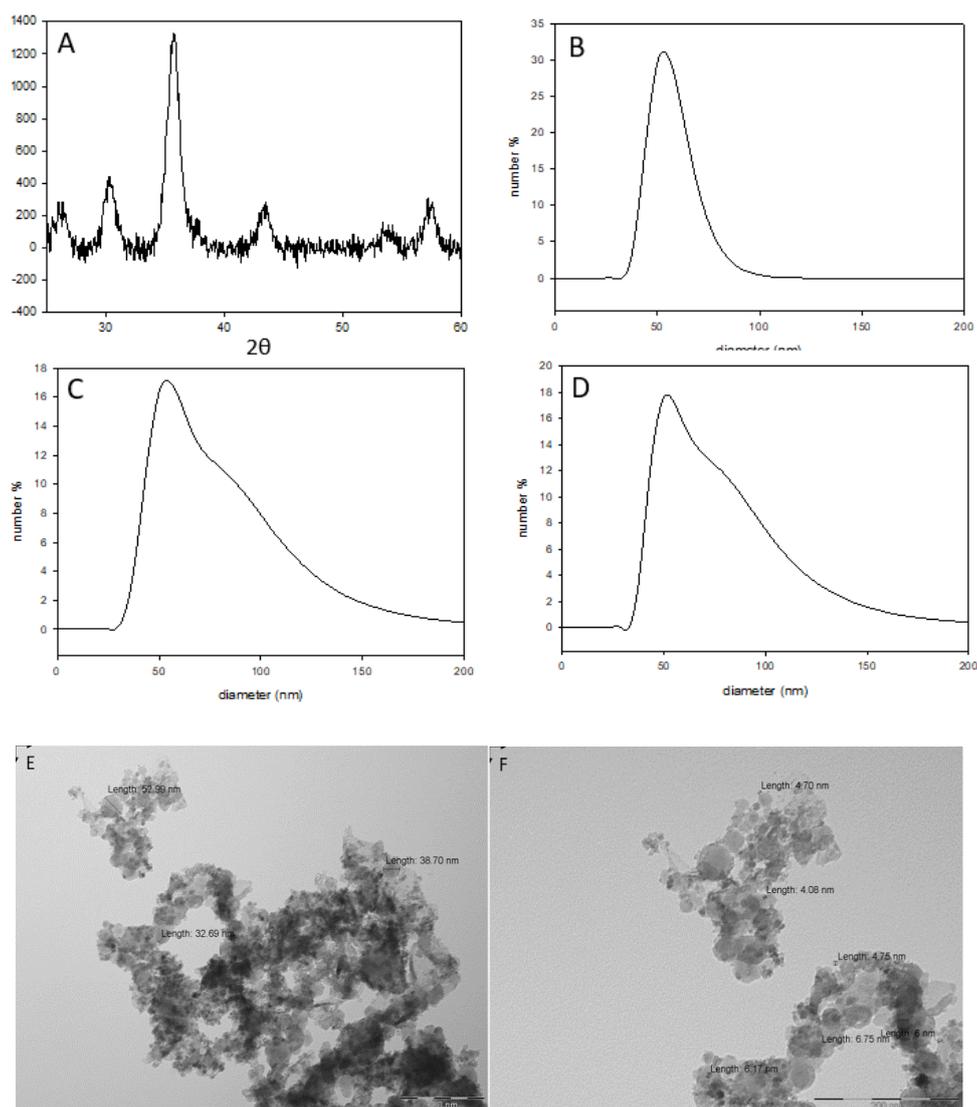


Figura 24: Pattern XRD delle FeBNPs 3X (A), in cui si distinguono i picchi della struttura cristallina degli ossidi di ferro; diametro idrodinamico delle FeBNPs 3X in dH<sub>2</sub>O misurato tramite DLS (B); diametro idrodinamico delle FeBNPs “3X” cellule Jurkat dopo 30’ e 2h di incubazione (C, D). Immagini microscopia TEM delle FeBNPs “3X” dalle quali è stato possibile verificare la co-localizzazione delle SPION e delle B4C NPs.

### 2.1.1 Quantificazione del boro nelle FeBNP tramite ICP

Dalla quantificazione ICP delle FeBNPs è risultato che la concentrazione di B nella sospensione “FeBNPs1X” è pari a 90 ppm, corrispondenti a 18 ppm di <sup>10</sup>B; invece, le “FeBNPs3X” sono costituite da una sospensione avente 224 ppm di B totale, dunque 45 ppm di <sup>10</sup>B. La concentrazione di ferro teorica in entrambe le sospensioni è pari a 5,4 mg/ml corrispondenti a 156 mg totali assoluti di magnetite nel campione.

## 2.2 HELA E JURKAT

Per lo studio dell'interazione cellule-FeBNP sono state effettuate sia analisi qualitative (analisi di microscopia SEM, TEM e confocale) che quantitative (analisi della vitalità cellulare (Test MTT), analisi citofluorimetrica, dosaggio dell'*uptake* di B mediante ICP o di attivazione neutronica).

### 2.2.1 Captazione delle FeBNP e valutazione della vitalità

Lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di porre le basi per la veicolazione di nanoparticelle contenenti  $^{10}\text{B}$  tramite un *carrier* cellulare, ovvero i linfociti. Di conseguenza, sono stati svolti degli studi parametrici al fine di trovare le condizioni ideali per ottenere un elevato uptake di  $^{10}\text{B}$

Per valutare il grado di *uptake* e l'eventuale tossicità delle FeBNP, le cellule delle linee HeLa e Jurkat sono state trattate con concentrazioni crescenti di FeBNP a diversi tempi di incubazione, da *30 minuti* fino a *72 ore*. Il fine è stato quello di determinare le dosi e i tempi ottimali per raggiungere un buon livello di internalizzazione senza che fosse alterata la vitalità cellulare. L'obiettivo è quello di potersi avvicinare alla dose minima terapeutica di *25-30  $\mu\text{g } ^{10}\text{B/g di tumore}$*  ( $\sim 10^9$  atomi/cellula) in assenza di un effetto tossico.

Inizialmente è stata svolta l'analisi di cellule Jurkat in sospensione poste in incubazione con diverse diluizioni (*1:10, 1:20, 1:30, 1:80 e 1:200*) di una soluzione di FeBNP1X aventi una concentrazione pari a *90 ppm* di B totali. Le diluizioni corrispondono dunque a *9, 4,5; 3; 1,13 e 0,45  $\mu\text{g/ml}$*  di B. Considerando che le FeBNP sono state aggiunte a *100  $\mu\text{l}$*  di sospensione contenente *1 milione di cellule / ml*, le concentrazioni di B aggiunte corrispondono alle dosi di  $^{10}\text{B}$  pari a: *1365; 683; 455; 171; 68  $\mu\text{g/g tessuto}$* , calcolate come segue:

$$\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \cdot \text{ml} = \mu\text{g} \qquad \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} = \text{ppm, dose}$$

Il peso del tessuto, quindi di cellule, è stato ottenuto pesando *3 milioni di cellule* a seguito della taratura dei dischi di mylar su cui sono state depositate, e considerando che il tessuto secco ha un peso pari al *20 %* del peso bagnato, e che la densità è assimilabile a quella dell'acqua, pari a *1 g/ml*.

Mediante il saggio colorimetrico *standard* MTT (3, (4,5-dimethylthiazol-2) 2,5 difeniltetrazolium bromide) è stata valutata la vitalità cellulare. I dati ottenuti sono stati normalizzati rispetto al controllo ed utilizzati per costruire le curve dose-risposta.

I risultati ottenuti sono di seguito riportati (Figura 25):

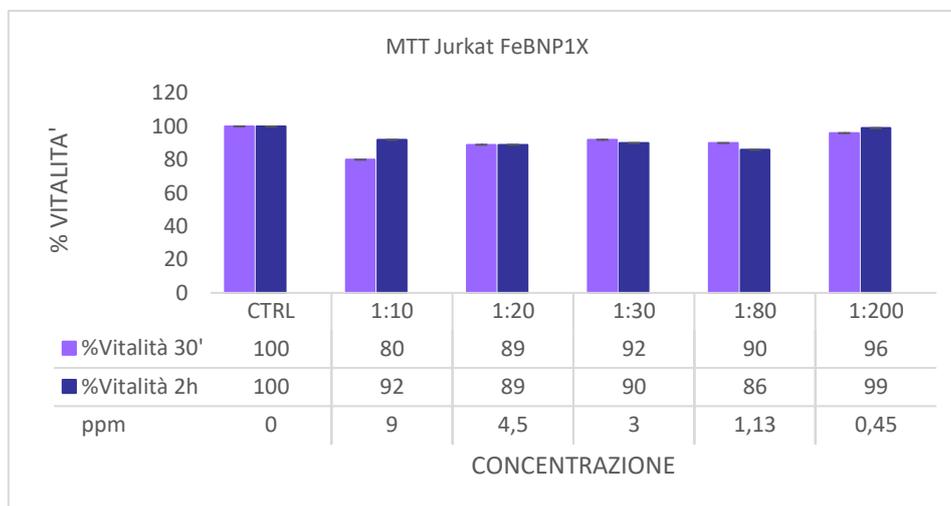


Figura 25: Vitalità cellulare in cellule Jurkat trattate con diverse concentrazioni di FeBNP1X per 30 minuti e 2 ore. Le concentrazioni utilizzate sono riportate sia come diluizioni che in ppm calcolati secondo il dosaggio ICP.

Dai risultati ottenuti si evince che le FeBNP1X non hanno effetti tossici per le cellule. Per tutte le diluizioni testate, la vitalità cellulare riscontrata è infatti prossima al valore delle cellule di controllo (100 %) e comunque, sempre superiore all'80 %.

Data la buona tollerabilità delle cellule alle FeBNP1X, si è ritenuto di studiare nanoparticelle con un contenuto di boro superiore. Ciò nell'ottica di aumentare la quantità di  $^{10}\text{B}$  captato dalle cellule e quindi aumentare l'efficacia del trattamento. Incrementando dunque la quantità di  $B_4C$  nella sintesi delle nanoparticelle sono state ottenute FeBNP con una concentrazione di boro pari a 224 ppm, corrispondenti a 45 ppm  $^{10}\text{B}$  totali. Queste nuove nanoparticelle, ottenute dell'aggiunta del triplo di  $B_4C$  NP rispetto alle FeBNP1X, sono state denominate "FeBNP3X".

Le FeBNP3X sono quindi state testate sulle cellule Jurkat per valutarne la tossicità con simili diluizioni (1:10, 1:20, 1:30 e 1:40) e per simili tempi di incubazione (30 minuti, 2 ore, 30 minuti – 30 minuti + 24 ore) utilizzati precedentemente per le FeBNP1X [Figura (X)]. Le diluizioni corrispondono a concentrazioni pari a 22,4; 11,2; 7,46; 5,6,  $\mu\text{g/ml}$  di B. Il saggio è stato fatto aggiungendo le FeBNP3X a 100  $\mu\text{l}$  di sospensione contenente 1 milione di cellule / ml, dunque, la dose di  $^{10}\text{B}$  somministrata con le diverse diluizioni è

rispettivamente pari a: 3368; 1684; 1123; 842  $\mu\text{g/g}$  di tessuto. Il calcolo della dose è stato svolto analogamente a quello riportato per le FeBNP1X:

$$\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \cdot \text{ml} = \mu\text{g} \quad \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} = \text{ppm, dose}$$

I risultati di vitalità ottenuti sono di seguito riportati (Figura 26 e 27):

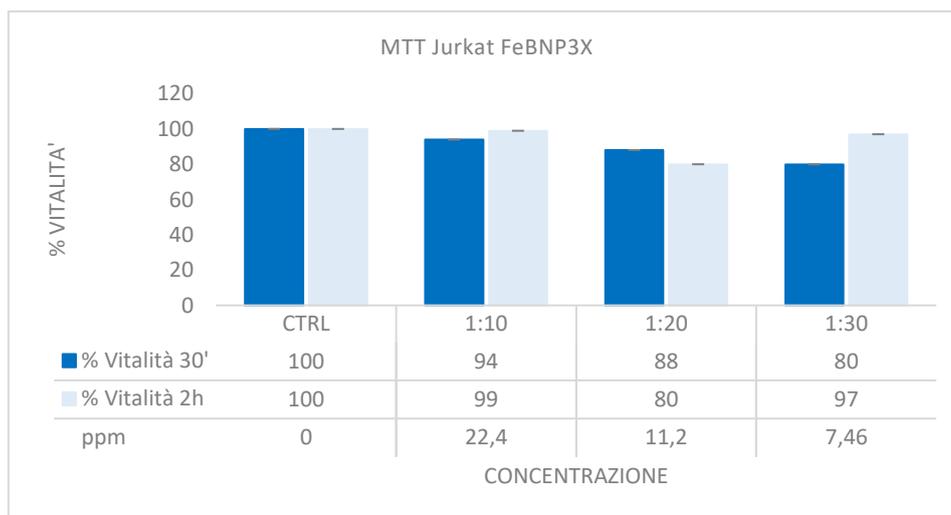


Figura 26: Vitalità cellulare in cellule Jurkat trattate con diverse concentrazioni di FeBNP per 30 minuti e 2 ore. Le concentrazioni utilizzate sono riportate sia come diluizioni che in ppm calcolati secondo il dosaggio ICP.

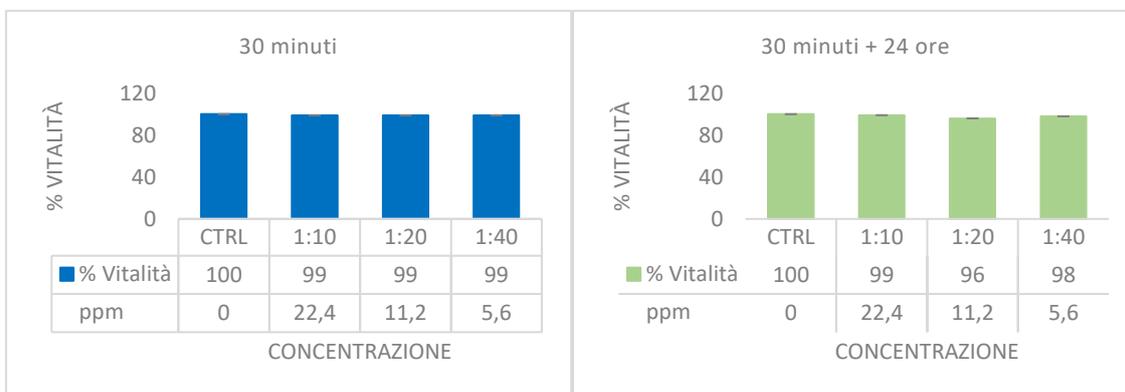


Figura 27: Vitalità cellulare in cellule Jurkat trattate con diverse concentrazioni di FeBNP per 30 minuti (a destra) e 30 minuti più 24 ore aggiuntive in assenza di nanoparticelle (a sinistra). Le concentrazioni utilizzate sono riportate sia come diluizioni che in ppm calcolati secondo il dosaggio ICP.

In conclusione, i risultati dimostrano come l'aumento della concentrazione assoluta di  $^{10}\text{B}$  all'interno della sospensione di nanoparticelle non abbia influito in maniera negativa sulla vitalità cellulare. Quest'ultima, infatti, continua ad assumere valori superiori al 80 % in tutti gli esperimenti.

Abbiamo pertanto deciso di usare la sospensione nanoparticellare FeBNP3X al posto di quella iniziale FeBNP1X, poiché, garantisce una buona vitalità cellulare e quindi ci si può aspettare una maggiore concentrazione di  $^{10}\text{B}$  internalizzata dalle cellule in esame.

Con le FeBNP3X si è valutato l'effetto citotossico nel caso in cui le cellule, incubate con le nanoparticelle per un tempo breve (30 minuti), fossero poi lasciate in assenza di nanoparticelle per ulteriori 24 ore, prima che ne venisse valutata la vitalità. Il risultato ottenuto (Figura 27) indica che, anche nel caso di una persistenza prolungata, le nanoparticelle sono ben tollerate dalla cellula. Questo garantisce, in teoria, che un linfocita carico di FeBNP3X rimanga vitale e possa quindi muoversi nel torrente circolatorio almeno per 24 ore dopo la fase di "caricamento".

Avendo comunque come obiettivo di valutare la tolleranza della cellula a quantità crescenti di FeBNP3X, sono stati presi in considerazione tempi di incubazione nell'ordine dei giorni. Assumendo che a tempi di incubazione crescenti corrisponda un aumento delle nanoparticelle captate dalle cellule, si è valutata la vitalità dopo 24, 48 e 72 ore di incubazione per concentrazioni di FeBNP3X di 1:30 (7,46 ppm). È stata scelta questa concentrazione poiché considerata come un buon compromesso a livello dose-risposta.

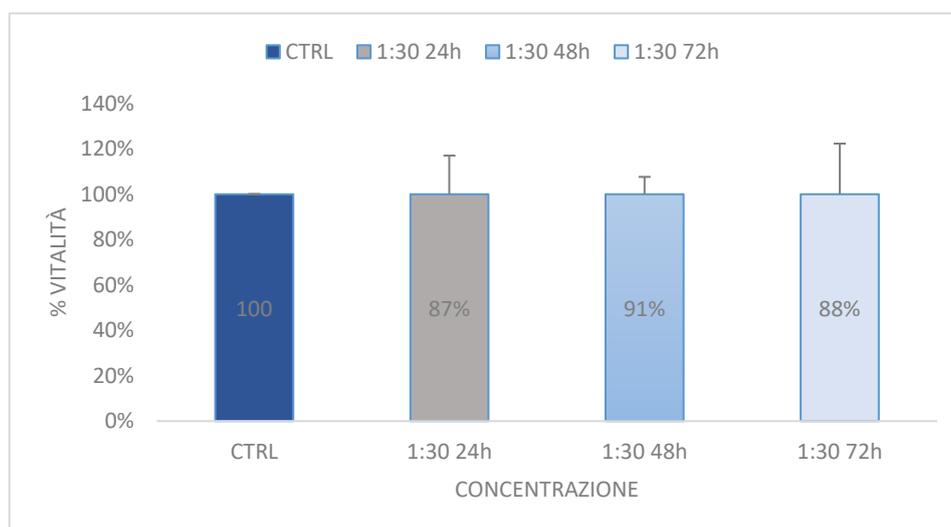


Figura 28: Vitalità cellulare in cellule Jurkat trattate con FeBNP per 24, 48 e 72 ore. Le concentrazioni utilizzate sono riportate sia come diluizioni che in ppm calcolati secondo il dosaggio ICP.

Il risultato riportato (Figura 28) indica che le FeBNP3X, sono ben tollerate e non mostrano tossicità anche nel caso di tempi di incubazione piuttosto lunghi.

Sebbene il fine ultimo dello studio sia quello di provare che i linfociti sono in grado di internalizzare le FeBNP3X per poi trasportarle nei distretti cellulari desiderati, si è

studiato il livello di interazione nanoparticella-cellula anche con una linea di cellule epiteliali di confronto, le HeLa, già utilizzata in precedenza dal nostro gruppo di lavoro per studi di internalizzazione. Gli stessi parametri di concentrazione di FeBNP3X e tempi di incubazione scelti per le Jurkat, sono stati applicati anche alle cellule HeLa (Figura 29).

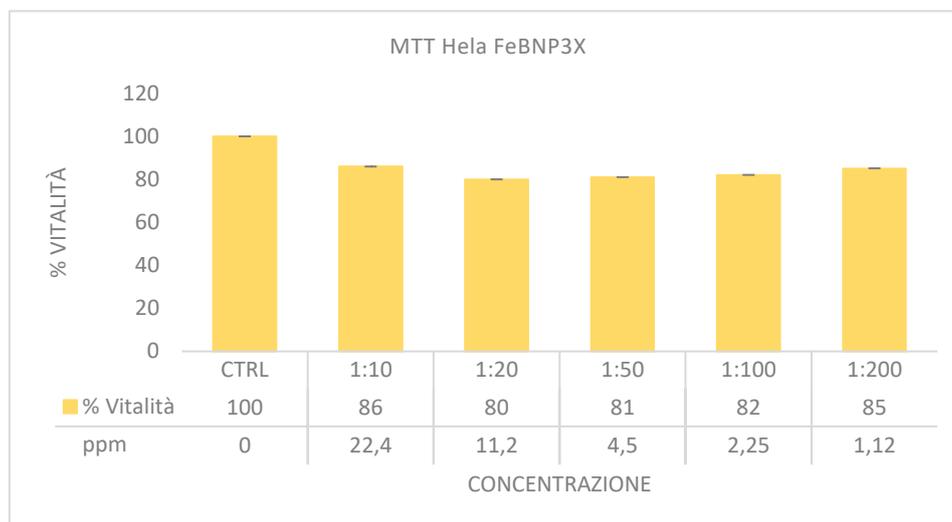


Figura 29: Vitalità cellulare in cellule HeLa trattate con diverse concentrazioni di FeBNP per 30 minuti. Le concentrazioni utilizzate sono riportate sia come diluizioni che in ppm calcolati secondo il dosaggio ICP.

Il test di vitalità risultante ha dimostrato che, anche nel caso dell'incubazione delle cellule HeLa con FeBNP3X, la vitalità cellulare restava, in tutti i casi, superiore all'80 %.

### 2.2.2 Valutazione dell'interazione nanoparticelle-cellule mediante microscopio elettronico a scansione (SEM)

A questo punto si è reso necessario verificare l'effettiva interazione delle FeBNP3X con le cellule. La prima valutazione è stata fatta utilizzando il microscopio elettronico a scansione (SEM) per visualizzare la superficie cellulare. A tale scopo, le cellule Jurkat sono state incubate con diverse concentrazioni di nanoparticelle (1:20, 1:40, 1:80 e 1:100) per tempi brevi, 30 minuti, seguiti da tempi lunghi in assenza di nanoparticelle per poter verificare la persistenza delle FeBNP3X nel tempo (30 minuti + 24 ore, 30 minuti + 48 ore e 30 minuti + 72 ore). Dalle immagini acquisite, mediante l'utilizzo del fascio di elettroni retrodiffusi (BSE), possiamo distinguere le cellule Jurkat in scale di grigio in funzione della composizione del campione. Le zone più scure corrispondono ad elementi più leggeri (peso atomico più basso), quelle più chiare ad elementi a peso atomico

maggiore. Il ferro (Fe) è un elemento molto più pesante degli elementi che costituiscono per la maggior parte i tessuti biologici (carbonio, idrogeno, ossigeno, azoto); di conseguenza, le nanoparticelle adese alla superficie delle cellule appaiono come agglomerati chiari.

Le immagini acquisite sono qui di seguito riportate (Figura dalla 30 alla 38)

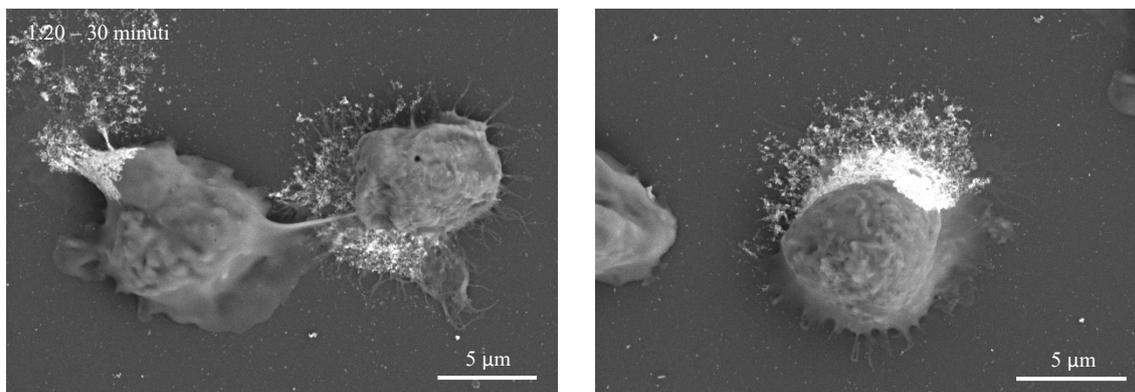


Figura 30: Immagini SEM di cellule Jurkat incubate con FeBNP3X (1:20) per 30 minuti. Detector BSE, SEM HV: 5.0 kv.

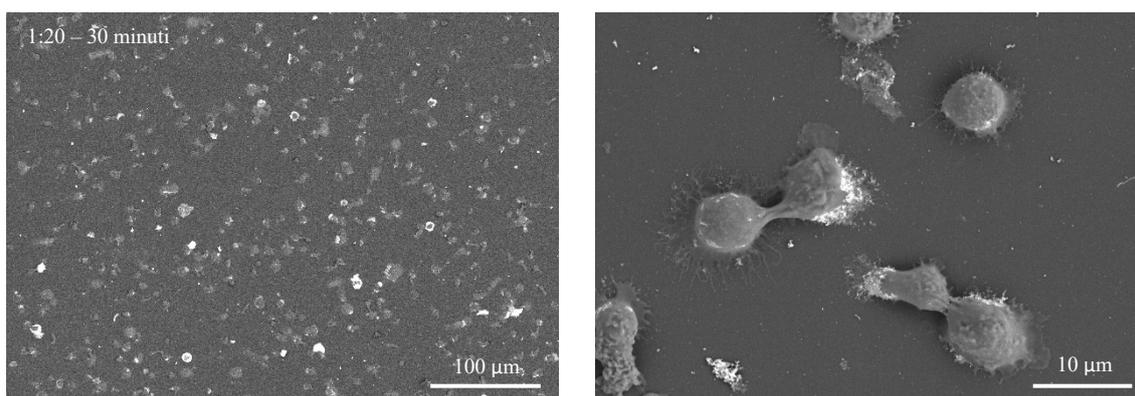


Figura 31: Immagini SEM di cellule Jurkat incubate con FeBNP3X (1:20) per 30 minuti. Detector BSE, SEM HV: 5.0 kv.

Già dopo 30 minuti di incubazione è possibile osservare la presenza di materiale adeso sulla quasi totalità delle cellule osservate.

Per dimostrare che fossero effettivamente FeBNP in corrispondenza delle zone bianche dell'immagine, abbiamo puntato il pennello sulla parte interessata ed effettuato un'analisi raggi-X. Questi presentano un'energia caratteristica che permette di identificare gli elementi che costituiscono il campione, sia da un punto di vista qualitativo che semi-quantitativo. Dall'analisi, mostrata in (Figura 32), risulta confermata la presenza di Fe e quindi la riprova che le FeBNP sono adese sulle cellule.

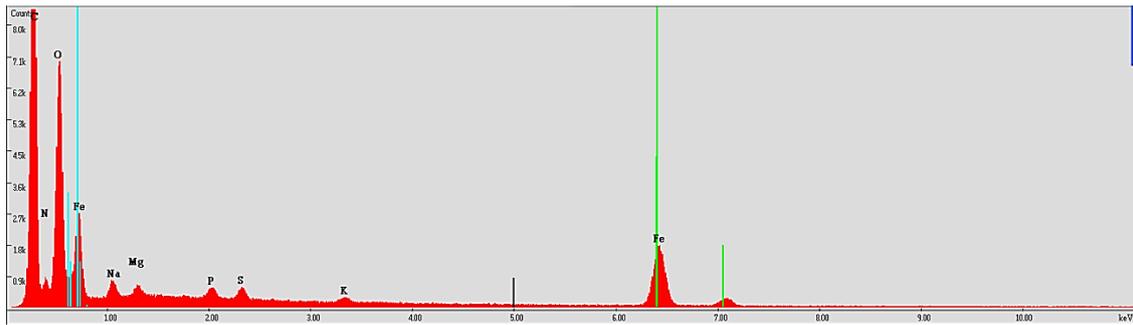


Figura 32: Analisi Raggi X della composizione degli elementi del campione.

Sono stati quindi analizzati i campioni incubati con le FeBNP3X per 30 minuti + 24, 48 e 72 ore. In questo caso notiamo come sia possibile osservare la presenza delle nanoparticelle anche dopo giorni (24, 48 e 72 ore) dall'iniziale "caricamento" di 30 minuti

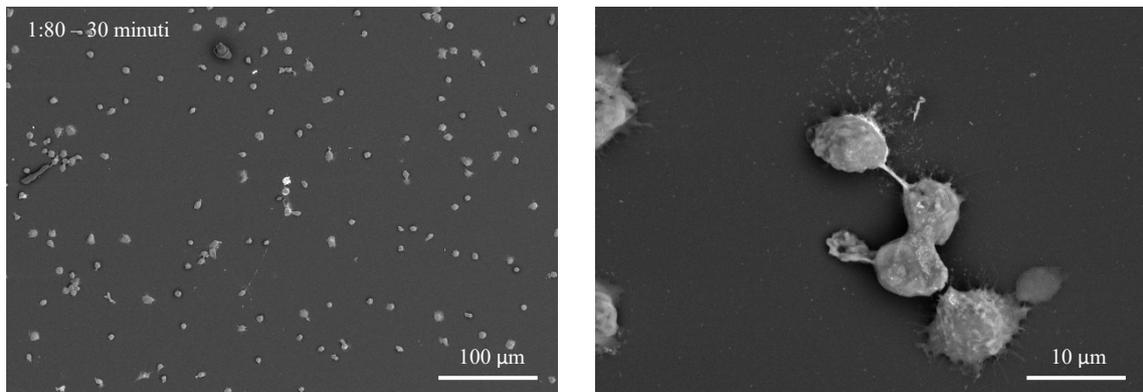


Figura 33: Immagini SEM di cellule Jurkat incubate con FeBNP3X (1:80) per 30 minuti. Detctor BSE, SEM HV: 8.0 kv.

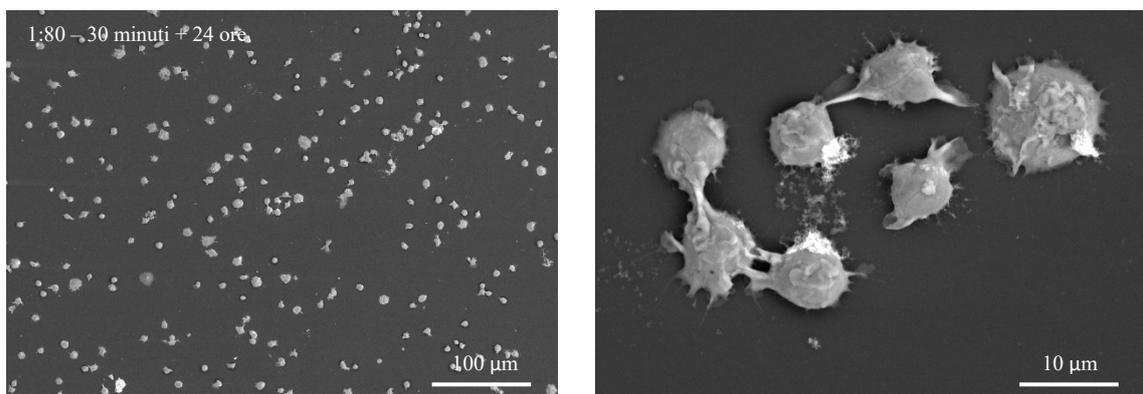


Figura 34: Immagini SEM di cellule Jurkat incubate con FeBNP3X (1:80) per 30 minuti + 24 ore. Detctor BSE, SEM HV: 8.0 kv.

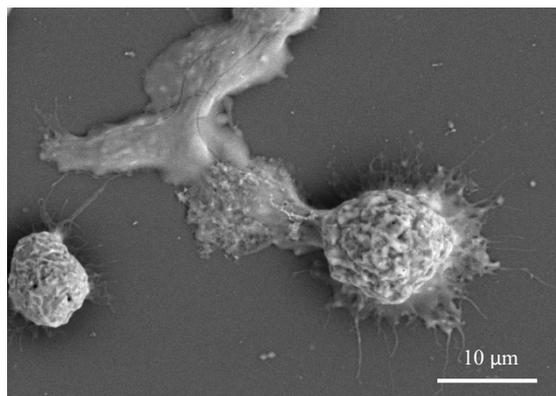
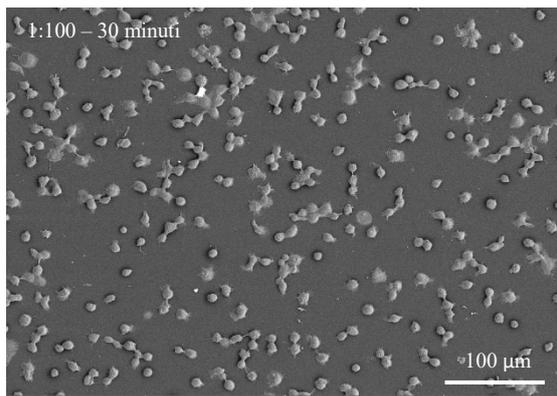


Figura 35: Immagini SEM di cellule Jurkat incubate con FeBNP3X (1:100) per 30 minuti. Detctor BSE, SEM HV: 5.0 kv

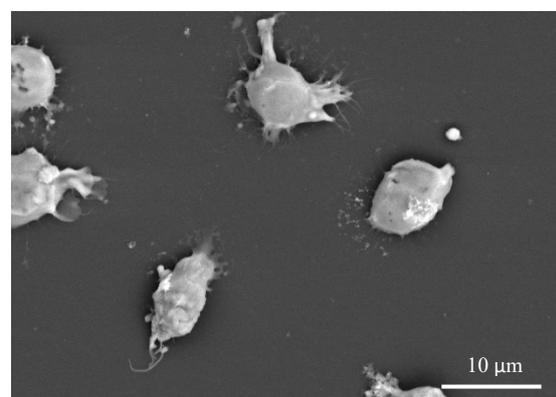
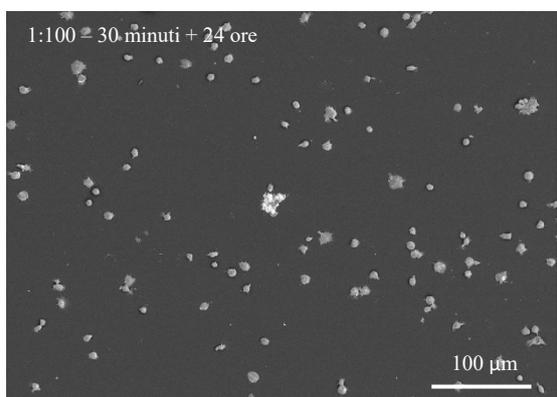


Figura 36: Immagini SEM di cellule Jurkat incubate con FeBNP3X (1:100) per 30 minuti + 24 ore. Detctor BSE, SEM HV: 5.0 kv.

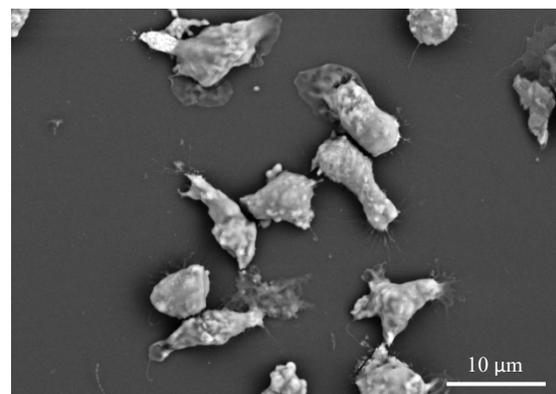
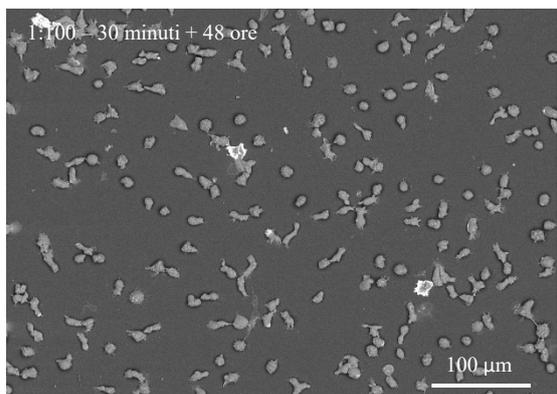


Figura 37: Immagini SEM di cellule Jurkat incubate con FeBNP3X (1:100) per 30 minuti + 48 ore. Detctor BSE, SEM HV: 5.0 kv.

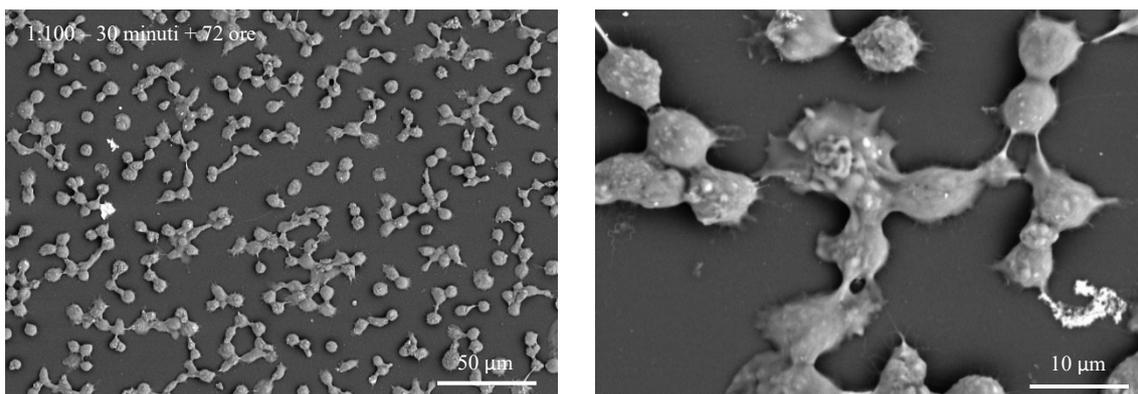


Figura 38: Immagini SEM di cellule Jurkat incubate con FeBNP3X (1:100) per 30 minuti + 72 ore. Detctor BSE, SEM HV: 5.0 kv.

In conclusione, mediante l'analisi SEM, è stato possibile verificare che le nanoparticelle interagiscono effettivamente con le cellule aderendo sulla loro superficie. Con questa tecnica non è tuttavia possibile verificare la presenza delle nanoparticelle all'interno delle cellule poiché, il fascio di elettroni generato dalla sorgente non riesce a penetrare la membrana, ma scansiona solo la superficie del campione.

### 2.2.3 Valutazione dell'interazione nanoparticelle-cellule mediante l'analisi della componente fluorescente delle FeBNP3X

Una volta avuta l'indicazione dall'analisi SEM che le FeBNP3X sono in grado di interagire con le cellule è stato necessario quantificare il livello di interazione.

A tale scopo, ed è stato valutato il livello di internalizzazione mediante 1) Analisi spettrofluorimetrica, 2) Analisi citofluorimetrica. Per questo tipo di analisi si è deciso di inserire, in fase di sintesi, nello strato superficiale delle FeBNP3X, un fluorocromo: il DiI (DiI18(3)) in modo da poter studiare l'andamento della fluorescenza in relazione ai tempi di incubazione e alle diluizioni utilizzate.

#### 1) Analisi spettrofluorimetrica

Per questa analisi, la fluorescenza è stata misurata mediante Plate Reader. Lo scopo finale è stato quello di confermare i risultati ottenuti al SEM, ossia che le nanoparticelle interagiscono con le cellule, e quantificarne l'interazione.

Il risultato ottenuto è riportato in (Figura 39).

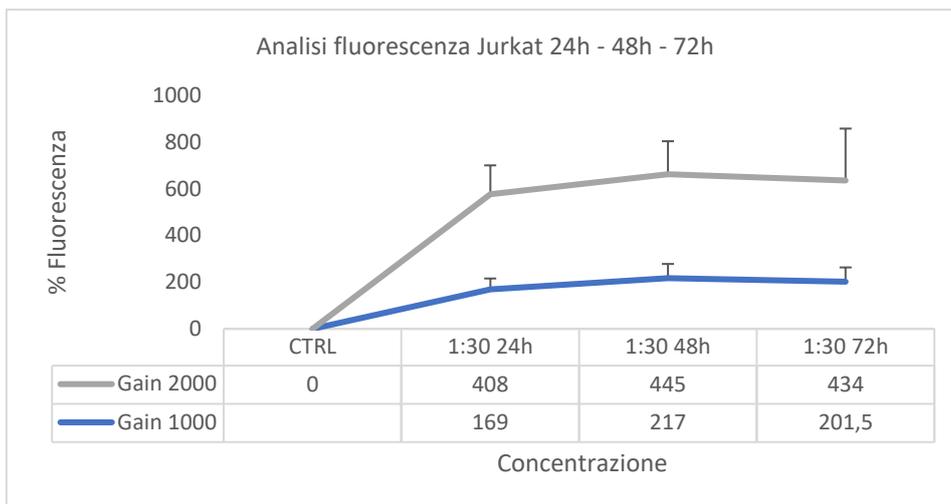


Figura 39: Fluorescenza valutata al Plate Reader in cellule Jurkat incubate con FeBNP3X (1:30) per 24, 48 e 72 ore. Le concentrazioni utilizzate sono riportate sia come diluizioni che in ppm calcolati secondo il dosaggio ICP. Le due curve si riferiscono a letture fatte con due diversi gain (1000 e 2000).

Il grafico mostra che il segnale fluorescente cresce nei campioni incubati fino a 48 ore, subendo un abbassamento/arresto a 72 ore di incubazione, dove il valore diventa confrontabile con quello delle 48 ore.

Per ottenere indicazioni circa la quantità effettiva di FeBNP3X captate dalle cellule, si è costruita una curva di taratura utilizzando quantità note di nanoparticelle disperse in PBS e valutandone la fluorescenza risultante (Figura 40). Questo per ottenere, mediante l'interpolazione della curva di taratura con i dati sperimentali raggiunti, la quantità di nanoparticelle che hanno interagito con le cellule durante la fase di incubazione (la quantità adesa sulla superficie più la quantità internalizzata).

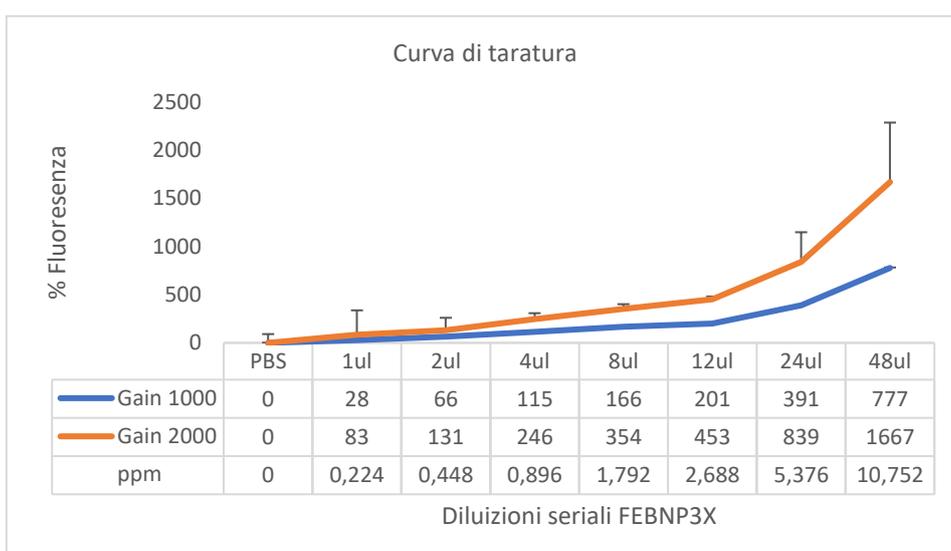


Figura 40: Curva di taratura effettuata con diluizioni seriali al raddoppio di FeBNP3X in 1ml di PBS.

I valori per costruire la curva sono stati scelti effettuando diluizioni seriali al raddoppio della soluzione di partenza delle FeBNP3X (224 ppm) in 1 ml PBS. Si parte da 1  $\mu$ l e si raddoppia la dose fino a 48  $\mu$ l. Le varie dosi presentano rispettivamente ppm pari a 0,224 (1  $\mu$ l); 0,448 (2  $\mu$ l); 0,896 (4  $\mu$ l); 1,792 (8  $\mu$ l); 2,688 (12  $\mu$ l); 5,376 (24  $\mu$ l) e 10,752 (48  $\mu$ l).

I risultati sperimentali ottenuti dalla fluorescenza delle FeBNP3X-fluo internalizzate dalle cellule a vari tempi di incubazione: 169, 217 e 201,5 – GAIN 1000; 408, 445 e 434 – GAIN 2000 (Figura 39) sono stati quindi interpolati con la curva di taratura (Figura 40). Si è così potuto ottenere una valutazione quantitativa delle FeBNP3X captate: per un totale di  $1 \cdot 10^6$  cellule (1,2 mg di peso secco), si acquisisce un valore pari a 1,79 (8  $\mu$ l), 3 (12,9  $\mu$ l) e 2,7 (12  $\mu$ l) ppm a seguito di un tempo di incubazione rispettivamente di 24, 48 e 72 ore (Figura 41 e 42).

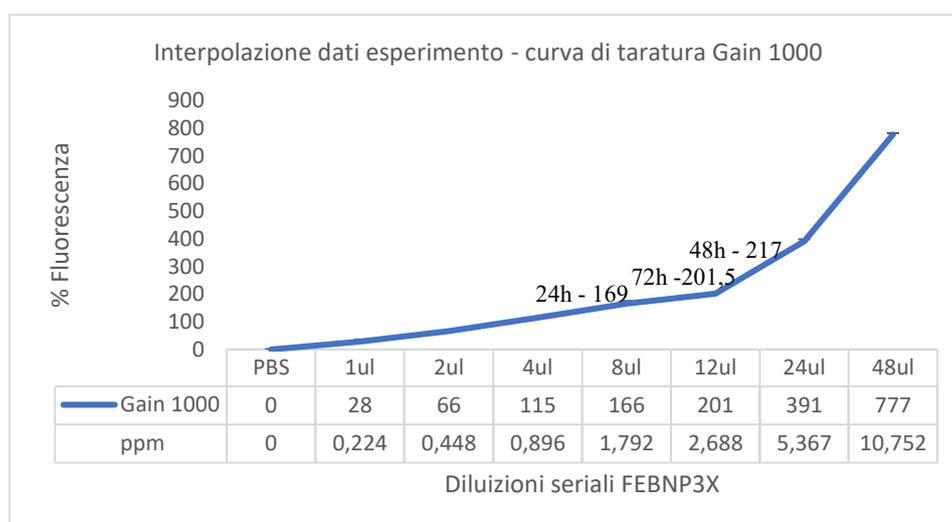


Figura 41: Interpolazione dei dati di fluorescenza (Figura 39 gain 1000) di cellule Jurkat, incubate con FeBNP per 24, 48 e 72 ore, con la curva di taratura calcolata al PlateReader con gain 1000.

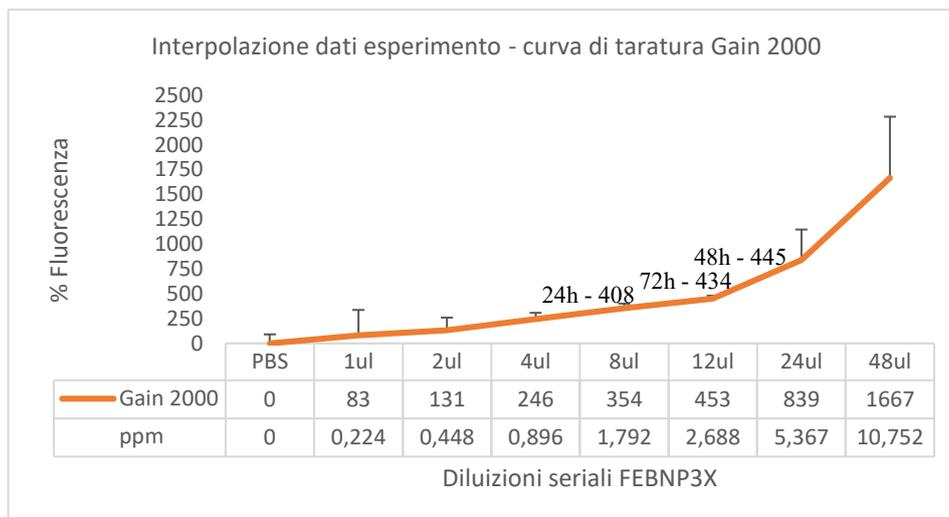


Figura 42: Interpolazione dei dati di fluorescenza (Figura 39 gain 2000) di cellule Jurkat, incubate con FeBNP per 24, 48 e 72 ore, con la curva di taratura calcolata al PlateReader con gain 2000.

Le cellule sono state contate prima di ogni esperimento in modo da monitorare la crescita cellulare. In particolare, siamo partiti da una condizione di  $5 \cdot 10^5$  cellule/ml e le abbiamo incubate con le FeBNP3X per 24, 48 e 72 ore. I giorni seguenti, una colta effettuata la conta, abbiamo fatto in modo di diluire, se necessario, la sospensione cellulare con del terreno per riportarle alla condizione di partenza di  $5 \cdot 10^5$  cellule/ml e mantenere così un rapporto nanoparticelle-cellule costante (Figura 43, 44 e 45).

	Controllo	Jurkat + FeBNP
Tempo 0	500.000 cellule/ml	500.000 cellule/ml
24 ore	1 mln cellule/ml	1 mln cellule/ml

Figura 43: Il tempo 0 rappresenta le condizioni con cui iniziamo l'esperimento. Le 24h mostrano la crescita cellulare avvenuta sia in condizioni standard (controllo) che in incubazione con nanoparticelle FeBNP.

	Controllo	Jurkat + FeBNP
Giorno 1	500.000 cellule/ml	500.000 cellule/ml
48 ore	1 mln cellule/ml	1 mln cellule/ml

Figura 44: Il giorno 1 rappresenta le condizioni a cui riportiamo l'esperimento dopo 24h di crescita. Le 48h mostrano la crescita cellulare avvenuta sia in condizioni standard (controllo) che in incubazione con nanoparticelle FeBNP.

	<i>Controllo</i>	<i>Jurkat + FeBNP</i>
<i>Giorno 2</i>	500.000 cellule/ml	500.000 cellule/ml
<i>72 ore</i>	1 mln cellule/ml	600.000 cellule/ml

*Figura 45: Il giorno 2 rappresenta le condizioni a cui riportiamo l'esperimento dopo 48h di crescita. Le 72h mostrano la crescita cellulare avvenuta sia in condizioni standard (controllo) che in incubazione con nanoparticelle FeBNP*

Dai risultati ottenuti, si osserva che all'aumentare dei tempi di incubazione l'intensità di fluorescenza, dunque la concentrazione di nanoparticelle nelle cellule, aumenta fino a 48 ore per poi rimanere pressoché invariata durante le successive 24 ore (per arrivare ad un totale di 72 ore).

Il mancato incremento nella concentrazione di nanoparticelle osservato a 72 ore di incubazione, rispetto alle 24 ore e 48 ore, può essere spiegato con la riduzione della capacità delle cellule di adsorbire ed internalizzare nanoparticelle, dal momento che per le 72 ore non si è riscontrato un abbassamento della vitalità diverso dalle altre condizioni testate e comunque tale da giustificare la riduzione della fluorescenza. Si può quindi speculare che con l'incubazione di 48 ore sia stato raggiunto un livello di saturazione della capacità della cellula di internalizzare nanoparticelle, e di conseguenza per tempi più lunghi i valori tornano ad abbassarsi. Tuttavia, bisogna tenere conto anche del fatto che, successivamente alla fase di endocitosi delle nanoparticelle, può seguire un processo di esocitosi, durante il quale le nanoparticelle, precedentemente internalizzate, vengono rilasciate dalla cellula. Questa fase di "perdita" potrebbe spiegare la riduzione in fluorescenza associata alle cellule, specie nel caso di tempi di incubazione particolarmente lunghi dove il livello di internalizzazione può raggiungere valori alti.

Nel presente capitolo sono riportati i valori della quantificazione di boro (espressa come ppm) svolta tramite ICP. Da queste misure è stato trovato che il contenuto di  $^{10}\text{B}$  dopo 2 ore di incubazione con 6 milioni di cellule è pari a 52.5 ppm (8.75  $\mu\text{g } ^{10}\text{B} / \text{milione di cellule}$ ). Tramite il saggio di fluorescenza e l'interpolazione con la curva di taratura, il contenuto di  $^{10}\text{B}$  dopo 24 ore di incubazione è risultato pari a 270  $\mu\text{g } ^{10}\text{B}$  per milione di cellule. Questa differenza è dovuta innanzitutto ai diversi tempi di incubazione, e al diverso numero di cellule coinvolto negli esperimenti. Inoltre, il nanomateriale utilizzato non è intrinsecamente fluorescente, ma è stato funzionalizzato con un fluoroforo (DiI) come descritto precedentemente (Capitolo 1, Paragrafo 1.6). Di conseguenza, la misura

dell'*uptake* tramite fluorescenza è direttamente proporzionale al contenuto di fluoroforo, e non a quello di  $^{10}\text{B}$ . Inoltre, le FeBNP sono nanomateriali compositi costituiti da due fasi:  $\text{B}_4\text{C}$  NP (il *carrier* di boro), e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NP; tramite la microscopia in trasmissione elettronica è stato possibile verificare che tutto il *carrier* di boro è co-localizzato con le SPION, ma che quest'ultime (presenti in concentrazione maggiore) non sempre sono co-localizzate con le  $\text{B}_4\text{C}$  NP. Per tale motivo, non è possibile stabilire un'esatta correlazione tra l'intensità di fluorescenza e la sola concentrazione di  $^{10}\text{B}$ , in quanto la prima varia in funzione della concentrazione dei nanomateriali compositi. Tuttavia, le misure in fluorescenza hanno fornito un andamento qualitativo dell'internalizzazione dei nanomateriali nel tempo.

La valutazione dell'interazione nanoparticelle-cellule, mediante valutazione della fluorescenza, è stata effettuata anche nel caso delle cellule HeLa le quali sono state incubate con diverse concentrazioni di FeBNP3X-fluo per 30 minuti (Figura 46).

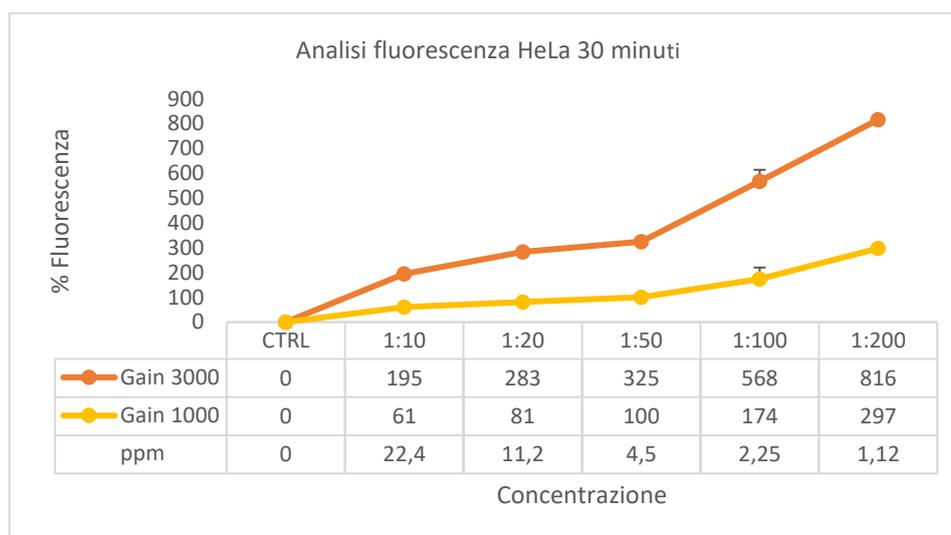


Figura 46: Fluorescenza valutata al Plate Reader, in cellule HeLa incubate con diverse concentrazioni di FeBNP3X per 30 minuti. Le concentrazioni utilizzate sono riportate sia come diluizioni che in ppm calcolati secondo il dosaggio ICP.

Come si può osservare dal grafico, la fluorescenza cresce con l'aumento dei ppm di FeBNP3X utilizzati per l'incubazione. In questo caso, diversamente da quanto osservato per le cellule Jurkat, non si vede il raggiungimento di un plateau, ma un aumento proporzionale di fluorescenza/nanoparticelle rispetto alle concentrazioni di FeBNP3X utilizzate.

Possiamo pertanto affermare che, in generale, sia in cellule Jurkat in sospensione che in cellule HeLa in adesione l'utilizzo di nanoparticelle FeBNP3X non comporta una diminuzione della vitalità cellulare a concentrazioni elevate e periodi prolungati.

## 2) Analisi citofluorimetrica

Mediante l'analisi citofluorimetrica è stato possibile quantificare, con maggior precisione, il grado di adesione/internalizzazione delle FeBNP3X con le cellule. Entrambe le linee cellulari, HeLa e Jurkat, sono incubate con FeBNP3X fluorescenti a diverse diluizioni (1:10, 1:20, 1:30, 1:40 e 1:200) per un tempo di incubazione di 30 minuti (Figura 47). I campioni sono analizzati valutando il livello di fluorescenza.

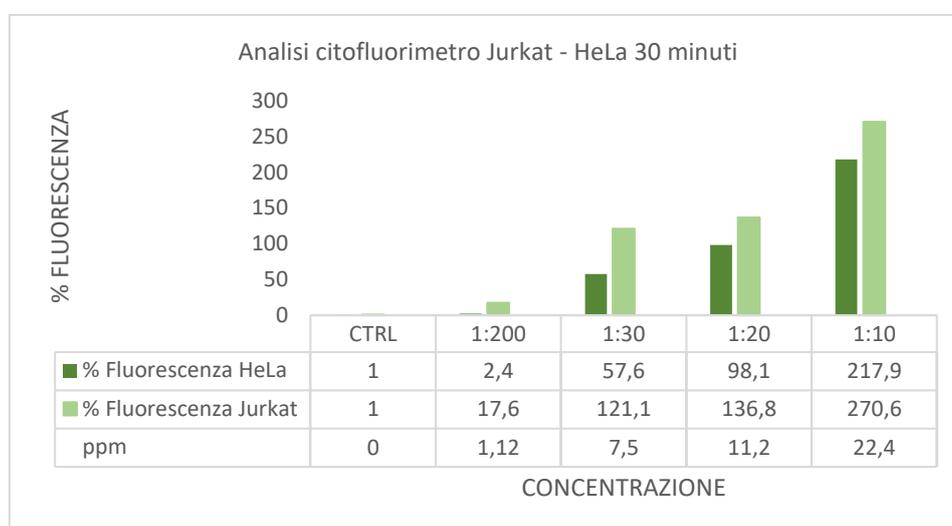


Figura 47: Analisi citofluorimetrica di cellule Jurkat e HeLa incubate per 30 minuti con diverse concentrazioni di FeBNP3X fluorescenti. Le concentrazioni utilizzate sono riportate sia come diluizioni che in ppm calcolati secondo il dosaggio ICP.

Confrontando i dati ottenuti è possibile osservare come, per entrambe le linee cellulari, il livello di interazione sia proporzionale alla concentrazione di nanoparticelle utilizzate, con il livello minimo registrato per concentrazioni di 1:200 e il livello massimo nel caso delle concentrazioni 1:10. Per quanto riguarda il confronto tra i valori ottenuti nelle due diverse linee, è possibile affermare che le cellule Jurkat sembrano interagire con le nanoparticelle in modo più efficace rispetto alle cellule HeLa.

In conclusione, si può dire che, sia nel caso della linea cellulare linfocitaria che nella linea epiteliale, vi è una chiara corrispondenza tra le diluizioni utilizzate e il livello di adesione/internalizzazione ottenuto. Nel caso delle Jurkat, questo risultato ci consente di affermare che i linfociti sono in grado di internalizzare un volume di nanoparticelle che può essere modulato variando le concentrazioni di FeBNP3X, pur mantenendo un tempo

di incubazione breve. Questo è molto importante, considerato il goal finale del progetto complessivo, di cui questa tesi rappresenta la prima fase preliminare. Il progetto, infatti, prevede che linfociti umani, isolati da paziente, siano “caricati” con FeBNP3X per veicolare il boro nei distretti cellulari affetti dal tumore. La possibilità quindi di poter avere un’incubazione breve ma efficace, in termini di nanoparticelle internalizzate, consentirebbe di ridurre i tempi di trattamento e quindi diminuire la possibilità di sofferenza cellulare, prima che i linfociti siano reiniettati nel paziente per svolgere la loro funzione.

#### **2.2.4 Verifica dell’internalizzazione delle nanoparticelle nelle cellule mediante microscopia confocale e microscopio elettronico a trasmissione (TEM)**

L’insieme di tutte le osservazioni descritte fino a questo punto ha permesso di dimostrare che le nanoparticelle, una volta a contatto con le cellule Jurkat o HeLa, sono captate, ma non è ancora possibile affermare con certezza se le FeBNP3X siano effettivamente internalizzate, oppure, se rimangono sulla superficie cellulare. Per verificare ciò ci siamo avvalsi del microscopio confocale e del TEM.

##### **1) Microscopio confocale**

L’analisi mediante microscopia confocale ha permesso di verificare la distribuzione delle FeBNP3X nella cellula e visualizzare tridimensionalmente il campione biologico. Abbiamo utilizzato due fluorocromi: l’Hoechst, per marcare il nucleo delle cellule in esame, ed il Dil (DiIC18(3)), per marcare le nanoparticelle FeBNP3X. Successivamente, a seconda delle sezioni ottiche prese in esame e della loro sovrapposizione, abbiamo ricostruito la distribuzione delle nanoparticelle a diversi tempi di incubazione e concentrazioni.

I risultati ottenuti della visualizzazione delle cellule al microscopio sono di seguito riportati (Figura dalla 48 alla 53).

Analizzando le cellule dopo *30 minuti* di incubazione e *30 minuti* seguiti da *+ 24 ore* aggiuntive in assenza di FeBNP, si osserva un cambiamento nella distribuzione delle nanoparticelle. Le nanoparticelle che, al termine dell’incubazione di *30 minuti* (Figura 48), erano distribuite principalmente a livello della membrana, vengono successivamente internalizzate e concentrate in più spots intensamente fluorescenti (Figura 49).

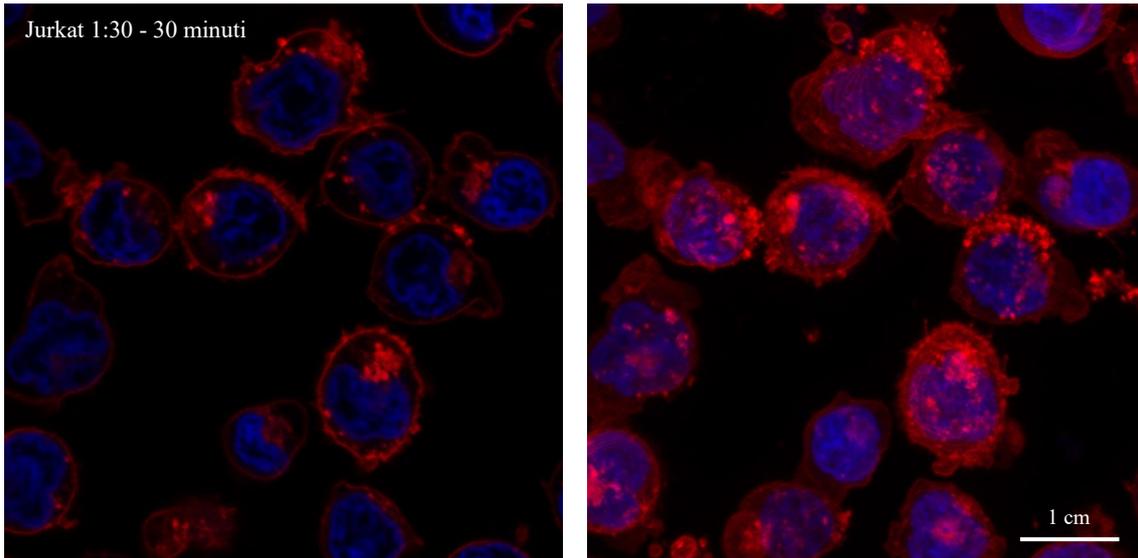


Figura 48: Analisi mediante microscopia confocale a fluorescenza di cellule Jurkat incubate per 30 minuti con FeBNP3X fluorescenti (1:30). A sinistra, singolo piano confocale (10/21). A destra, sovrapposizione di tutti i singoli piani (21).

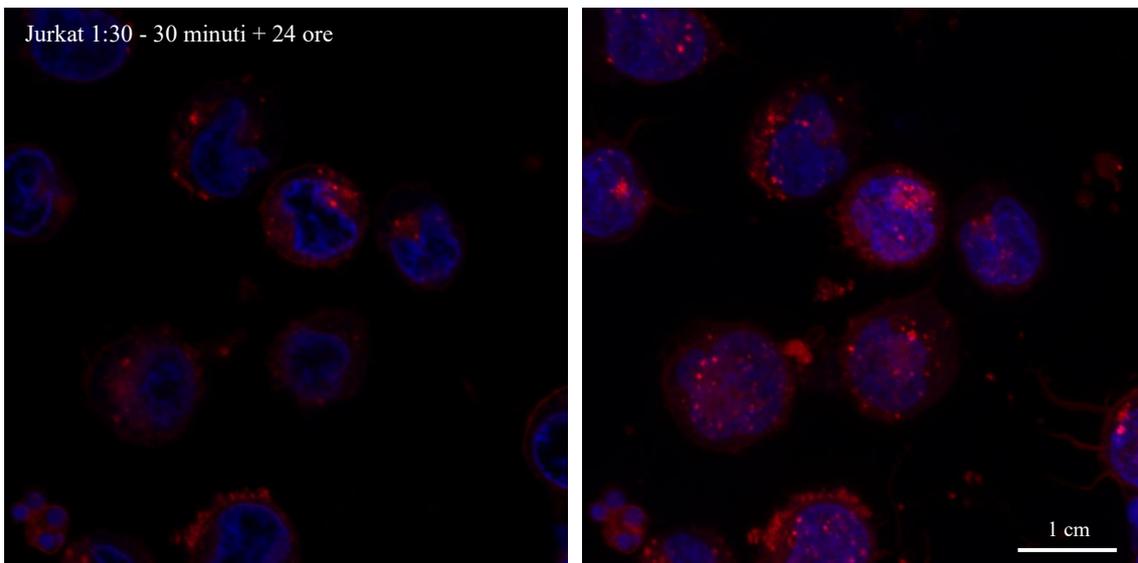


Figura 49: Analisi mediante microscopia confocale a fluorescenza di cellule Jurkat incubate per 30 minuti + 24 ore con FeBNP3X fluorescenti (1:30). A sinistra, singolo piano confocale (6/18). A destra, sovrapposizione di tutti i singoli piani (18).

Nel caso di incubazioni più lunghe di 24 e 48 ore, il livello di internalizzazione delle FeBNP aumenta come dimostrato dall'incremento del numero e della densità degli spots visibili (Figura 50 e 51).

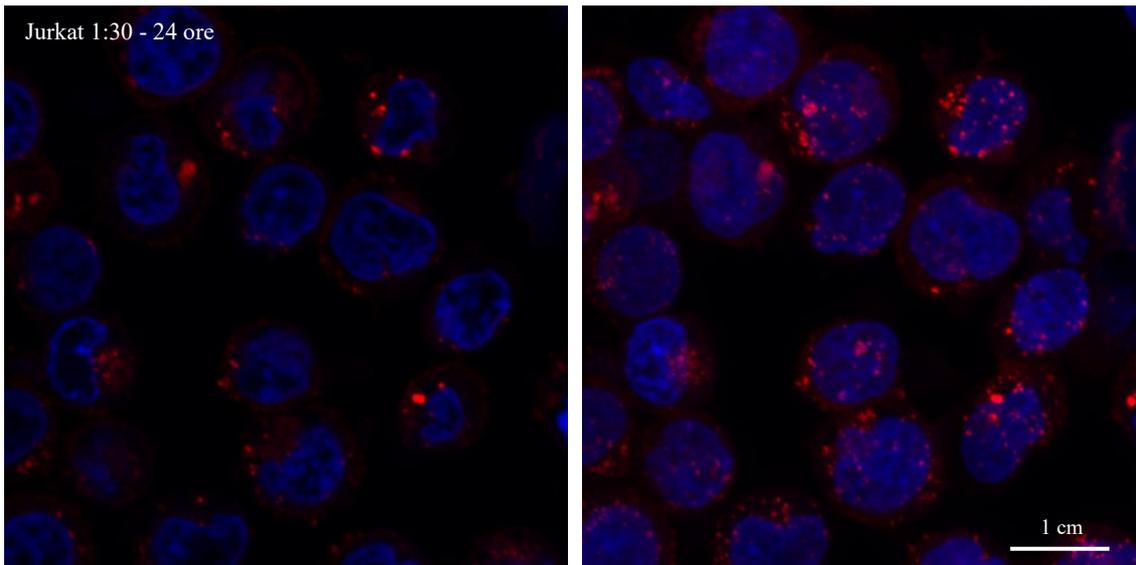


Figura 50: Analisi mediante microscopia confocale a fluorescenza di cellule Jurkat incubate per 24 ore con FeBNP3X fluorescenti (1:30). A sinistra, singolo piano confocale (6/16). A destra, sovrapposizione di tutti i singoli piani (16).

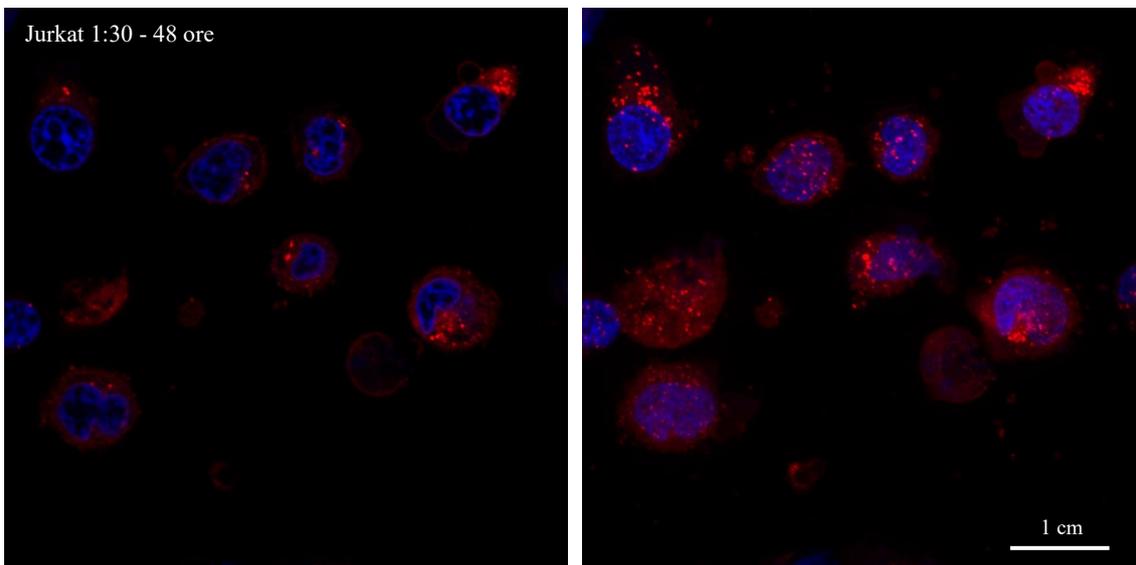


Figura 51: Analisi mediante microscopia confocale a fluorescenza di cellule Jurkat incubate per 48 ore con FeBNP3X fluorescenti (1:30). A sinistra, singolo piano confocale (6/20). A destra, sovrapposizione di tutti i singoli piani (20).

Allo stesso modo sono state analizzate al microscopio confocale le cellule HeLa. In questo caso sono state considerate due diverse diluizioni di FeBNP (1:100 e 1:10) e stesso tempo di incubazione (30 minuti). Dalle immagini in (Figura 52 e 53), si può notare come all'aumentare della concentrazione corrisponda un aumento del numero di nanoparticelle associate a ciascuna cellula.

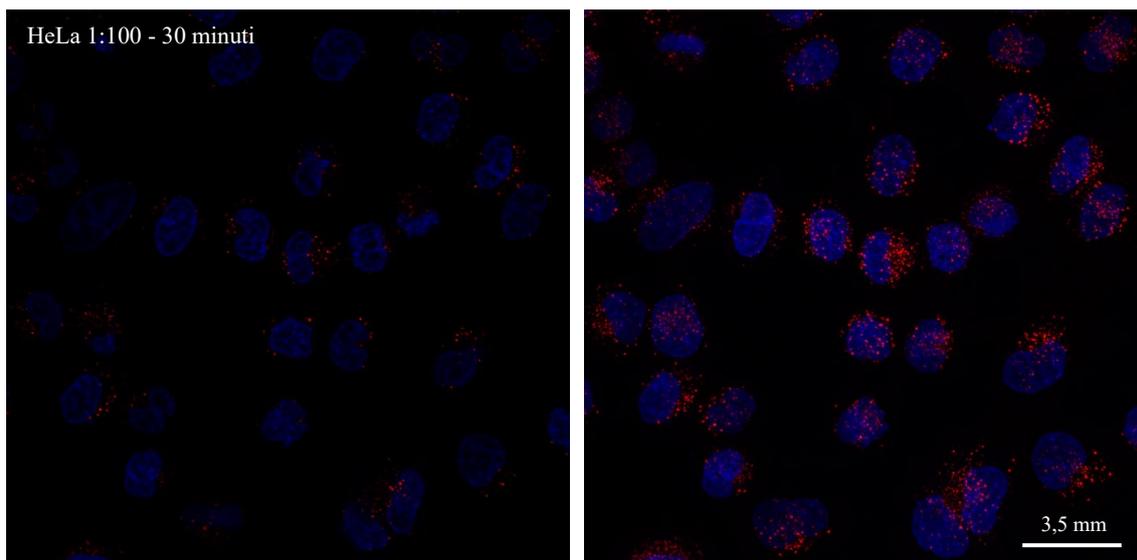


Figura 52: Analisi mediante microscopia confocale a fluorescenza di cellule HeLa incubate per 30 minuti con FeBNP3X fluorescenti (1:100). A sinistra, singolo piano confocale (13/30). A destra, sovrapposizione di tutti i singoli piani (30).

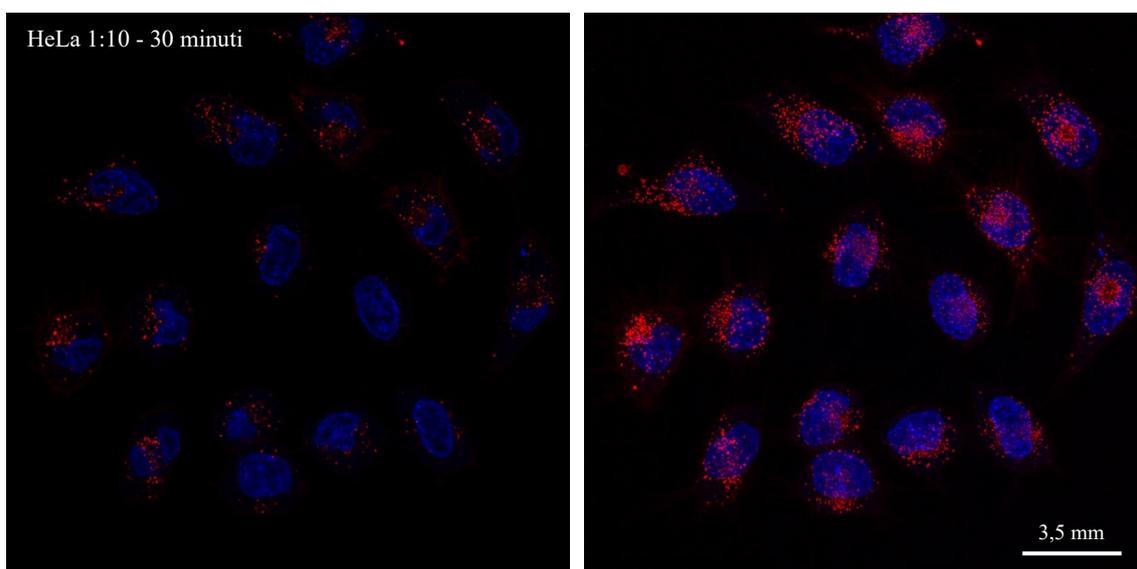


Figura 53: Analisi mediante microscopia confocale a fluorescenza di cellule HeLa incubate per 30 minuti con FeBNP3X fluorescenti (1:10). A sinistra, singolo piano confocale (6/24). A destra, sovrapposizione di tutti i singoli piani (24).

Mediante questa analisi è possibile quindi concludere, per entrambe le linee cellulari, che 1) le nanoparticelle vengono effettivamente internalizzate e 2) all'aumentare dei tempi di incubazione, si osserva una differente distribuzione con aumento dell'internalizzazione.

## 2) Microscopio elettronico a trasmissione (TEM)

Sebbene l'osservazione al microscopio confocale abbia evidenziato la presenza delle FeBNP3X all'interno delle cellule di entrambe le linee, un'analisi al TEM può fornire maggiori informazioni riguardo la loro localizzazione intracellulare nonché il meccanismo di internalizzazione.

Per questo studio ci si è focalizzati su cellule Jurkat incubate 30 minuti e 2 ore con nanoparticelle FeBNP3X diluite 1:30 in terreno fino ad una concentrazione pari a 7.4 ppm di ferro. L'analisi ha rivelato che le FeBNP3X si distribuiscono sulla superficie della cellula (Figura 54) confermando quanto evidenziato, in precedenza, al confocale. E' stato possibile, inoltre, osservare che il numero di nanoparticelle adese alla membrana cellulare cresce con l'aumentare del tempo di incubazione (Figura 57). Dalle immagini si può inoltre vedere come le nanoparticelle vengono internalizzate, confermando che l'uptake avviene, come nel caso di altri tipi di nanoparticelle, attraverso la via endocitotica. In (Figura 55, 56 e 58) si vede chiaramente che nel punto di adesione cellulare delle FeBNP3X si forma un affossamento della membrana plasmatica tipica della fase iniziale della formazione della vescicola endosomiale seguita dalla riorganizzazione della curvatura della membrana per invaginazione e maturazione della vescicola stessa. Infine, notiamo la scissione e il rilascio della vescicola che permette la veicolazione delle nanoparticelle all'interno del citoplasma. In particolare, notiamo la presenza di FeBNP3X libere nel citosol e all'interno dei lisosomi, autofagosomi, endosomi e vescicole intracellulari.

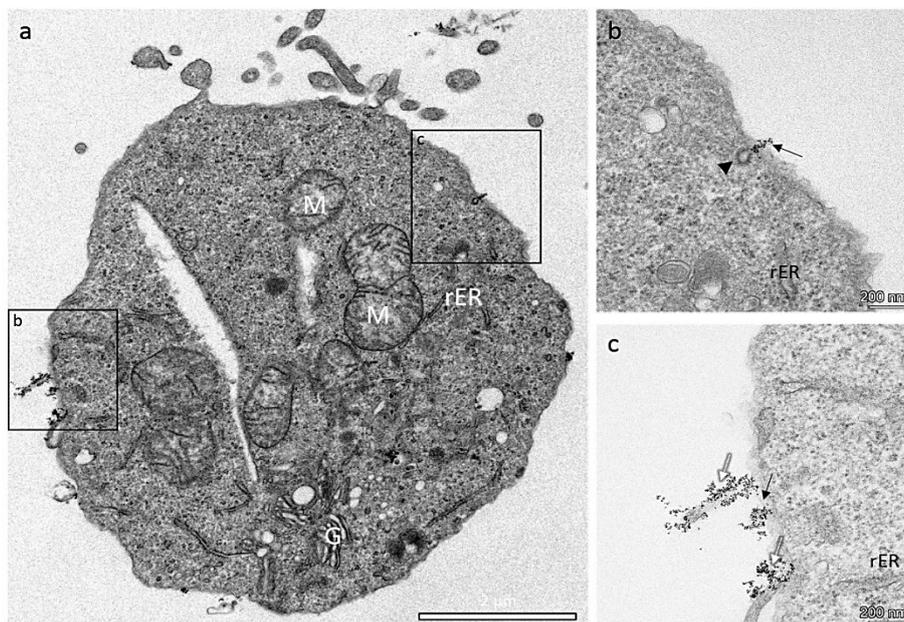


Figura 54: Immagini TEM di cellule Jurkat trattate con FeBNP per 30 minuti. Nella singola cellula (a) è possibile osservare la distribuzione delle nanoparticelle sulla membrana plasmatica. L'ingrandimento (b) mostra l'internalizzazione dei Fe-BNP (freccia) attraverso fossette rivestite di clatrina (punte di freccia). Nell'ingrandimento (c) si nota la presenza delle nanoparticelle (freccia) adese su prolungamenti cellulari (freccie bianche). rER=reticolo endoplasmatico rugoso, M=mitochondrio, G=Golgi.

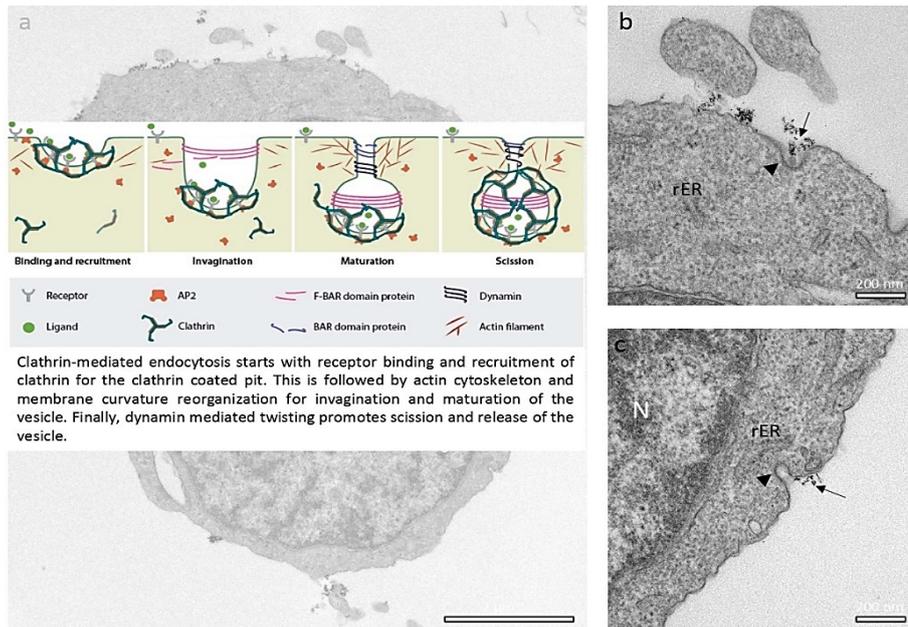


Figura 55: Immagini TEM di cellule Jurkat trattate con FeBNP per 30 minuti. L'immagine (a) mostra l'endocitosi clatrina-dipendente. Nell'ingrandimento (b-c) si nota la presenza delle nanoparticelle (freccia che mostrano l'internalizzazione dei Fe-BNP attraverso fosse rivestite di clatrina (punte di freccia nere), rER=reticolo endoplasmatico rugoso, N=nucleo

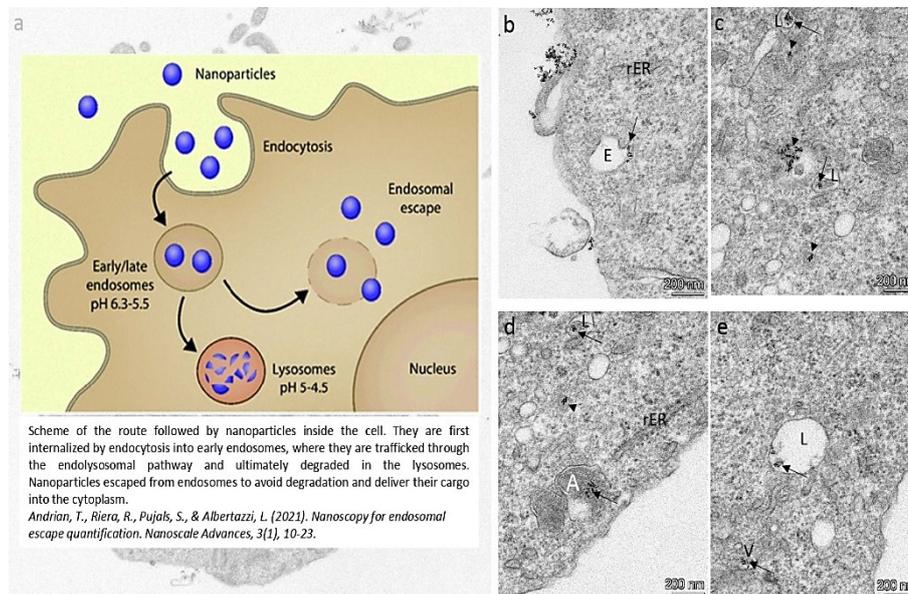


Figura 56: Immagini TEM di una cellula Jurkat trattata con FeBNP per 30 minuti. Le nanoparticelle sono presenti in organelli intracellulari morfologicamente distinti. (b-e) Presenza di Fe-BNP libere nel citoplasma (punte di freccia) e all'interno dei lisosomi (L), autofagosoma (A), endosoma (E) e vescicole intracellulari (V) rER=reticolo endoplasmatico rugoso, M=mitocondri, G=apparato di Golgi.

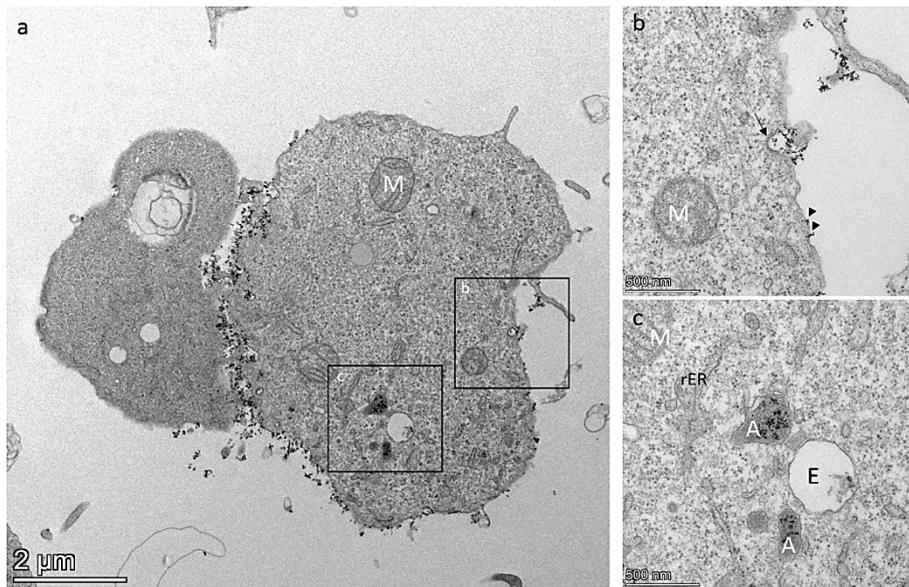


Figura 57: Immagini TEM di cellule Jurkat trattate con Fe-BNP per 2 ore. (b-c) Gli ingrandimenti mostrano l'interazione delle nanoparticelle con la membrana plasmatica (punte di freccia), l'internalizzazione attraverso la formazione di fossette rivestite di clatrina (freccia) e la presenza all'interno di autofagosomi (A) e endosomi (E). rER=reticolo endoplasmatico rugoso, M=mitocondri, N=nucleo.

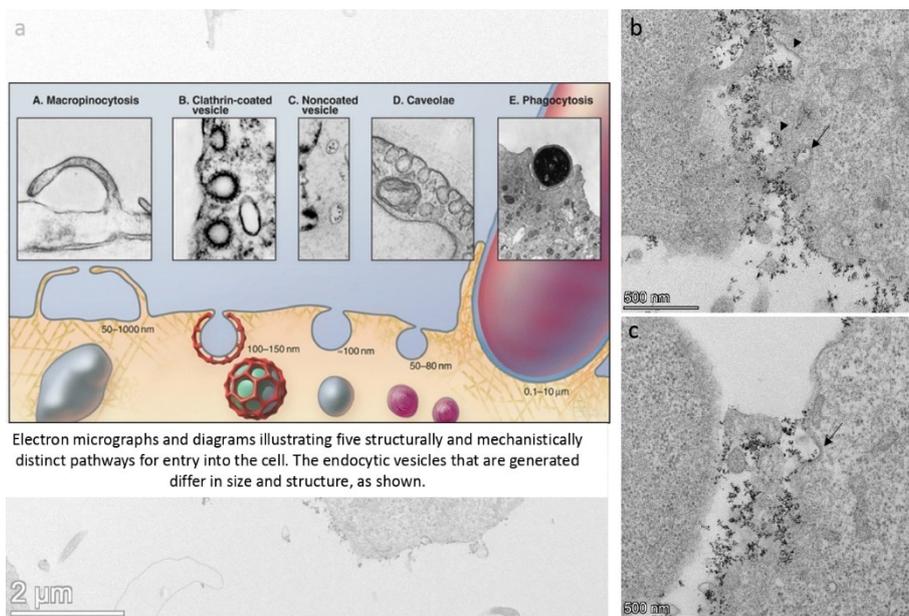


Figura 58: Immagini TEM di cellule Jurkat trattate con Fe-BNP per 2 ore. (b-c) Ingrandimento delle cellule Jurkat trattate con Fe-BNP per 2 ore che mostrano l'internalizzazione dei Fe-BNP attraverso fossette/vescicole rivestite di clatrina (freccia) e fagocitosi (punte di freccia). M=mitocondri.

A seguito dei risultati ottenuti possiamo quindi affermare che le nanoparticelle sono effettivamente internalizzate dalle cellule grazie, prevalentemente, al meccanismo di endocitosi mediata da clatrina (CME) seguita dalla formazione di invaginazioni rivestite di clatrina responsabili dell'endocitosi del nanomateriale.

Possiamo quindi effettuare la quantificazione totale del boro captato dalle cellule (sia adeso sulla superficie che internalizzato) mediante ICP ed irraggiamento dei campioni.

## 2.2.5 Quantificazione del boro internalizzato

Il boro associato alle cellule è stato quantificato mediante ICP ed irraggiamento neutronico. Mentre il primo è una quantificazione con metodo chimico, il secondo quantifica la concentrazione di  $^{10}\text{B}$  e ne valuta la distribuzione nel campione sulla base delle particelle secondarie prodotte dall'irraggiamento neutronico in seguito alla reazione di cattura.

### 1) Quantificazione del carburo di boro in cellule Jurkat (ICP)

Per valutare la captazione delle FeBNP da parte delle cellule e verificare che l'analisi ICP-OES (Spettrometria di Emissione Ottica) per il dosaggio del boro fosse applicabile anche in presenza di una matrice cellulare, si è misurata la concentrazione del boro in campioni di cellule precedentemente incubate con le nanoparticelle. A tale scopo, 6 milioni di cellule Jurkat sono state incubate per 2 ore a 37 °C al 5 %  $\text{CO}_2$  con FeBNP1X in diluizione 1:30 su 10 ml di sospensione cellulare (330  $\mu\text{l}$  di FeBNP1X). In seguito, le cellule sono state centrifugate e lavate con PBS, così come da protocollo (Capitolo 1; paragrafo 1.2). Infine, è stato possibile quantificare il contenuto di boro nei nanomateriali presenti sulla superficie delle cellule o internalizzati.

L'analisi ICP ha rivelato che la concentrazione di boro risultata essere stata captata dalle cellule incubate per 2 ore con FeBNP1X, è pari a 0.35  $\mu\text{g B}$  / 1 milione di cellule. Questo valore è stato ottenuto come media di tre misure effettuate su tre campioni differenti. È stato dunque possibile calcolare la concentrazione internalizzata dalle cellule, considerando che ogni campione era composto da 6 milioni di cellule, il cui peso bagnato è pari a 8 mg.

$$\frac{\mu\text{g}}{\text{miln cells}} \cdot \text{numero di cells} = \mu\text{g B assoluti}$$

$$\frac{0,35 \mu\text{g}}{\text{miln cells}} \cdot 6 \text{ miln} = 2,1 \mu\text{g}$$

$$\frac{\mu g \text{ assoluti}}{\text{peso cellule}} = \frac{2,1 \mu g}{0,008 g} = 262,5 \frac{\mu g}{g} B$$

Di conseguenza, le concentrazioni di boro totale e di  $^{10}\text{B}$  captate dalle cellule in 2 ore di incubazione sono rispettivamente pari a 262 ppm ( $\mu\text{g/g}$  tessuto) e 52.5 ppm. Nonostante l'uptake di  $^{10}\text{B}$  sia pari al 7 % del  $^{10}\text{B}$  aggiunto nel mezzo di coltura, la concentrazione di  $^{10}\text{B}$  ottenuta è molto maggiore della dose minima richiesta affinché siano osservati effetti terapeutici in BNCT<sup>2</sup>. Inoltre, la concentrazione utilizzata non ha mostrato effetti citotossici e la dose ottenuta potrebbe aumentare a partire da nanomateriali arricchiti in  $^{10}\text{B}$ . Questi dati sono molto incoraggianti, poiché, considerando che le nanoparticelle utilizzate possiedono boro naturale, potendo lavorare con nanoparticelle con boro arricchito, la concentrazione di  $^{10}\text{B}$  sarebbe 5 volte più alta.

## 2) Quantificazione del carburo di boro in cellule HeLa (ICP)

Per valutare la captazione delle FeBNP da parte delle cellule HeLa, è stato misurato il contenuto di  $^{10}\text{B}$  tramite ICP-OES (Spettrometria di Emissione Ottica), seguendo un protocollo simile a quello adottato per la quantificazione dell'uptake nelle cellule Jurkat. A tale scopo, le cellule sono state seminate in fiasche T25 con densità  $6 \cdot 10^5$  cellule / ml, e incubate a 37 °C overnight. Il giorno successivo, le cellule sono state incubate con FeBNP3X per 30 minuti e 2 ore. Contestualmente, sono state contate le cellule nella fiasca di controllo, che 24 ore dopo la semina aveva una densità di cellule pari a  $1,2 \cdot 10^6$  cellule / ml. Al termine dell'incubazione, il terreno è stato eliminato, e a seguito di due lavaggi con 10 ml di PBS ciascuno, sono stati aggiunti 0.9 ml di tripsina. Al termine dell'incubazione con tripsina, le cellule sono state risospese in terreno (5 ml) e centrifugate a 160 g per 5 minuti. Il surnatante è stato eliminato, e il pellet è stato risospeso in 1 ml di PBS.

L'analisi ICP ha rivelato che la concentrazione di boro captata dalle HeLa incubate con FeBNP3X è pari a 25 ppm di  $^{10}\text{B}$  dopo 30 minuti di incubazione e 50 ppm di  $^{10}\text{B}$  dopo 2 ore. Questo valore è stato ottenuto come media di tre esperimenti differenti. È stato dunque possibile calcolare la concentrazione associata alle cellule considerando che ogni campione era composto da  $21 \cdot 10^6$  cellule, il cui peso bagnato è pari a 28 mg.

### 3) Autoradiografia neutronica in cellule Jurkat e HeLa

Le misure della concentrazione di boro presente all'interno delle cellule trattate sono state visualizzate anche tramite autoradiografia neutronica con irraggiamento presso il reattore nucleare del L.E.N.A. L'autoradiografia neutronica consente altresì di ottenere immagini della biodistribuzione del boro. In particolare, cellule HeLa e cellule Jurkat sono trattate in esperimenti in doppio con FeBNP3X a diverse concentrazioni (1:5; 1:10 e 1:30) e per diversi tempi di incubazione (30 minuti e 2 ore). I campioni biologici pellettati a secco su dischetti di mylar (Capitolo 1, paragrafo 1.10) sono irraggiati a contatto con rivelatori passivi CR39 nella colonna termica del TRIGA. I dati ottenuti hanno dato un riscontro quantitativo e qualitativo a seconda della potenza del reattore (che definisce la fluenza neutronica assorbita dai campioni) e del protocollo di sviluppo adoperati.

Le immagini qualitative riportate (Figura 59 e 60) sono simboliche di uno degli esperimenti condotti in doppio. Le regioni con colorazione più intensa corrispondono a campioni con maggiore concentrazione di boro. Le immagini acquisite vengono confrontate con quelle ottenute con campioni di calibrazione contenenti concentrazioni note di  $^{10}\text{B}$  corrispondenti a 10; 20; 50 e 100 ppm.

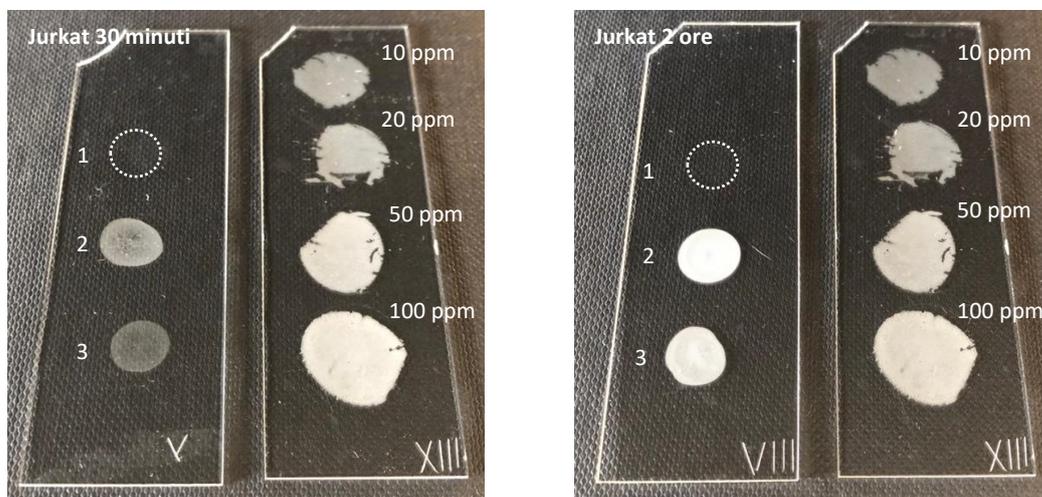


Figura 59 Risultato su CR-39 dell'irraggiamento neutronico dei campioni di cellule Jurkat. A sinistra cellule incubate per 30 minuti con FeBNP3X alle diluizioni di CTRL (1), 1:5 (2) e 1:10 (3) a confronto con la curva di taratura. A destra cellule Jurkat incubate per 2 ore con FeBNP3X diluite CTRL (1), 1:5 (2) e 1:10 (3) a confronto con la curva di taratura, cellule di controllo non incubate con nanoparticelle (XIII).

Dalle immagini ottenute si evince che, per entrambe le linee cellulari, i campioni hanno assorbito concentrazioni di boro crescenti rispetto alla dose somministrata. In particolare, le immagini delle cellule Jurkat, a 30 minuti, sono paragonabili a quelle dei campioni di

calibrazione contenenti 10/ 20 ppm di  $^{10}\text{B}$ , mentre le cellule Jurkat, a 2 ore, sono paragonabili a quelle dei campioni di calibrazione contenenti 50/100 ppm di  $^{10}\text{B}$

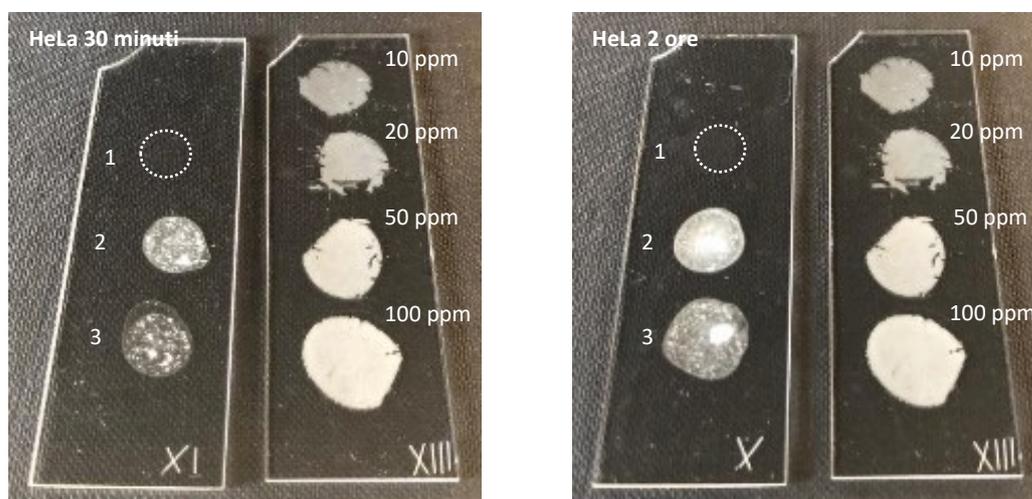


Figura 60: Risultato su CR-39 dell'irraggiamento neutronico dei campioni di cellule HeLa. A sinistra cellule incubate per 30 minuti con FeBNP3X alle diluizioni di CTRL (1), 1:5 (2) e 1:10 (3) a confronto con la curva di taratura. A destra cellule Jurkat incubate per 2 ore con FeBNP3X diluite CTRL (1), 1:5 (2) e 1:10 (3) a confronto con la curva di taratura, cellule di controllo non incubate con nanoparticelle (XIII).

Anche nel caso delle HeLa, dalle figure si osserva che la quantità di nanoparticelle composite associate alle cellule ha prodotto immagini nel CR39. Queste risultano essere, a 30 minuti, paragonabili alle immagini dei campioni di calibrazione contenenti 20/50 ppm di  $^{10}\text{B}$ , mentre le immagini a 2 ore, sono paragonabili ai campioni di calibrazione contenenti 50/100 ppm di  $^{10}\text{B}$ .

Gli stessi campioni sono irraggiati nuovamente a bassa potenza del reattore per 30 minuti per ottenere informazioni tipo quantitativo ed analizzate mediante *script* scritto in linguaggio *Python* (Figura 61 e 62). I dati sono stati organizzati in un *database* e derivano dalla media risultate degli esperimenti condotti in doppio. L'errore associato a ciascun valore di concentrazione è pari a una deviazione standard ed è dovuto alla variabilità nell'assorbimento del boro da parte delle cellule nello stesso campione. Questi dati sono da considerarsi preliminari in quanto analisi più approfondite sono tuttora in corso.

<i>Jurkat 30 minuti</i>		Ppm	<i>Jurkat 2 ore</i>		ppm
PBS		1.0	PBS		1.0
CTRL		1.0	CTRL		1.0
1:5		84,9	1:5		125
1:10		48,45	1:10		79
1:30		14,55	1:30		20,6

Figura 61: Risultati preliminari di cellule Jurkat incubate 30 minuti (a destra) e 2 ore (a sinistra) a seguito di 40 immagini consecutive scattate ed analizzate mediante script scritto in linguaggio Python

<i>HeLa 30 minuti</i>		ppm	<i>HeLa 2 ore</i>		ppm
PBS		1.0	PBS		1.0
CTRL		1.0	CTRL		1.0
1:5		23,3	1:5		130,9
1:10		18,65	1:10		46,95
1:30		1.0	1:30		2,15

Figura 62: Risultati preliminari di cellule HeLa incubate 30 minuti (a destra) e 2 ore (a sinistra) a seguito di 40 immagini consecutive scattate ed analizzate mediante script scritto in linguaggio Python

In entrambi i casi, i risultati conseguiti sono in gran parte coerenti ai risultati qualitativi. Notiamo, inoltre, a conferma dei risultati precedentemente acquisiti, che la concentrazione di boro aumenta con l'aumento delle concentrazioni di FeBNP utilizzate per l'incubazione.

Per concludere, confrontiamo i ppm del  $^{10}\text{B}$  in cellule Jurkat e in cellule HeLa (2 ore) ottenuti sia con la quantificazione chimica ICP che con la quantificazione tramite autoradiografia neutronica (Figura 63).

<i>Campioni</i>	<b>Irraggiamento (ppm)</b>	<b>ICP (ppm)</b>
<i>HeLa 1:30</i>	2,15	50
<i>Jurkat 1:30</i>	20,6	52,5

Figura 63: ppm di  $^{10}\text{B}$  ottenute con autoradiografia neutronica e ICP

Dai risultati riportati è possibile osservare che le concentrazioni di  $^{10}\text{B}$  ottenute con le due diverse tecniche non sono confrontabili. Le differenze potrebbero essere legate sia alla variabilità nell' internalizzazione durante esperimenti diversi che al diverso metodo di quantificazione del  $^{10}\text{B}$ . Considerata l'elevata sensibilità dell'ICP, è possibile che sia necessario ottimizzare il metodo di quantificazione tramite autoradiografia neutronica. In futuro, saranno svolti esperimenti a partire dallo stesso *batch* di cellule, di cui una parte sarà destinata all'analisi tramite autoradiografia, e l'altra all'analisi ICP.

In questo modo, si potrà escludere la differenza dovuta alla variabilità nell'internalizzazione delle FeBNP. Ciononostante, in entrambi i casi, le concentrazioni medie ottenute per grammo di tessuto corrispondono a valori pari o superiori alla dose minima terapeutica richiesta in BNCT pari a  $25\text{-}30\ \mu\text{g}\ ^{10}\text{B}/\text{g}$  di tumore ( $\sim 10^9$  atomi/cellula).

# CAPITOLO 3

---

## CONSIDERAZIONI FINALI E PROSPETTIVE FUTURE

Questa tesi rappresenta la prima fase di un progetto molto più ampio ed ambizioso che ha come obiettivo finale la veicolazione di nanoparticelle ricche in boro (FeBNP) mediante cellule, nel trattamento dei tumori con BNCT. Il progetto prevede che linfociti umani, in particolare TIL (linfociti infiltranti il tumore), isolati da paziente oncologico e successivamente espansi, vengano “caricati” con FeBNP prima di essere nuovamente iniettati nel paziente. Grazie al riconoscimento tra TIL e cellule tumorali, si dovrebbe ottenere il delivery specifico del boro, contenuto nelle cellule immunitarie in prossimità della zona target che si intende colpire. A seguito poi di un irraggiamento con neutroni, il boro, contenuto nei (soli) linfociti caricati con FeBNP e distribuiti nel tumore, sarà in grado di causare danni letali alle cellule tumorali preservando i tessuti sani circostanti.

Utilizzando le cellule come veicolo di nanoparticelle ferro-borate si possono ottenere diversi vantaggi:

1. Aumento della concentrazione intracellulare di boro rispetto a quella realizzabile con le tecniche attualmente in uso, che prevedono la somministrazione sistemica di molecole borate;
2. Capacità di somministrare molto boro in vitro permettendo di diminuire notevolmente le quantità somministrate al paziente, con conseguente riduzione dei possibili effetti collaterali;
3. Riduzione del tempo di preparazione del paziente: le molecole borate utilizzate attualmente in clinica, richiedono la somministrazione di grandi volumi di soluzioni e quindi anche di lunghi tempi prima dell'irraggiamento (circa due ore);
4. Protezione del boro internalizzato nelle cellule durante la circolazione ematica con riduzione degli effetti di diluizione e/o inattivazione;

5. Specificità del *delivery*, che assicura un rapporto di concentrazione cellule tumorali/cellule sane estremamente elevato, poiché il boro sarebbe presente solo nei TIL e non in altre cellule sane;
6. Ulteriore affinamento nella specificità del *delivery*, assicurato dal fatto che solo i TIL presenti nella zona da colpire sarebbero sacrificati durante l'irraggiamento, mentre gli altri, ancora circolanti, verrebbero risparmiati per poter svolgere successivamente la loro funzione o, comunque, per essere naturalmente "persi".

In questo progetto si è svolto il lavoro preliminare di sintesi delle nanoparticelle composite ricche in boro, di valutazione dell'interazione dei linfociti con le nanoparticelle e della loro internalizzazione senza alterazione della vitalità.

I risultati ottenuti utilizzando la linea linfocitaria immortalizzata hanno dimostrato, con l'uso di più tecniche, sia qualitative che quantitative, che i linfociti potrebbero funzionare da "cavallo di Troia" per il trasporto delle nanoparticelle di boro.

L'analisi dose di somministrazione-concentrazione assorbita, infatti, nel caso della vitalità ha dimostrato che le cellule possono essere incubate con concentrazioni alte di nanoparticelle (1:10) senza che venga indotto un effetto tossico. Incubazioni prolungate (1-3 giorni) non hanno alterato la vitalità, che si è sempre tenuta su valori alti. Si sono, per di più, ottenuti ottimi risultati anche utilizzando concentrazioni intermedie (1:30) e tempi di incubazione brevi (30 minuti).

Questi risultati sono da considerarsi molto incoraggianti. Isolando da pazienti oncologici i linfociti e caricandoli di FeBNP, infatti, si potrebbe riuscire ad effettuare un trattamento con basse concentrazioni di boro somministrate e tempi brevi di incubazione cellule-nanoparticelle, utilizzate per l'esposizione. I linfociti così potenziati, ri-iniettati nel paziente possono assicurare un'alta probabilità di successo. Anche la valutazione della quantità di boro, internalizzata nelle stesse condizioni, mediante ICP, ha dato risultati molto promettenti se comparata alla dose minima necessaria, pari a 25-30  $\mu\text{g } ^{10}\text{B/g}$  di tumore ( $\sim 10^9$  atomi/cellula). L'*imaging* del boro ottenuto mediante la tecnica nucleare dell'autoradiografia neutronica ha mostrato omogeneità di distribuzione del boro nei campioni cellulari e ha confermato il livello di *uptake* ottenuto.

Un'analisi preliminare, utilizzando linfociti isolati da pazienti, è già stata avviata grazie alla collaborazione con il centro oncologico Istituto Romagnolo per lo Studio dei Tumori "Dino Amadori" - IRST IRCCS, di Meldola (FC).

Come inizio della realizzazione delle nuove prospettive, i linfociti CD8+ sono stati incubati per tempi brevi (30 minuti) con diverse concentrazioni di FeBNP3X (1:10, 1:20, 1:40 e 1:80), scelte nel range delle diluizioni testate in precedenza sulle cellule della linea linfocitaria Jurkat (Figura 64).

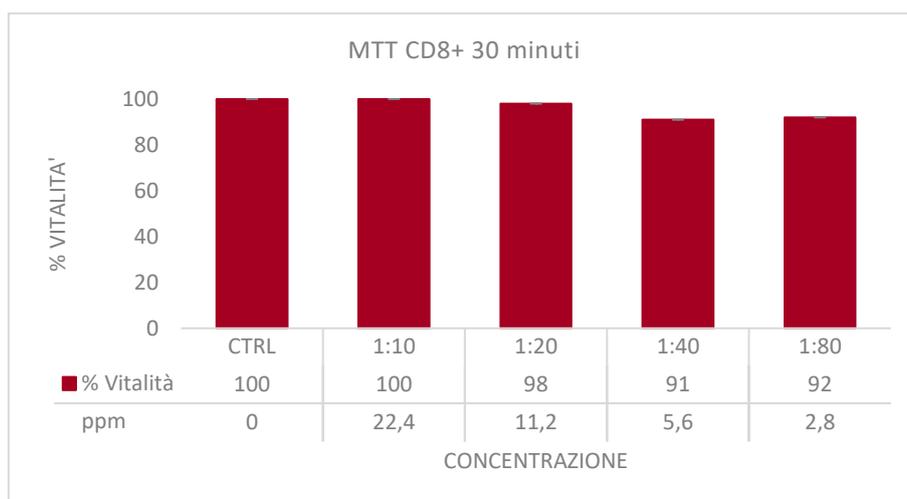


Figura 64: Vitalità cellulare in cellule CD8+ trattate con diverse concentrazioni di FeBNP per 30 minuti. Le concentrazioni utilizzate sono riportate sia come diluizioni che in ppm calcolati secondo il dosaggio ICP.

Anche in questo caso, le FeBNP3X non sono risultate avere un effetto tossico, poiché la vitalità registrata si è sempre mantenuta su valori pari al 100 %.

Mediante l'analisi SEM, è stata poi verificata l'effettiva capacità delle nanoparticelle di interagire con le cellule. Come mostrano le immagini in (Figura 65, 66 e 67), le FeBNP3X si legano, infatti, alla superficie di questi linfociti in modo del tutto simile a quanto osservato per le cellule Jurkat.

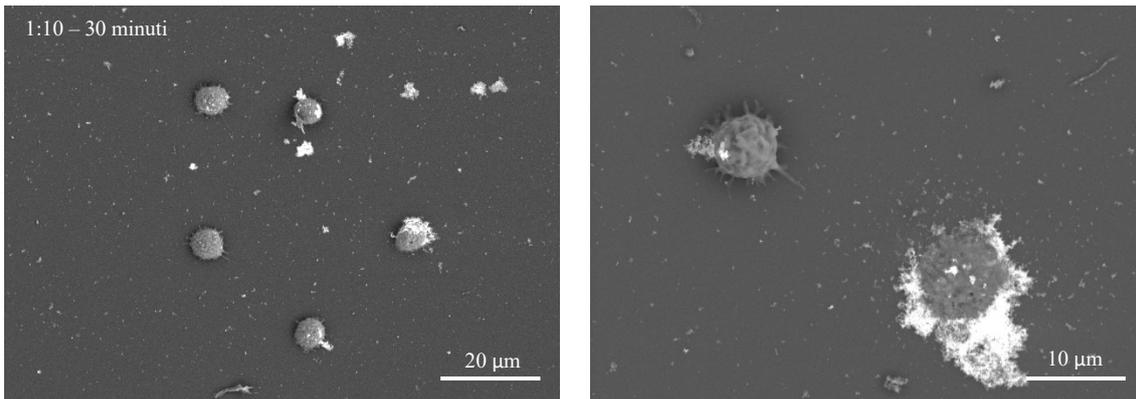


Figura 65: Immagini SEM di cellule CD8+ incubate con FeBNP3X (1:10) per 30 minuti. Detctor BSE, SEM HV: 5.0 kv.

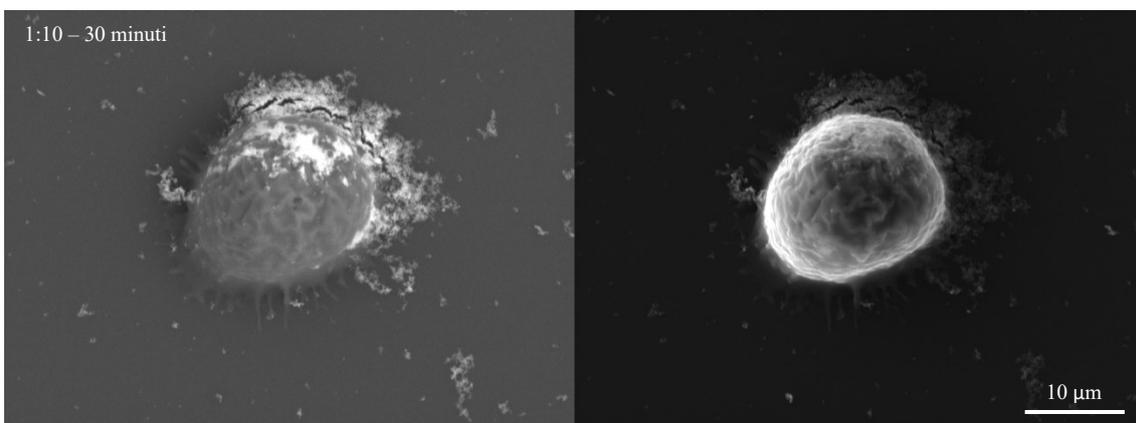


Figura 66: Immagini SEM di cellule CD8+ incubate con FeBNP3X (1:10) per 30 minuti. Detctor BSE (a sinistra); Dectror SE (a destra). SEM HV: 5.0 kv.

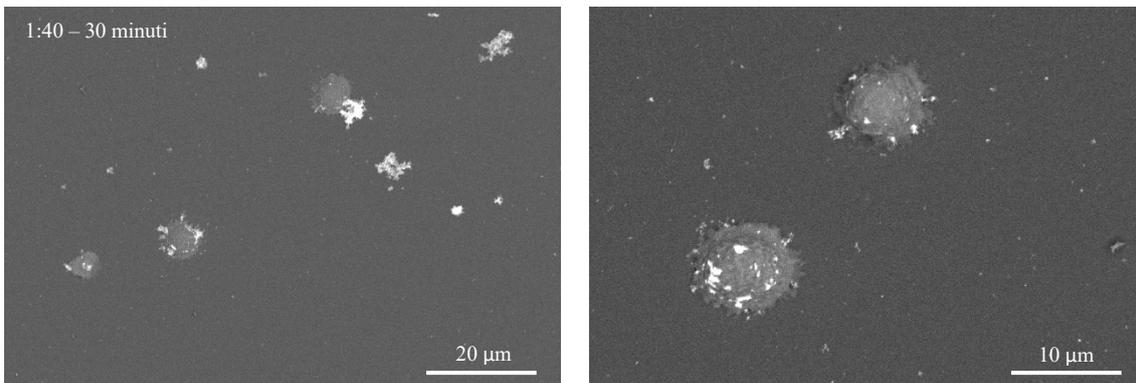


Figura 67: Immagini SEM di cellule CD8+ incubate con FeBNP3X (1:40) per 30 minuti. Detctor BSE, SEM HV: 5.0 kv.

Conseguentemente, si ritiene che, anche nel caso di queste cellule isolate da paziente, l'internalizzazione del boro avvenga come mostrato per le Jurkat. Tuttavia, per verificare l'effettivo accumulo intracellulare delle nanoparticelle, saranno necessarie analisi TEM e di microscopia confocale.

In conclusione, dati gli incoraggianti risultati ottenuti, si può considerare questo progetto come trampolino di lancio per lo sviluppo di nuove prospettive lavorative. L'elevata selettività della BNCT (*Boron Neutron Capture Therapy*) basata sulla biodistribuzione del boro piuttosto che sul campo di irraggiamento, e l'utilizzo di linfociti umani come specifici veicolo di boro verso cellule tumorali, possono rendere questo nuovo approccio una potente opzione per il trattamento di tumori.

# BIBLIOGRAFIA

---

1. Bortolussi, S.; Postuma, I.; Protti, N.; Provenzano, L.; Ferrari, C.; Cansolino, L.; Dionigi, P.; Galasso, O.; Gasparini, G.; Altieri, S.; et al. Understanding the Potentiality of Accelerator Based-Boron Neutron Capture Therapy for Osteosarcoma: Dosimetry Assessment Based on 138 the Reported Clinical Experience. *Radiat. Oncol.* 2017, 12 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13014-017-0860-6>.
2. Barth, R. F.; Mi, P.; Yang, W. Boron Delivery Agents for Neutron Capture Therapy of Cancer. *Cancer Commun.* 2018, 38 (1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40880-018-0299-7>.
3. Kyoto University 2-1010, Asashiro-Nishi, Kumatori-cho, Sennan-gun, Osaka 590-0494 JAPAN. Japanese Society of Neutron Capture Therapy. <http://www.pref.osaka.lg.jp/kikaku/bnct/>
4. De Jong, Wim H., and Paul JA Borm. "Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards." *International journal of nanomedicine* 3.2 (2008): 133-149.
5. Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin Pharmacol Ther.* 2008 May;83(5):761-9. doi: 10.1038/sj.clpt.6100400. Epub 2007 Oct 24. PMID: 17957183.
6. Tesi di Laurea Magistrale di Maria Paola Demichelis Matricola 483920, Relatore: Prof. Umberto Anselmi Tamburini: Sintesi e caratterizzazione di nanomateriali compositi per la terapia a cattura neutronica. Università Degli Studi di Pavia, Dipartimento di Chimica. Anno Accademico 2020 / 2021
7. Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2021

Feb;20(2):101-124. doi: 10.1038/s41573-020-0090-8. Epub 2020 Dec 4. PMID: 33277608; PMCID: PMC7717100.

8. Kawthar Bouchemal. New challenges for pharmaceutical formulations and drug delivery systems characterization using isothermal titration calorimetry. *Drug Discovery Today*. Volume 13, Issues 21–22. 2008, Pages 960-972, ISSN 1359-6446, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.06.004>.  
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644608002158>)
9. Fleischer, C. C.; Payne, C. K. Nanoparticle-Cell Interactions: Molecular Structure of the Protein Corona and Cellular Outcomes. *Acc. Chem. Res.* 2014, 47 (8), 2651–2659. <https://doi.org/10.1021/ar500190q>.
10. Lane, L. A.; Qian, X.; Smith, A. M.; Nie, S. Physical Chemistry of Nanomedicine: Understanding the Complex Behaviors of Nanoparticles in Vivo. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2015, 66 (1), 521–547. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-040513-103718>.
11. Bruce M. Koeppen, Tullio Manzoni, Bruce A. Stanton, Giuseppe Spidalieri; *Fisiologia di Berne e Levy*, 26 maggio 2009; Edizione 6; Editore CEA 2010; ISBN 8808182746, 9788808182746
12. Varma S, Dey S, Palanisamy D. Cellular Uptake Pathways of Nanoparticles: Process of Endocytosis and Factors Affecting their Fate. *Curr Pharm Biotechnol.* 2022;23(5):679-706. doi: 10.2174/1389201022666210714145356. PMID: 34264182.
13. Means N, Elechalawar CK, Chen WR, Bhattacharya R, Mukherjee P. Revealing macropinocytosis using nanoparticles. *Mol Aspects Med.* 2022 Feb;83:100993. doi: 10.1016/j.mam.2021.100993. Epub 2021 Jul 16. PMID: 34281720; PMCID: PMC8761201.
14. Foroozandeh, P.; Aziz, A. A. Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* 2018, 13. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2728-6>.

15. James F. Leary. Fundamentals of Nanomedicine. Cambridge University 2022. DOI: 10.1017/9781139012898
16. Centro di Biotecnologie. <http://www.centrodibiotecnologie.org/>.
17. ATCC. <https://www.atcc.org/>.
18. REF: Santra, S.; Kaittanis, C.; Grimm, J.; Perez, J. M. Drug/Dye-Loaded, Multifunctional Iron Oxide Nanoparticles for Combined Targeted Cancer Therapy and Dual Optical/Magnetic Resonance Imaging. *Small* 2009, 5 (16), 1862–1868]
19. Science photo libray. <https://www.sciencephoto.com/media/994898/view>
20. Science photo libray. <https://www.sciencephoto.com/media/1286808/view>
21. Il saggio MTT per la vitalità cellulare; 6 OTTOBRE 2022; <https://cellculture.altervista.org/cell-viability-assay-mtt/>
22. [https://www.cdl.it/210-large\\_default/burker-sp-std.jpg](https://www.cdl.it/210-large_default/burker-sp-std.jpg)
23. [https://chinchillalife.com/wp-content/uploads/2021/11/f1d0b3673450998f12a9a6ba6fb023ad\\_1622622194\\_3206-2.png](https://chinchillalife.com/wp-content/uploads/2021/11/f1d0b3673450998f12a9a6ba6fb023ad_1622622194_3206-2.png)
24. Federico Caicci PhD; Microsoft PowerPoint - presentazione.pptx; 01/03/19; [https://www.medicinadimed.unipd.it/sites/medicinadimed.unipd.it/files/Caicci%20F\\_Microscopia%20a%20fluorescenza%20e%20confocale.pdf](https://www.medicinadimed.unipd.it/sites/medicinadimed.unipd.it/files/Caicci%20F_Microscopia%20a%20fluorescenza%20e%20confocale.pdf)
25. Confocal and Two-Photon Microscopy. Foundations, Applications, and Advances, A. Diaspro, ed; Wiley-Liss (2002).
26. <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=16401543>, By Crenim - Own work, CC0.

27. Brown M, Wittwer C, Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology, *Clinical Chemistry* 46:8(B) 1221–1229 (2000). Available online: <http://clinchem.aaccjnls.org/content/46/8/1221>
28. Secolo, M.; Vita, D. I.; Reattore, D. E. L.; Mark, T.; Di, I. I. E.; Didattica, S. E.; Laboratorio, D. E. L.; Nucleare, E.; Lena, A.; Università, D.; et al. E DI ATTIVITÀ SCIENTIFICA E DIDATTICA. 2014, No. January.
29. [Bariblock per la schermatura del canale del reattore nucleare TRIGA MARK II | Articoli | Ingenio](https://www.ingenio-web.it/articoli/bariblock-per-la-schermatura-del-canale-del-reattore-nucleare-triga-mark-ii/). 09.07.2019; <https://www.ingenio-web.it/articoli/bariblock-per-la-schermatura-del-canale-del-reattore-nucleare-triga-mark-ii/>
30. S.Bortolussi, J.G.Bakeine, F.Ballarini, P.Bruschi, M.A.Gadan, N.Protti, S. Stella, A.Clerici, C.Ferrari, L.Cansolino, C.Zonta, A.Zonta, R.Nano and S.Altieri, “Boron uptake measurements in a rat model for Boron Neutron Capture Therapy of lung tumours”, *Appl. Rad. Isot.*, 69 (2011) 394–398
31. Postuma Ian; A neutron autoradiography method to measure  $^{10}\text{B}$  in biological samples applied to BNCT of osteosarcoma; TY - THES; 2012/02/29; DO - 10.13140/RG.2.1.1534.4802

# RINGRAZIAMENTI

---

Ringrazio il CISRiC (Centro Interdipartimentale di Studi e Ricerche per la Conservazione del patrimonio culturale) dell'Università Degli Studi di Pavia per l'uso del SEM

Ringrazio la Dott.ssa Patrizia Vaghi e la Dott.ssa Amanda Oldani del Centro Grandi Strumenti dell'Università degli Studi di Pavia per l'assistenza al microscopio confocale.

Ringrazio il Dott. Alberto Azzalin del Centro Grandi Strumenti dell'Università degli Studi di Pavia per il supporto nell'utilizzo del citofluorimetro.

Ringrazio il Prof. Andrea Falqui e la Dott.ssa Elena Vezzoli del Dipartimento di Fisica "Aldo Pontremoli" Università degli Studi di Milano per la parte di acquisizione e analisi TEM.

Ringrazio la Dott.ssa Marcella Tazzari del centro oncologico Istituto Romagnolo per lo Studio dei Tumori "Dino Amadori" - IRST IRCCS, di Meldola (FC) per aver fornito le cellule CD8+ e per le future prospettive di questo progetto che saranno possibili grazie alla sua collaborazione.