

2. VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ DI DISPOSITIVI MEDICI NANOSTRUTTURATI A BASE DI NANOPARTICELLE DI ARGENTO

Fabiana Superti, Agostina Pietrantoni, Magda Marchetti, Barbara De Berardis
Centro Nazionale Tecnologie Innovative in Sanità Pubblica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

2.1. Introduzione

La caratterizzazione dei biomateriali e dei Dispositivi Medici (DM) destinati a un contatto con l'organismo a medio e a lungo termine non può essere completa senza una valutazione della risposta biologica attraverso specifici test *in vitro*. Gli standard più comuni per la valutazione biologica dei materiali e dei DM sono definiti dalla famiglia delle norme ISO 10993. La scelta dei test tiene conto di diversi parametri quali: la composizione chimica dei materiali dei DM, le condizioni di esposizione, nonché la natura, la frequenza, la tipologia e la durata del contatto del dispositivo col paziente. Questi test devono essere eseguiti in base a rigide linee guida e preferibilmente in conformità alle buone pratiche di laboratorio (*Good Laboratory Practices*, GLP) (1). Lo scopo è quello di individuare i rischi biologici potenziali prima che il DM venga utilizzato nel paziente. Bisogna comunque tenere presente che le norme ISO 10993 affrontano problematiche connesse alla biocompatibilità e tossicità dei biomateriali tradizionali e non dei materiali nanostrutturati. In questa sezione vengono descritti studi in cui sono applicati i protocolli indicati nelle ISO 10993 ai DM nanostrutturati (DM-NP) con lo scopo di caratterizzare il loro potenziale tossicologico e di supportare l'analisi dei rischi ad essi collegati.

Sono stati presi in esame DM-NP a base di argento (Ag) perché, avendo grandi potenzialità applicative, la loro diffusione è in continua crescita. Infatti, tra le nanoparticelle (NP) già in uso, quelle di argento sono le più utilizzate (superando i nanotubi in carbonio e le nanoparticelle di silicio, diossido di titanio, zinco e oro) tanto che nel 2013 il "Project on Emerging Nanotechnologies" riportò che 383 (quindi quasi un quarto) dei 1628 prodotti di consumo a base di nanoparticelle contenevano AgNP (2). Le AgNP, utilizzate principalmente come antimicrobici, si possono trovare non solo nei dispositivi medici ma anche in un gran numero di prodotti come tessuti, cosmetici, prodotti per l'igiene personale, giocattoli, plastica, prodotti per elettronica, imballaggi per alimenti, vernici, ecc. Poiché l'ingegnerizzazione dell'Ag alla dimensione nano ne amplifica diverse proprietà, in particolare l'attività antimicrobica, nel prossimo futuro si prevede un'ulteriore incremento della diffusione di DM-NP a base di Ag. Risulta quindi particolarmente urgente la messa a punto di protocolli per l'analisi dei rischi biologici associati all'utilizzo di DM-NP a base di Ag.

L'obiettivo principale dell'attività di ricerca è stato quello di acquisire dati utili all'implementazione dei metodi per lo studio della citotossicità *in vitro* di DM nanostrutturati o portatori di nanostrutture (DM-NP) al fine di ottimizzare le procedure per la valutazione della loro sicurezza.

2.2. Tossicità *in vitro* di dispositivi medici contenenti nanomateriali

Sono state selezionate due diverse tipologie di DM-NP ad attività antimicrobica: argento colloidale (DM-NP 1), che richiede un'esposizione ripetuta, e cerotto a base di argento nanocristallino (DM-NP 2), che prevede un'esposizione continua e prolungata. I due DM-NP selezionati, con tipi di esposizione differente, necessitano anche di un'analisi *in vitro* secondo modalità diverse (saggio diretto e saggio in seguito a estrazione) fornendo, di conseguenza, maggiori informazioni per la messa a punto dei test di citotossicità.

Poiché i due DM-NP selezionati presentavano un diametro medio delle nanoparticelle pari a 27,49 nm (DM-NP 1) e 16 nm (DM-NP 2), come nanoparticelle di controllo sono state utilizzate particelle di Ag di dimensione primaria di 20 nm e purezza del 99,9% (AgNM20). Le nanoparticelle di riferimento sono state scelte seguendo quanto indicato nel 2015 dal Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENHIR) in "Guidance on the determination of potential health effects of nanomaterials used in medical devices" (3). Il documento dello SCENHIR prevede infatti che venga testato *in vitro* anche un NM con le stesse proprietà dell'NM utilizzato nel DM-NP.

Il DM-NP 1, argento colloidale, è un efficace antibiotico naturale dalle innumerevoli proprietà essendo indicato per curare infezioni non solo di origine batterica ma anche da parassiti, funghi e virus (Figura 1). Questo DM, utilizzato anche per attenuare allergie e infiammazioni, è un rimedio che viene direttamente dal passato (l'uso dell'argento nella cura delle ferite risale ai tempi di Ippocrate) e che è stato riscoperto recentemente.

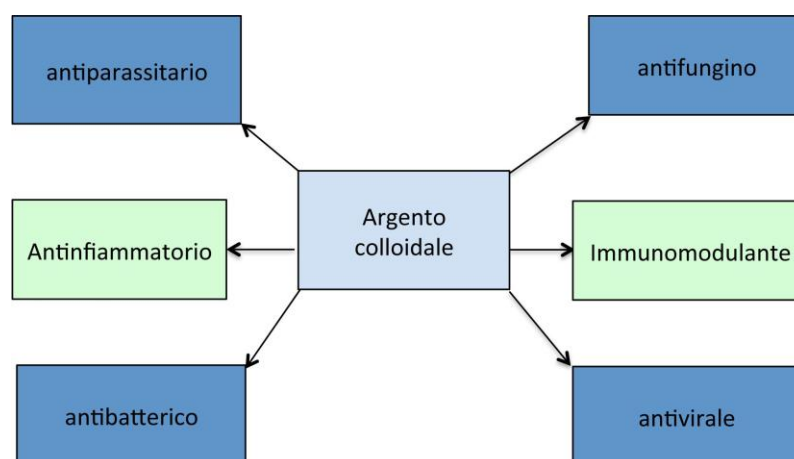


Figura 1. Proprietà dell'argento colloidale

L'argento colloidale viene utilizzato sotto forma di lavanda per curare le infezioni delle mucose, per uso topico per trattare dermatiti, o disinfettare ferite, sotto forma di gargarismi per la cura del cavo orale, come aerosol per curare le infezioni respiratorie, come collirio per curare infezioni della congiuntiva e in generale dell'occhio, per instillazione per la cura di infezioni dell'orecchio. Se una striscia di garza (o altro materiale) viene immersa in una soluzione di argento colloidale, le particelle di argento nanocristallino si assorbono su una o entrambe le superfici esterne della medicazione (Figura 2).

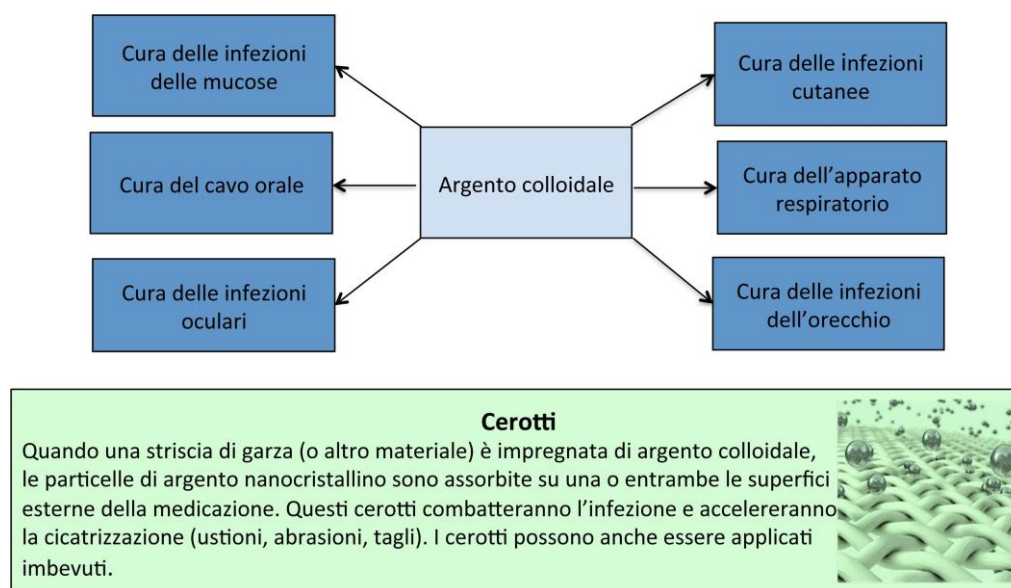


Figura 2. Applicazioni dell'argento colloidale

Poiché è stato osservato che in questa forma l'argento colloidale risulta più efficace sia nel ridurre i tempi di cicatrizzazione (ustioni, abrasioni, tagli) che nell'esercitare l'attività antimicrobica, sono stati ideati "cerotti nanostrutturati". Il DM-NP 2, cerotto nanostrutturato, è costituito da tre strati: uno strato centrale assorbente interposto a due strati esterni di polietilene non aderente rivestiti di argento nanocristallino (Figura 3). L'argento in forma nano offre un'ampia superficie per l'attività di scambio garantendo una elevata reattività. Si ritiene infatti che la struttura dei nanocristalli sia responsabile dell'azione più rapida e di lunga durata dell'argento, rispetto all'argento in forma non nano.

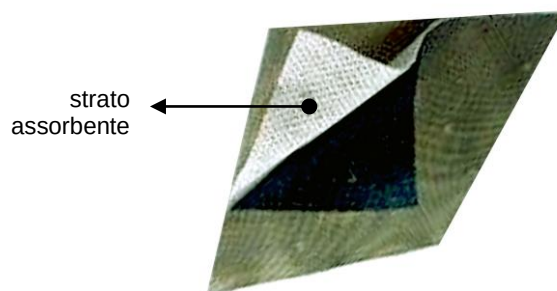


Figura 3. Cerotto nanostrutturato

Per quanto riguarda il modello cellulare, sulla base delle indicazioni riportate sulle norme UNI EN ISO 10993-5:2009 (4) circa le linee cellulari da utilizzare per i test di citotossicità dei dispositivi medici, per i nostri saggi sono state scelte le cellule Vero (ATCC® CCL-81™). Questa linea cellulare, isolata il 27 marzo 1962 da Yasumura e Kawakita presso l'Università di Chiba in Giappone, deriva da cellule epiteliali renali di una scimmia verde africana (*Chlorocebus* spp., precedentemente chiamata *Cercopithecus aethiops*) (5). Le cellule Vero trovano impiego in diversi settori della microbiologia quali: screening per le tossine batteriche, studi di

adesione/invasione batterica, isolamento di virus, sviluppo di vaccini, ecc. La scelta è stata fatta quindi in base al campo di utilizzo dei DM in esame (prevalentemente antimicrobico) e non alle sedi di applicazione che sono, invece, estremamente eterogenee.

2.2.1. Cellule

Le cellule Vero sono state coltivate alla temperatura di 37°C, in presenza di CO₂ al 5%, in terreno Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose (DMEM-HG) (Sigma Aldrich) contenente L-glutamina (2 mM), penicillina (100 UI/mL), streptomicina (100 µg/mL) e siero fetale bovino (SFB) inattivato al 10% (6). Per i test di citotossicità sono state utilizzate piastre da 96 pozzetti (Falcon, Fisher Scientific, Rodano, Milano). Sono stati eseguiti test preliminari per stabilire la concentrazione delle cellule da seminare per ottenere una coltura sub-confluente (70-80%) dopo 24 h.

2.2.2. DM-NP e NP di controllo

I DM-NP coinvolti nello studio e le NP di controllo hanno le seguenti caratteristiche:

- *DM-NP 1 Argento colloidale oggetto di studio*
Il 71,5% del volume totale delle nanoparticelle d'argento (AgNP) presenta un diametro medio pari a 27,49 nm.
- *DM-NP 2 Cerotto nanostrutturato oggetto di studio*
È presente uno strato di Ag nanocristallino su entrambi i lati del DM a una concentrazione tra 0,69 e 1,64 mg/cm² (7, 8), secondo i dati in letteratura la dimensione media dei nanocristalli è circa di 16 nm (9).
- *AgNM20-NP di controllo - Nanoparticelle di riferimento*
Ha una purezza del 99,9% e una dimensione primaria di 20 nm.

2.2.3. Metodo di preparazione del campione

Il DM-NP 1 e il DM-NP 2, prevedendo un tipo di esposizione differente, necessitano di un'analisi *in vitro* secondo modalità diverse: saggio diretto e in seguito a estrazione (Figura 4).



Figura 4. Test di citotossicità: saggio diretto e in seguito a estrazione

2.2.4. Test colorimetrici

Per la valutazione della citotossicità di DM-NP e AgNM20 (materiale di riferimento), precedentemente caratterizzati, sono stati scelti due saggi colorimetrici: il saggio del Rosso Neutro e il test MTT (3,(4,5-dimethylthiazol-2)2,5 difeniltetrazolium bromide), in accordo con quanto raccomandato nella norma UNI EN ISO 10993-5:2009(E) (4).

2.2.4.1. Saggio del Rosso Neutro

Il saggio si basa sulla capacità del colorante Rosso Neutro di accumularsi nei lisosomi mediante un trasporto attivo che necessita dell'integrità delle membrane cellulari. La soluzione madre di Rosso Neutro (0,4 g di Rosso Neutro; 100 mL H₂O) è stata conservata a temperatura ambiente al buio. La soluzione di lavoro utilizzata, 50 µg/mL di Rosso Neutro in terreno, è stata centrifugata (600 g, 10 min) o filtrata per rimuovere eventuali cristalli prima dell'uso. Le cellule sono state lavate in PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4, 0,15 mL/pozzetto) e incubate con una soluzione di Rosso Neutro (50 µg/mL) in terreno (0,1 mL/pozzetto) per 3 h a 37°C. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate in PBS (0,15 mL/pozzetto), il tampone è stato poi decantato e i pozzetti sono stati asciugati su carta bibula. Il colorante è stato estratto aggiungendo a ogni pozzetto 0,15 mL di una soluzione di etanolo/acido acetico glaciale (50% alcool etilico, 1% acido acetico glaciale, 49% H₂O) e l'assorbanza del colorante estratto è stata letta a 540 nm in un lettore per piastre (Packard Fusion Microplate Reader).

2.2.4.2. Test MTT

Il test MTT è un saggio colorimetrico standard per misurare l'attività di enzimi mitocondriali che riducono l'MTT a formazano, facendo virare il composto da un colore giallo ad un colore blu-violetto intenso. Il formazano rimane localizzato all'interno dei mitocondri, quindi deve essere solubilizzato ed estratto dalle cellule. Il numero delle cellule vitali è direttamente correlato con l'intensità del colore misurata tramite spettrofotometro dopo dissoluzione del colorante in alcol. La soluzione madre di MTT è 100 mg/mL. La soluzione di lavoro utilizzata, 1 mg/mL di MTT in terreno, è stata sterilizzata attraverso la filtrazione con filtri da 0,22 µm e utilizzata il giorno stesso. Secondo la procedura del test di vitalità cellulare, in ogni pozzetto sono stati depositati 50 µL di una soluzione di MTT 1mg/mL. Dopo un'incubazione per 3 ore a 37°C in un'atmosfera di CO₂ al 5% e satura di umidità, la soluzione di MTT è stata eliminata e la piastra è stata lavata in PBS e incubata 30 min con isopropanolo (solvente di estrazione, 100 µL per pozzetto) a temperatura ambiente e al buio (in quanto l'isopropanolo è un composto fotosensibile). L'intensità della colorazione della soluzione ottenuta, direttamente proporzionale alla concentrazione di formazano, permette di quantificare la vitalità cellulare. La densità ottica (*Optical Density*, OD) è stata misurata spettrofotometricamente a una lunghezza d'onda pari a 570 nm in un lettore per piastre (Packard Fusion Microplate Reader).

2.2.4.3. Controlli interni ai test

Sono stati quindi selezionati alcuni controlli interni ai test: controlli positivi e controlli per valutazione di possibili fenomeni di interferenza: Sodio Lauril Solfato (SLS) utilizzato come controllo positivo del saggio del Rosso Neutro, secondo quanto raccomandato nella norma UNI EN ISO 10993-5:2009 (E) (4), e Staurosporina (10) e SLS come controlli positivi per il test MTT. Dopo aver definito le condizioni ottimali di semina e di coltura (sia per il mantenimento della linea cellulare, sia per l'allestimento dei saggi di vitalità cellulare), è stata determinata la curva dose-risposta del SLS. Ogni 24 h una piastra è stata osservata al microscopio e sottoposta al saggio

di citotossicità, mentre le altre piastre sono state trattate nuovamente con SLS. Dopo 24, 48 o 72 ore di trattamento la vitalità cellulare è stata misurata per mezzo del saggio del Rosso Neutro e del test MTT. Inoltre, per quanto riguarda il test MTT, è stata determinata la curva dose-risposta della Staurosporina. Ogni 24 h una piastra è stata osservata al microscopio e sottoposta al saggio di citotossicità, mentre le altre piastre sono state trattate nuovamente con Staurosporina. Dopo 24, 48 o 72 ore di trattamento la vitalità cellulare è stata misurata per mezzo del test MTT. Sono stati eseguiti altri controlli per escludere la presenza di fenomeni di interferenza tra i campioni da analizzare e i valori di lettura colorimetrica dei diversi test. Per misurare il livello di interferenza delle NP (sia di controllo che nei DM) con le letture dei due test colorimetrici scelti, sono stati aggiunti 100 µL di NP (a diverse concentrazioni in terreno completo) a 3 pozzetti di una piastra da 96 pozzetti e 100µL di terreno completo ad altri 3 pozzetti (controllo). In modo analogo, per misurare il livello di interferenza tra i controlli positivi (SLS o Staurosporina) e le letture dei due test colorimetrici, sono stati aggiunti 100 µL di SLS o Staurosporina (diverse concentrazioni in terreno di coltura) a 3 pozzetti e 100µL di terreno completo ad altri 3 pozzetti (controllo). A seconda del test scelto sono stati quindi aggiunti 20 µL/pozzetto di Rosso Neutro o MTT e, dopo incubazione a 37°C per 1 h, le piastre sono state lette alla lunghezza d'onda di 540 o 570 nm, rispettivamente. Gli esperimenti sono stati condotti in sestuplicato.

2.2.4.4. Analisi dei dati e criteri di accettabilità

Per procedere all'analisi dei dati è stata calcolata: la media dei bianchi (pozzetti senza cellule e non trattati) sottratta al valore di ogni pozzetto; la media dei controlli cellule (pozzetti con le cellule e non trattati); la percentuale di sopravvivenza cellulare per ogni pozzetto secondo la seguente formula:

$$\% \text{ sopravvivenza cellulare} = \frac{\text{valore di assorbanza} \times 100\%}{\text{media dei controlli cellule}}$$

Per ogni diluizione sono stati mediati i valori della sopravvivenza cellulare delle repliche e calcolata la deviazione standard. Per considerare valido il test sono stati valutati i seguenti parametri: i) assenza di interferenza tra NP (o controlli positivi) e colorante utilizzato nel test (saggio del Rosso Neutro o test MTT); ii) vitalità delle cellule usate > 90%; iii) coefficiente di variazione (CV) della media dei pozzetti del bianco (pozzetti senza cellule e non trattati), espresso secondo la seguente formula:

$$CV = \frac{\text{deviazione standard}}{\text{media aritmetica}} \times 100$$

che deve risultare inferiore al 30% (il coefficiente di variazione della media delle repliche è inferiore al 30% quando il valore di assorbanza è > 0,1); iv) i valori di assorbanza della media dei controlli di interferenza (NP o controlli positivi in terreno e in assenza di cellule) che devono avere una differenza inferiore al 15% rispetto alla media del bianco; v) diluizioni di SLS o Staurosporina utilizzate che, almeno in una condizione sperimentale, devono determinare un valore di sopravvivenza cellulare < 70%.

2.2.5. DM-NP 1: test di citotossicità (saggio diretto)

Il test si è svolto con questa modalità:

– GIORNO 1

Semina delle cellule nelle piastre da 96 pozzetti: 1×10^4 cellule/pozzetto in 0,2 mL di DMEM-HG, addizionato con il 10% di SFB inattivato, contenente L-glutammina (2 mM), penicillina (100 UI/mL) e streptomicina (100 µg/mL). È stata preparata una

piastra per ogni condizione. Prima della semina un'aliquota della sospensione cellulare è stata colorata con il trypan blue e ne è stata misurata la vitalità. In tutti gli esperimenti la vitalità delle cellule è risultata maggiore del 90% e quindi corrispondente ai criteri di accettabilità che saranno descritti in seguito. Dopo 24 h le cellule sono state osservate al microscopio ottico per la valutazione della morfologia e dello stato di confluenza. In ogni saggio sono stati utilizzati come controlli interni SLS alla concentrazione di 80 µg/mL o Staurosporina 4 µM. Come controllo negativo è stato utilizzato terreno di coltura senza siero DMEM-HG contenente L-glutamina (2 mM), penicillina (100 UI/mL) e streptomycin (100 µg/mL). In tutti gli esperimenti contemporaneamente al DM-NP 1 è stato testato anche il nanomateriale di riferimento (AgNM20).

– GIORNO 2

Trattamento dei pozzetti con Ag colloidale (DM-NP 1) e Ag di controllo in forma nano (AgNM20). Sono state preparate 4 diluizioni di Ag colloidale in terreno di coltura senza siero (5, 4, 3, 2,5 µg/mL) e 100 µL di ogni preparazione sono stati aggiunti a ogni pozzetto. Per ogni condizione sperimentale sono stati utilizzati minimo tre pozzetti. Ogni esperimento è stato condotto in sestuplicato. Dopo l'aggiunta dei campioni, le cellule sono state incubate a 37°C. Contemporaneamente l'AgNM20 di controllo è stato risospeso in terreno di coltura senza siero e disperso mediante un sonificatore a ultrasuoni a sonda per 30 min. L'AgNM20 è stato diluito alle stesse concentrazioni del DM-NP 1 (5, 4, 3, 2,5 µg/mL). I campioni sono stati sonicati nuovamente per 30 min. prima di essere aggiunti alle cellule (100 µL/pozzetto). Per ogni condizione sperimentale sono stati utilizzati minimo tre pozzetti. Ogni esperimento è stato condotto in sestuplicato. Per verificare l'eventuale interferenza dell'Ag colloidale o delle particelle di controllo con le procedure del saggio colorimetrico, è stato eseguito in parallelo il trattamento di pozzetti privi di cellule con DM-NP 1 o AgNM20, che sono stati incubati e processati in maniera analoga ai pozzetti contenenti le cellule.

– GIORNI 3-5

Ogni 24 h una piastra è stata osservata al microscopio e sottoposta al saggio di citotossicità, mentre le altre piastre sono state sottoposte nuovamente al trattamento con il DM-NP 1 o con le particelle di controllo. Dopo 24, 48 o 72 ore di trattamento la vitalità cellulare è stata misurata per mezzo del saggio del Rosso Neutro o del test MTT.

2.2.6. DM-NP 2: test di citotossicità (saggio previa estrazione)

La citotossicità del DM-NP 2 (DM non invasivo "surface-contacting") è stata valutata seguendo i protocolli descritti nella norma UNI EN ISO 10993- Part 5 (4) and UNI EN ISO 10993- Part 12 (Sample preparation) (11). Il test si è svolto con questa modalità:

– GIORNO 1

Un cerotto integro è stato posto in una piastra di Petri (10 cm di diametro), ricoperto da 8,3 mL di terreno DMEM-HG addizionato con L-glutamina (2 mM), penicillina (100 UI/mL) e streptomycin (100 µg/mL) e incubato a 37°C in presenza di CO₂ al 5%. Parallelamente le AgNM20 sono state incubate a 37°C in presenza di CO₂ al 5%.

– GIORNO 3

Le cellule sono state seminate nelle piastre da 96 pozzetti: 1 x 10⁴ cellule/pozzetto in 0,2 mL di mezzo di coltura completo (DMEM-HG addizionato con il 10% di SFB inattivato, 2 mM glutamina, 100 UI/mL di penicillina e 100 µg/mL di streptomycin).

– GIORNO 4

Le cellule sono state osservate al microscopio ottico per la valutazione della morfologia e dello stato di confluenza. Per la valutazione della tossicità delle Ag NP rilasciate dal cerotto nanostrutturato, è stato raccolto il terreno in cui era stato incubato (per 72 h) il DM-NP 2. Le cellule, trattate con diverse diluizioni (con fattore 4) dell'estratto, con diverse concentrazioni delle AgNM20 di controllo, con SLS alla concentrazione di 80 µg/mL (controllo positivo per il saggio del Rosso Neutro) o con Staurosporina 4 µM (controllo positivo per il test MTT) o con il terreno (controllo negativo), sono state incubate per 24 h alla temperatura di 37°C in presenza di CO₂ al 5%. I campioni, estratto del DM-NP 2 e AgNM20 di controllo, sono stati risospesi in terreno di coltura senza siero e dispersi mediante un sonicatore a ultrasuoni a sonda per 30 min prima di essere aggiunti alle cellule (100 µL/pozzetto). Partendo dall'ipotesi che il DM-NP 2 abbia rilasciato tutto l'Ag in esso contenuto (500 µg/mL), l'AgNM20 di controllo è stato utilizzato alle seguenti concentrazioni: 500, 125, 31,5, 7,81, 1,95, 0,488 e 0,122 µg/mL. Per ogni condizione sperimentale sono stati utilizzati minimo tre pozzetti. Ogni esperimento è stato condotto in sestuplicato. Per verificare l'eventuale interferenza dell'Ag presente nell'estratto o delle particelle di controllo con le procedure del saggio colorimetrico è stato eseguito in parallelo il trattamento di pozzetti privi di cellule con l'estratto del DM-NP 2 o l'AgNM20 di controllo, che sono stati incubati e processati in maniera analoga ai pozzetti contenenti le cellule come precedentemente descritto.

– GIORNO 5

La vitalità cellulare è stata misurata per mezzo del saggio del Rosso Neutro o del test MTT come precedentemente descritto.

2.2.7. Valutazione morfologica della citotossicità: microscopia elettronica a scansione

Per visualizzare le interazioni del DM-NP 1, dell'estratto del DM-NP 2 o delle AgNM20 con le cellule e valutare le eventuali modificazioni morfologiche, i campioni trattati nelle varie condizioni sperimentali sono stati analizzati tramite FESEM. Le cellule sono state fissate in glutaraldeide (2,5%), post-fissate in tetrossido di osmio (1%), disidratate e ricoperte da un film sottile di Au. I campioni sono stati analizzati attraverso microscopia elettronica a scansione a emissione di campo munita di spettrometria a raggi X a dispersione di energia (*Field Emission Scanning Electron Microscopy/Energy Dispersive X-ray Analysis*, FESEM/EDX) utilizzando un microscopio QuantaTM 650 FEG (FEI company). Le micrografie sono state acquisite a 30kV (12).

2.2.8. Valutazione delle interazioni tra DM-NP 1, estratto di DM-NP 2 o di AgNM20 e cellule tramite microscopia elettronica a trasmissione

Per meglio caratterizzare le interazioni del DM-NP 1, dell'estratto del DM-NP 2 o delle AgNM20 con le cellule a livello ultrastrutturale, i campioni, dopo trattamento nelle varie condizioni sperimentali, sono stati analizzati per mezzo della microscopia elettronica a trasmissione (*Transmission Electron Microscopy*, TEM).

Le cellule sono state prima fissate in glutaraldeide (2,5%), post-fissate in tetrossido di osmio (1%) e disidratati attraverso una serie di soluzioni a percentuale crescente di etanolo. Una volta disidratati i campioni sono stati prima inclusi in resina epossidica e quindi tagliati in sezioni ultrasottili che sono poi state raccolte su retini di rame e contrastate come descritto precedentemente (13). L'osservazione è stata eseguita utilizzando un TEM FEI 208s.

2.3. Risultati degli studi *in vitro*

2.3.1. Test di citotossicità (controlli)

Sono stati utilizzati l'SLS come controllo positivo per il saggio del Rosso Neutro e per il test MTT e la Staurosporina come controllo positivo per il test MTT. I risultati della tossicità del SLS dopo 24, 48 (24+24 h) o 72 (24+24+24 h) ore di trattamento sono riportati in Figura 5 per il saggio del Rosso Neutro e Figura 6 per il test MTT.

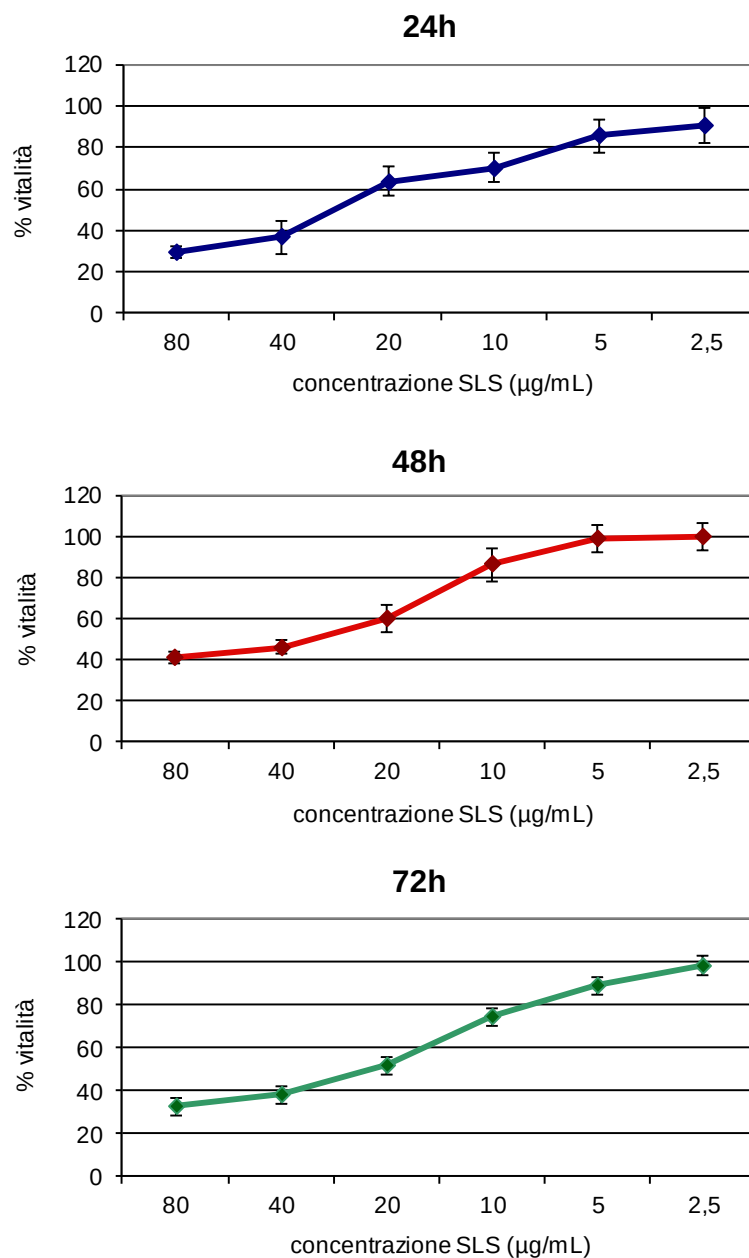


Figura 5. Curva dose-risposta dell'SLS misurata con il saggio del Rosso Neutro dopo 24, 48 e 72 ore di incubazione

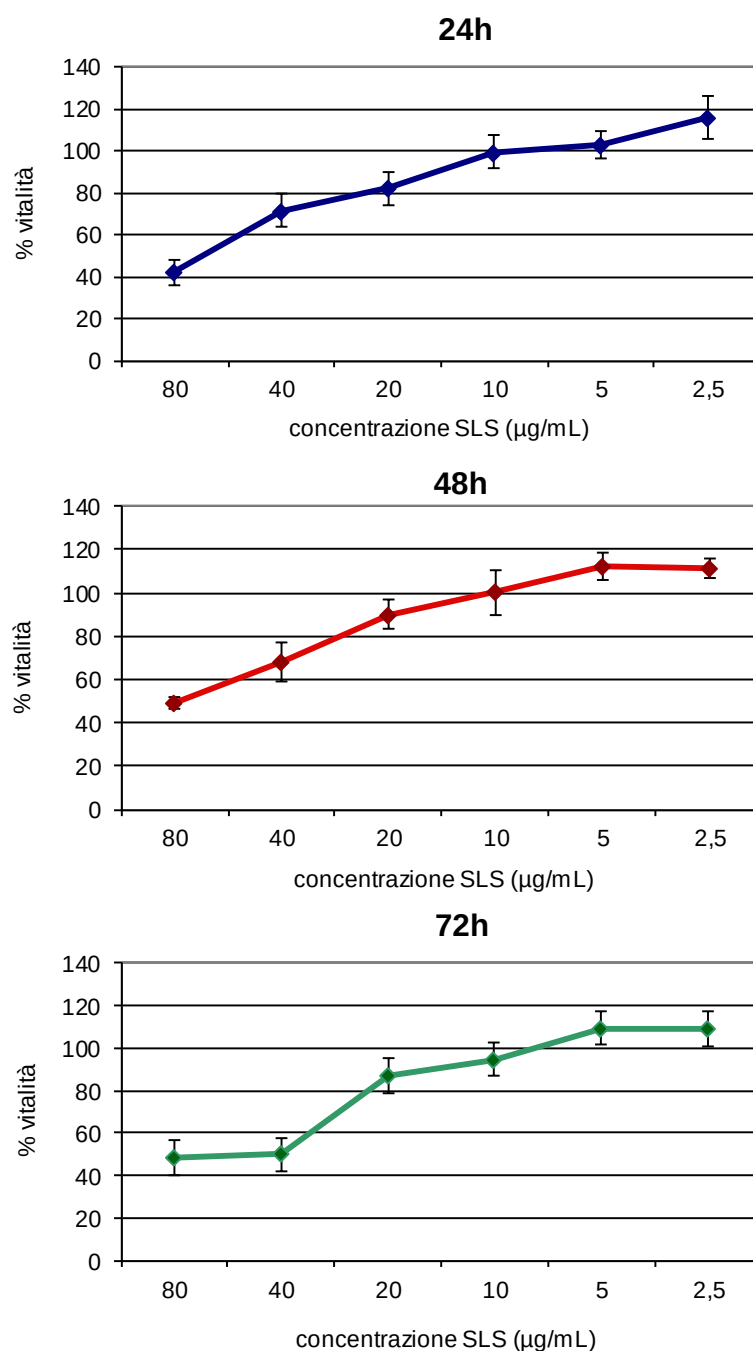


Figura 6. Curva dose-risposta dell'SLS misurata con il test MTT dopo 24, 48 e 72 ore di incubazione

Per quanto riguarda il test MTT, è stata inoltre determinata la curva dose-risposta della Staurosporina (Figura 7).

In base ai risultati ottenuti sono state selezionate, come controlli positivi dei test, la concentrazione di 80 μg/mL per l'SLS e di 4 μM per la Staurosporina.

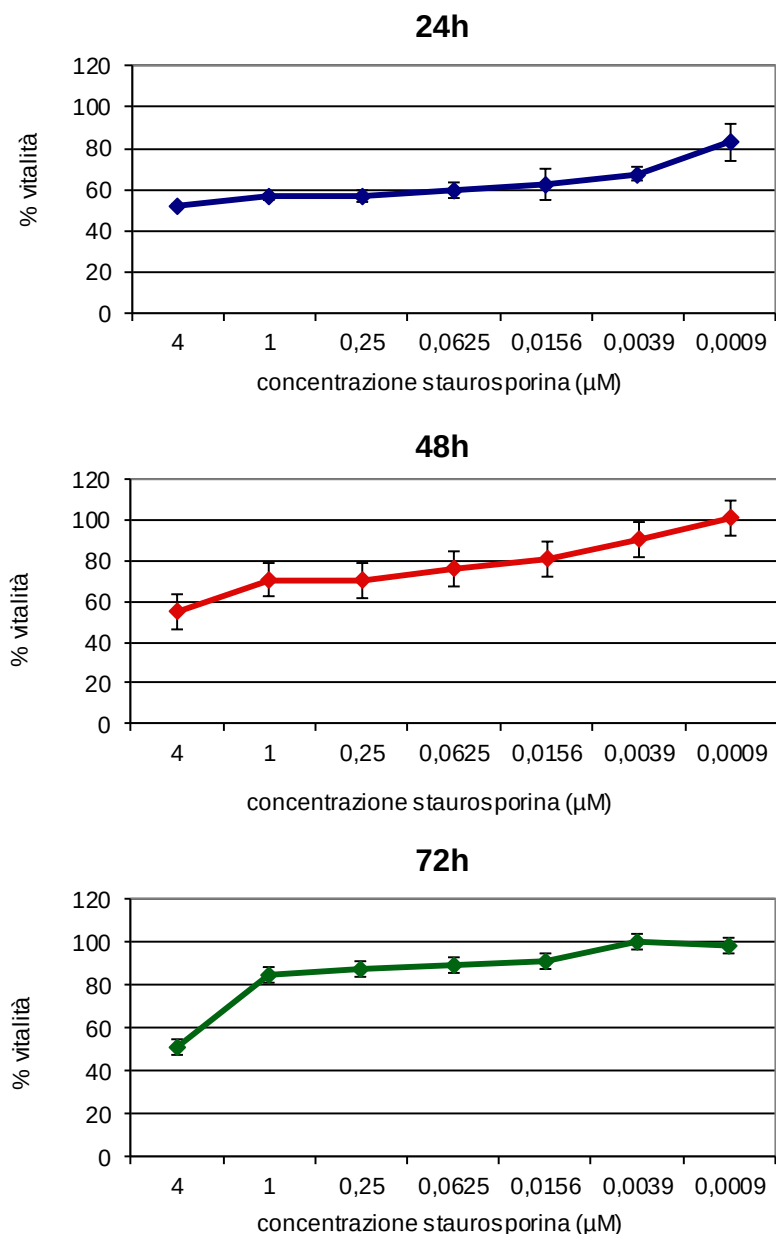


Figura 7. Curva dose-risposta della Staurosporina misurata con il test MTT dopo 24, 48 e 72 ore di incubazione

2.3.2. DM-NP 1: test di citotossicità (saggio diretto)

I risultati del saggio del Rosso Neutro ottenuti su sei esperimenti indipendenti sono riportati in Figura 8. Come mostrato in Figura 8A, dopo 24 h di trattamento delle cellule con le 4 concentrazioni di Ag colloidale (DM-NP 1) si osservava una diminuzione dose-dipendente della percentuale di vitalità cellulare. Tale effetto risultava più evidente dopo 48 h (24h + 24h di trattamento, Figura 8B) mentre, dopo un'ulteriore esposizione (72 h corrispondenti a 24h + 24h + 24h di trattamento, Figura 8C) si osservava un recupero della vitalità delle cellule. Per

quanto riguarda le nanoparticelle di controllo (AgNM20), non sono state osservate variazioni significative della vitalità cellulare in nessuna condizione sperimentale utilizzata.

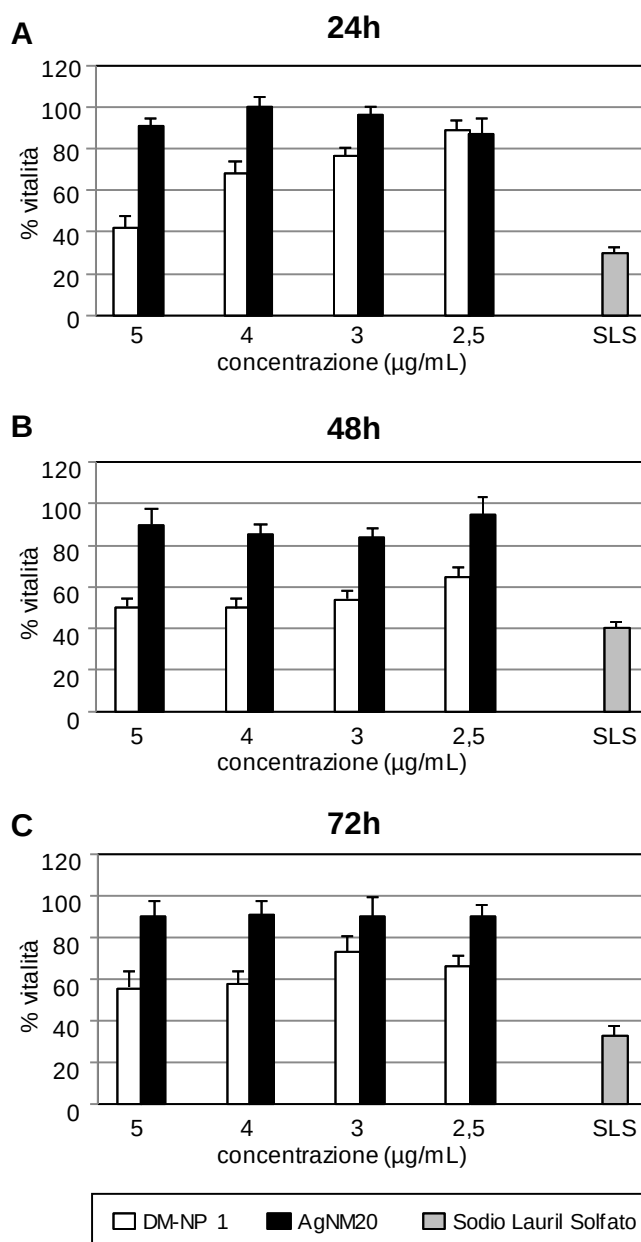


Figura 8. DM-NP 1: risultati del saggio del Rosso Neutro espressi come percentuale rispetto al controllo negativo (cellule non trattate): A) 24 h di esposizione; B) trattamento ripetuto per altre 24 h; C) trattamento ripetuto per ulteriori 24 h. I dati sono la media $\pm$ SD di sei esperimenti

I risultati del test MTT, ottenuti su sei esperimenti indipendenti, sono riportati in Figura 9. Analogamente a quanto riportato per il saggio del Rosso Neutro il trattamento con il DM-NP 1

induceva, dopo 24 h, una diminuzione dose-dipendente della percentuale di vitalità cellulare. Dopo 72 h di esposizione (corrispondenti a 24h + 24h + 24h di trattamento) si osservava un lieve recupero della vitalità delle cellule alle concentrazioni più basse. Anche in questo caso, per quanto riguarda le nanoparticelle di controllo (AgNM20), non sono state osservate significative variazioni della vitalità cellulare in nessuna condizione sperimentale utilizzata.

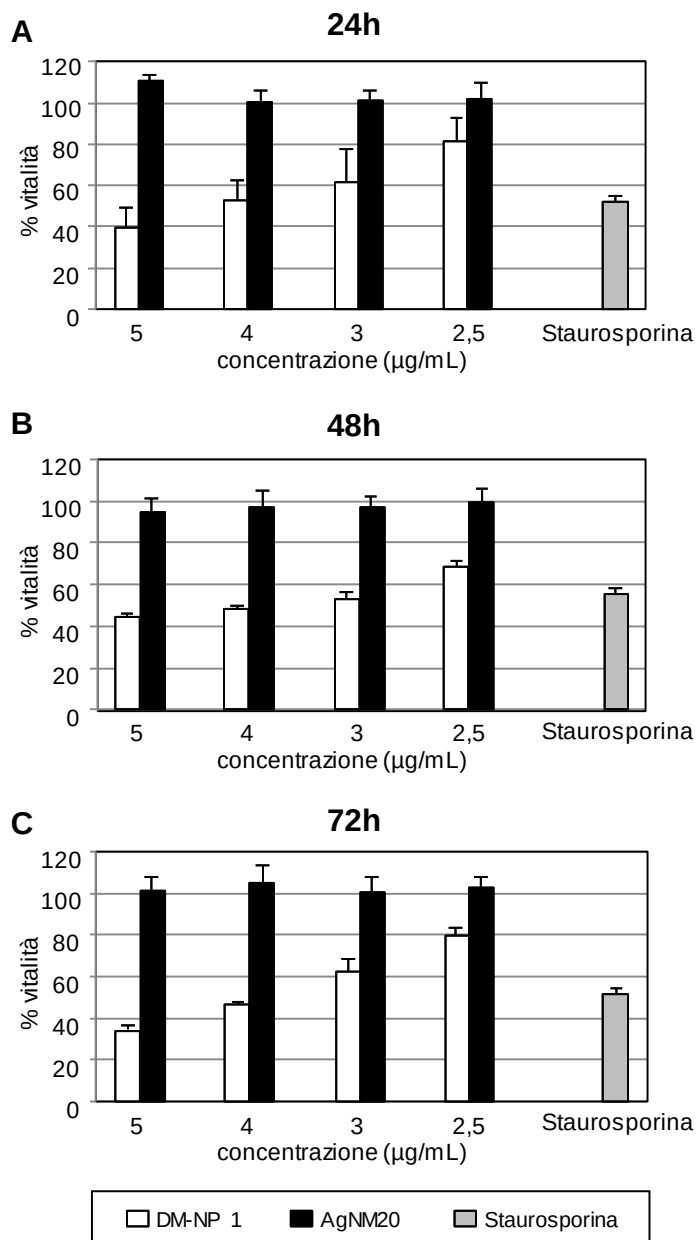


Figura 9. DM-NP 1: risultati del test MTT espressi come percentuale rispetto al controllo negativo (cellule non trattate): A) 24 h di esposizione; B) trattamento ripetuto per altre 24 h; C) trattamento ripetuto per ulteriori 24 h. I dati sono la media $\pm$ SD di sei esperimenti

2.3.3. DM-NP 1: valutazione morfologica della citotossicità tramite FESEM

I risultati dell'analisi morfologica sono mostrati in Figura 10.

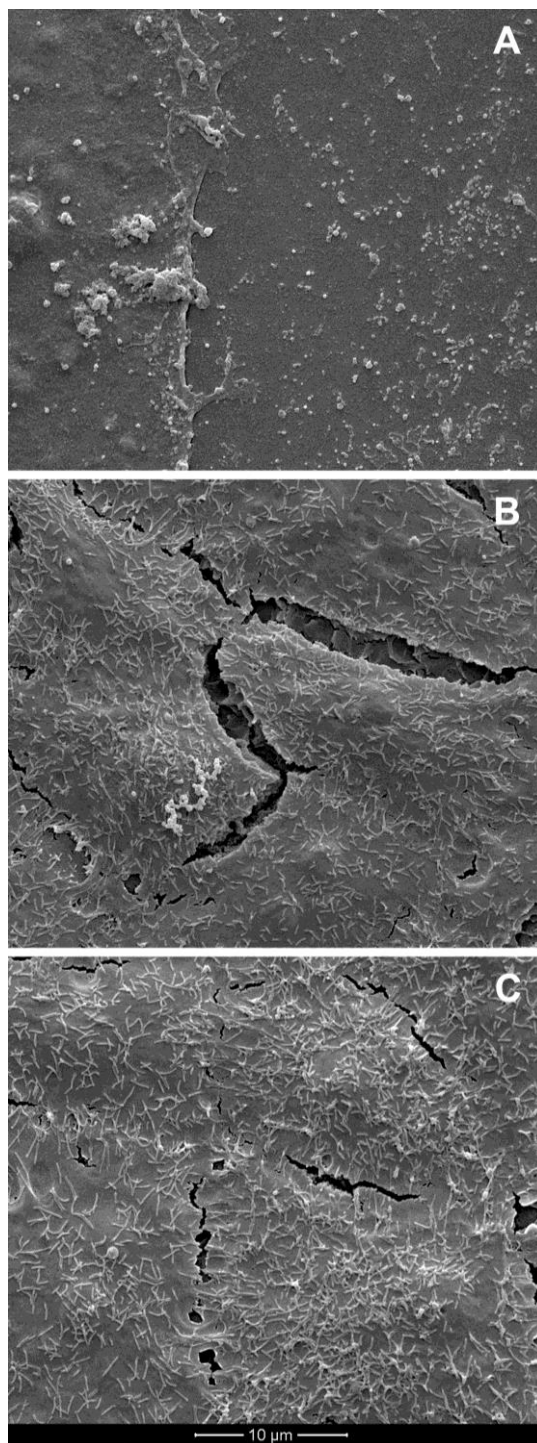


Figura 10. Analisi al FESEM dell'interazione tra DM-NP 1, AgNM20 e cellule Vero:
Cellule trattate per 72h (24+24+24 h) con il DM-NP 1 (A) e con AgNM20 (B);
Cellule di controllo (C)

I risultati confermano quanto osservato nei test colorimetrici in quanto, mentre nelle cellule trattate con il DM-NP 1 è possibile osservare importanti modificazioni della densità e della morfologia dei microvilli fino alla loro scomparsa (B), nelle cellule trattate con AgNM20 (C) non si apprezzano significative modificazioni morfologiche rispetto al controllo (A).

2.3.4. DM-NP 1: valutazione morfologica della citotossicità tramite TEM

I risultati dell'analisi tramite TEM dell'interazione tra cellule Vero e DM-NP 1 o AgNM20 sono mostrati in Figura 11.

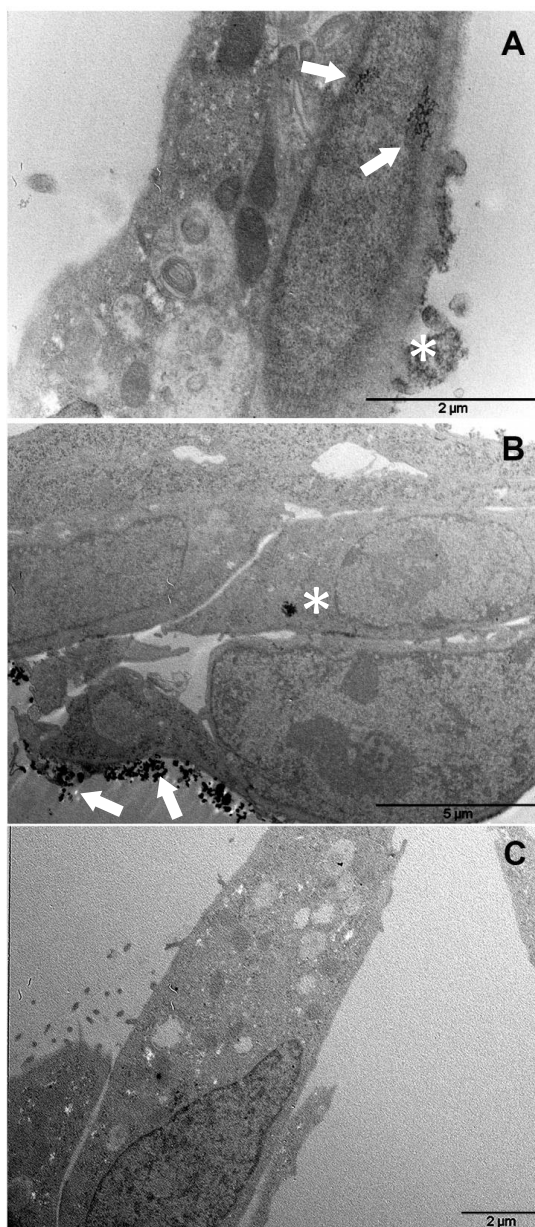


Figura 11. Analisi al TEM dell'interazione tra DM-NP 1, AgNM20 e cellule Vero:
Cellule trattate per 72h (24+24+24 h) con il DM-NP 1 (A) e con AgNM20 (B);
Cellule di controllo (C)

Come mostrato in Figura 11 le sospensioni di NP non sono uniformi e in entrambi i campioni è possibile osservare la presenza di agglomerati di nanoparticelle (asterischi). Le cellule trattate con il DM-NP 1 (A) mostrano segni di tossicità, con un citoplasma scarsamente elettrondenso in cui sono presenti strutture multilamellari e numerosi vacuoli mentre, nelle cellule trattate con AgNM20, non si evidenziano segni di sofferenza (B). In entrambi i campioni sono visibili NP localizzate vicino alla superficie cellulare. Nelle cellule trattate con il DM-NP 1 le NP sono visibili anche in corrispondenza della porzione marginale della membrana nucleare e all'interno del nucleo (A, frecce). Nelle cellule trattate con AgNM20 le NP sono adese alla membrana plasmatica sotto forma di agglomerati (B, frecce) o all'interno del citoplasma (B, asterisco).

2.3.5. DM-NP 2: valutazione della citotossicità tramite saggio del Rosso Neutro e test MTT (saggio previa estrazione)

Supponendo che il DM-NP 2 abbia potuto rilasciare tutto il contenuto di nanoargento, corrispondente a 500 µg/mL, le cellule sono state trattate per 24 h con l'estratto non diluito (ND) e con diluizioni di questo (fattore 1:4) o con diluizioni scalari (fattore 1:4) di AgNM20 partendo dalla concentrazione di 500 µg/mL. I risultati del saggio del Rosso Neutro e del test MTT, hanno dato valori paragonabili non mostrando significative variazioni della vitalità cellulare in nessuna condizione sperimentale utilizzata (Figure 12-14).

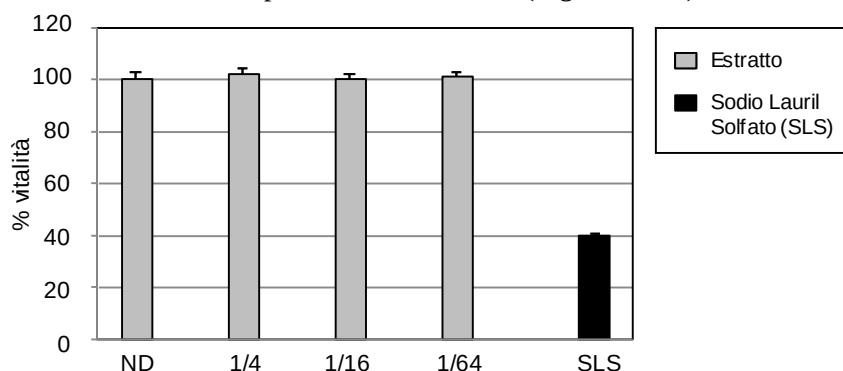


Figura 12. Estratto del DM-NP 2: risultati del saggio del Rosso Neutro
I dati sono la media $\pm$ SD di sei esperimenti

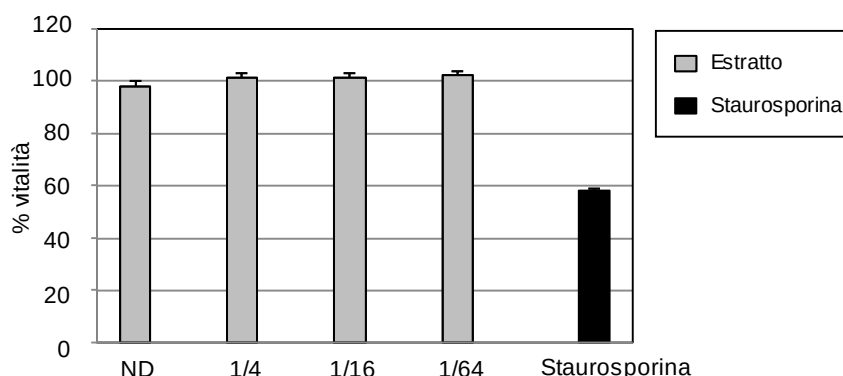


Figura 13. Estratto del DM-NP 2: risultati del test MTT.
I dati sono la media $\pm$ SD di sei esperimenti

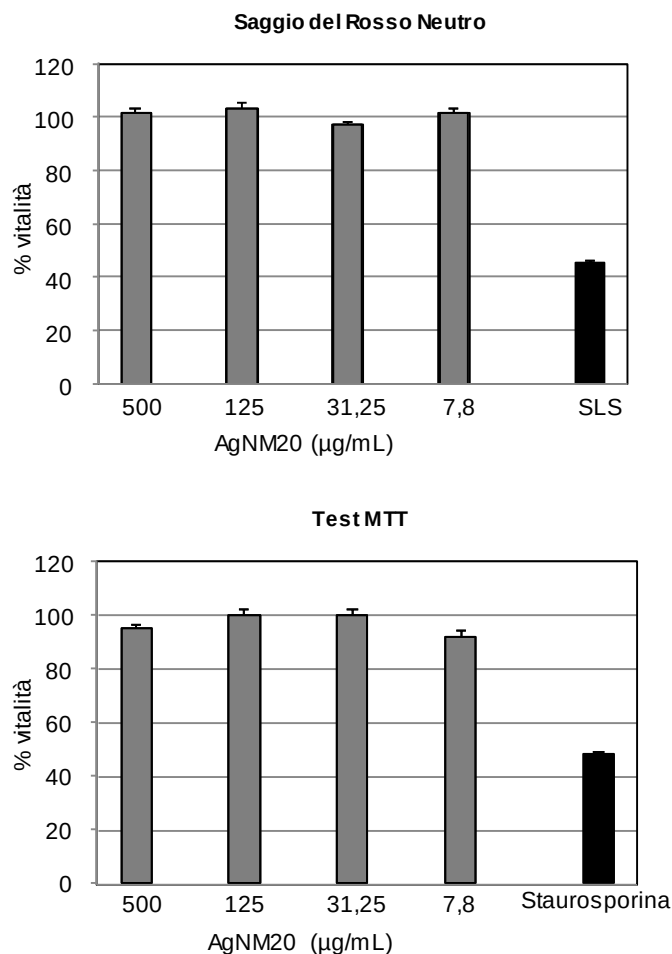


Figura 14. DM-NP 2: risultati del saggio del Rosso Neutro e del test MTT su AgNM20 (controllo). I dati sono la media $\pm$ SD di sei esperimenti

L'interferenza delle particelle di Ag con i saggi colorimetrici (saggio del Rosso Neutro o test MTT) è stata valutata trattando dei pozzetti privi di cellule in maniera del tutto analoga, per tempi, concentrazioni e modalità di esecuzione, ai pozzetti contenenti le cellule. I risultati ottenuti hanno indicato assenza di interferenza significativa delle particelle di Ag, sia in forma nano che in forma colloidale con le procedure di saggio (dati non mostrati).

2.3.6. DM-NP 2: valutazione morfologica della citotossicità tramite FESEM

I risultati dell'analisi morfologica sono mostrati in Figura 15.

I risultati confermano quanto osservato nei test colorimetrici in quanto sia nelle cellule trattate con estratto del DM-NP 2 (A) che nelle cellule di controllo (B) non si apprezzano modificazioni morfologiche.

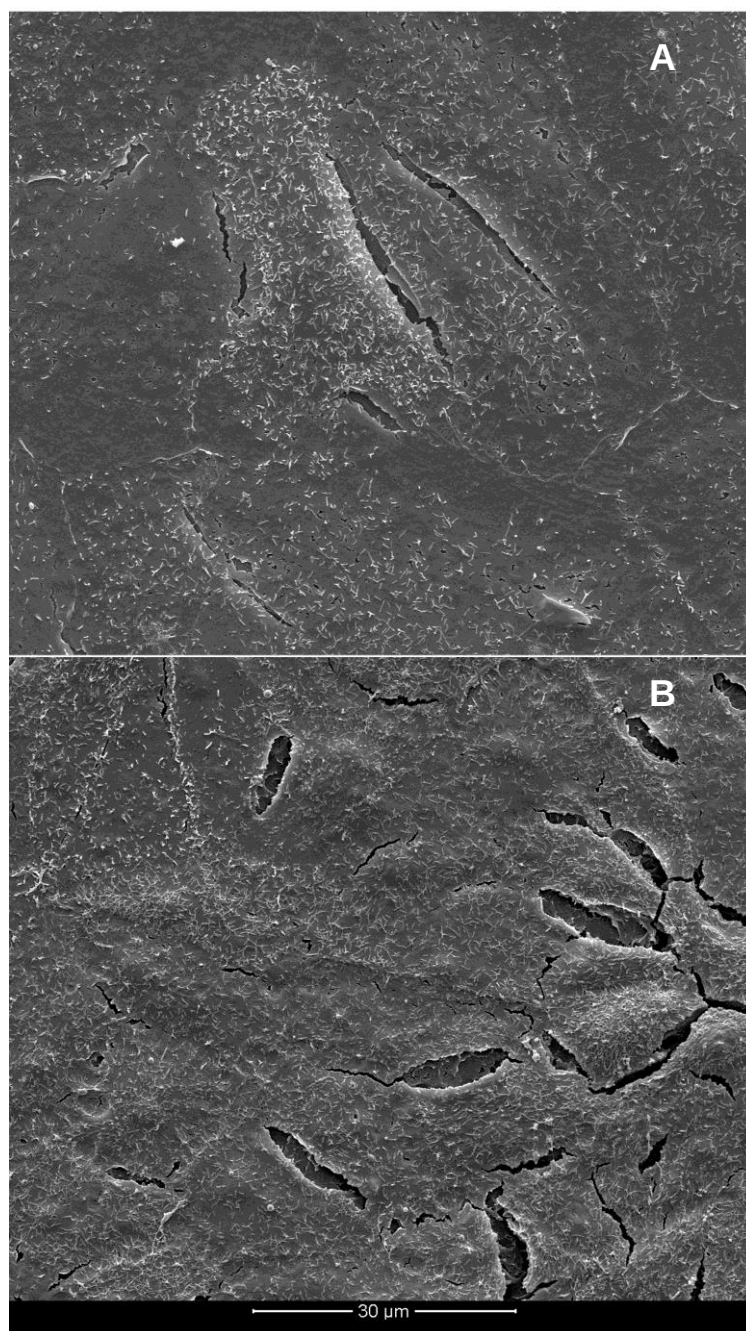


Figura 15. DM-NP 2: A: cellule di controllo; B: cellule trattate con l'estratto (non diluito)

2.3.7. DM-NP 2: valutazione morfologica della citotossicità di AgNM20 tramite FESEM/EDX

Sulla base dell'ipotesi che il DM-NP 2 abbia rilasciato tutto il contenuto di nanoargento, le cellule sono state trattate con 500 µg/mL di AgNM20, fissate e osservate al FESEM per valutare, dal punto di vista morfologico, i possibili effetti.

Sugli stessi campioni è stata inoltre condotta la microanalisi. I risultati sono mostrati in Figura 16. Come si può osservare, i microvilli appaiono modificati e in alcuni casi si “allungano” come per “catturare” gli agglomerati di AgNM20. La microanalisi ha confermato che gli agglomerati visibili sulle cellule sono composti da Ag.

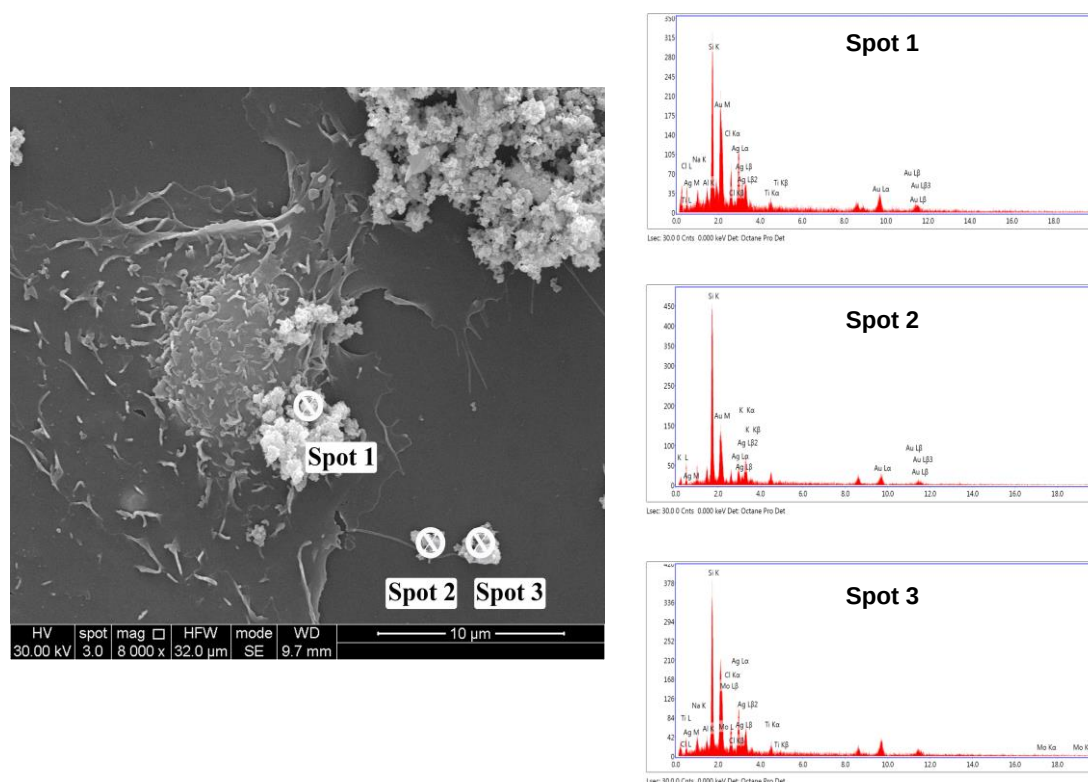


Figura 16. DM-NP 2: analisi al FESEM/EDX di cellule Vero trattate con AgNM20 (500 µg/mL) (controllo). Spot 1, 2, 3: spettri EDX acquisiti dagli agglomerati di AgNM20

2.3.8. DM-NP 2: valutazione morfologica della citotossicità tramite TEM

I risultati dell'analisi tramite TEM dell'interazione tra cellule Vero e l'estratto del DM-NP 2 o l'Ag di controllo in forma nano (AgNM20) sono mostrati in Figura 17.

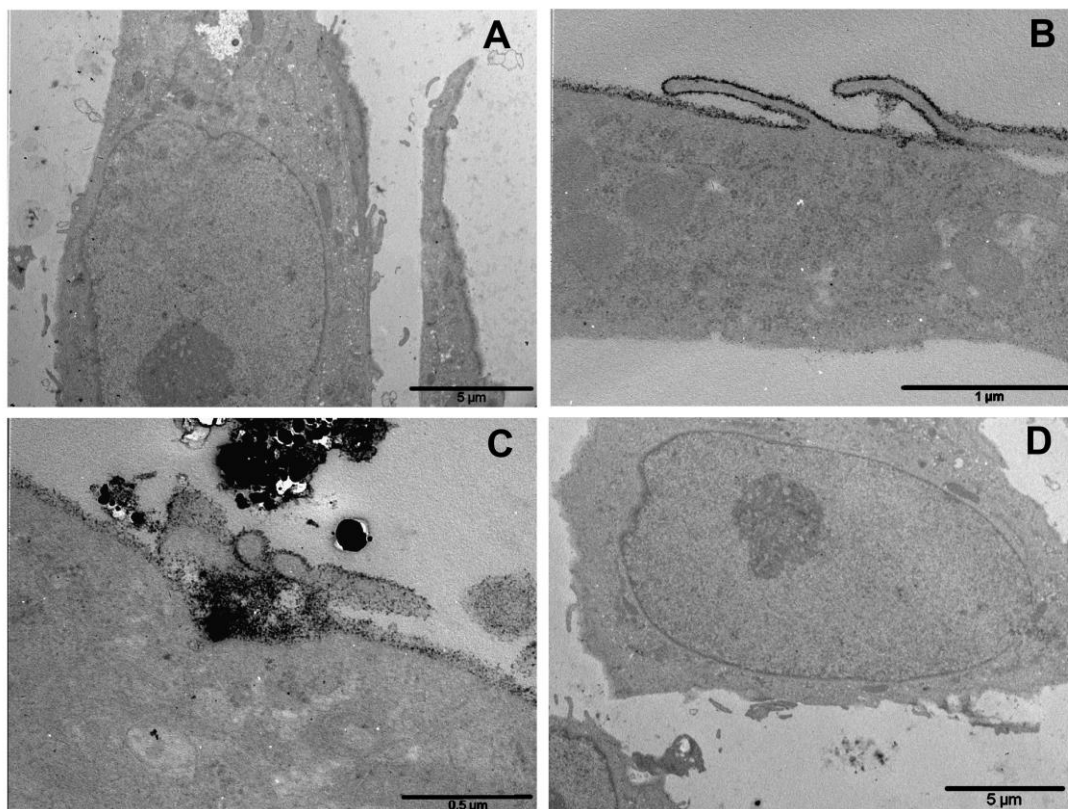


Figura 17. DM-NP 2: analisi al TEM dell'interazione tra estratto, AgNM20 e cellule Vero. A) Cellule trattate con l'estratto non diluito del DM-NP 2; B) Cellule trattate con AgNM20 (125 µg/mL); C) Cellule trattate con AgNM20 (500 µg/mL); D) Cellule di controllo

Sia le cellule trattate con l'estratto del DM-NP 2 (A) che quelle trattate con AgNM20 non mostrano segni di tossicità cellulare (B, C). Alla concentrazione di 125 µg/mL le particelle di controllo (AgNM20) si dispongono in modo uniforme sulla membrana cellulare e sui microvilli (B), mentre, alle concentrazioni più elevate, è possibile osservare la presenza di agglomerati di diverse dimensioni all'esterno della cellula (C).

2.4. Conclusioni

Come è noto l'ingegnerizzazione dell'Ag alla dimensione nano ne amplifica numerose proprietà. La conseguenza è un considerevole costante aumento della diffusione di DM-NP a base di Ag che rende particolarmente urgente la messa a punto dei protocolli per l'analisi dei rischi biologici associati al loro utilizzo.

L'impiego di DM-NP offre enormi potenzialità e nuove prospettive per applicazioni in campo medico, in particolare terapeutico e diagnostico; le proprietà delle NP contenute o rilasciate dai DM, quali ad esempio l'elevata area superficiale, l'alta reattività chimica e la capacità di attraversare le membrane cellulari, potrebbero tuttavia determinare reazioni indesiderate. Per fornire dati utili all'identificazione dei possibili effetti avversi, abbiamo

intrapreso una serie di studi applicando tecniche di biologia cellulare e ultrastrutturali per caratterizzare e valutare la citotossicità delle nanoparticelle presenti in due diversi tipi di DM-NP a base di Ag.

Poiché l'analisi della citotossicità dei DM-NP non prevede normative che utilizzano test standardizzati, in assenza di metodi di riferimento univoci, abbiamo utilizzato quanto previsto dalle norme ISO per i DM introducendo, come controlli aggiuntivi, nanoparticelle con caratteristiche rispondenti a quelle delle NP usate nei DM oggetto dello studio. Abbiamo utilizzato sistemi *in vitro* che, essendo sistemi semplificati e altamente riproducibili, ci hanno permesso di analizzare i meccanismi cellulari e molecolari di tossicità e di individuare gli effetti reversibili. Questi sistemi ci hanno inoltre permesso di allestire il numero di repliche necessario per ottenere una significatività statistica.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che i due test sono applicabili ai sistemi studiati. Entrambi i saggi hanno evidenziato la tossicità del DM-NP 1. Da rimarcare che il test MTT si è rivelato più sensibile e ha mostrato una relazione dose-risposta del DM-NP 1.

I test colorimetrici non hanno rivelato effetti tossici sia dell'estratto del DM-NP 2 che dell'NM di controllo (AgMN20).

Con i nostri sistemi è stato possibile osservare, inoltre, che lo stato di agglomerazione delle NP rappresenta un parametro importante in grado di interferire con i test di tossicità che utilizzano sistemi *in vitro*.

Anche l'analisi ultrastrutturale delle interazioni tra i diversi preparati e le cellule Vero, sia tramite FESEM che tramite TEM, ha mostrato che le NP di controllo non sono tossiche, probabilmente perché sono maggiormente agglomerate. Infatti, l'analisi al TEM ha dimostrato che nelle cellule trattate con il DM-NP 1, le NP che lo costituiscono sono in grado di raggiungere il nucleo. La presenza di NP nel nucleo non è stata osservata nelle altre due preparazioni (estratto del DM-NP 2 e AgNM20).

Possiamo quindi affermare che per studiare gli effetti dell'interazione tra DM-NP e cellule è fondamentale caratterizzare e analizzare in idonei sistemi *in vitro*: (i) l'NM utilizzato nel DM, (ii) il DM finale, (iii) le sospensioni dell'NM di controllo (NP) utilizzate nei saggi *in vitro*. Inoltre è necessario mettere a punto protocolli specifici per realizzare sospensioni monodisperse al fine di ottenere un nanomateriale di controllo idoneo da utilizzare nei saggi di nanotossicità.

Per completare la normativa relativa ai DM-NP è necessario colmare queste importanti lacune conoscitive garantendo informazioni "nanospecifiche" sui protocolli per l'identificazione del rischio da esposizione ai DM nanostrutturati.

Bibliografia

1. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Principles on good laboratory practice (as revised in 1997)*. Paris: OECD; 1998. (OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring, Number 1).
2. Project on Emerging Nanotechnologies. *Analysis. This is the first publicly available on-line inventory of nanotechnology-based consumer products*. Disponibile all'indirizzo: <http://www.nanotechproject.org/cpi/about/analysis/>; ultima consultazione 18/12/2018.
3. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. *Opinion on the guidance on the determination of potential health effects of nanomaterials used in medical devices*. Luxembourg: European Union; 2015.
4. UNI EN ISO 10993-5. *Valutazione biologica dei dispositivi medici-parte 5: Prove per la citotossicità in vitro*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2017.

5. Yasumura Y, Kawakita Y. Studies on SV40 in tissue culture – preliminary step for cancer research “in vitro.” *Nihon Rinsho* 1963;21:1201-15.
6. Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF. Growth and maintenance of Vero cell lines. *Current Protocols in Microbiology* 2008;11(1)A.4E.1-A.4E.7.
7. Rigo C, Roman M, Munivrana I, Vindigni V, Azzena B, Barbante C, Cairns WRL. Characterization and evaluation of silver release from four different dressings used in burns care. *Burns* 2012;38:1131-42.
8. Rigo C, Ferroni L, Tocco I, Roman M, Munivrana I, Gardin C, Cairns WR, Vindigni V, Azzena B, Barbante C, Zavan B. Active silver nanoparticles for wound healing. *Int J Mol Sci* 2013;14:4817-40.
9. Burrell RE, DemLing R, Pancani S, Papp A, Strand O, Voinchet V. The role of Acticoat™ with nanocrystalline silver in the management of burns. *Burns* 2004;30(Suppl.1):S1-S9.
10. Midura S, Schneider E, Sakamoto FA, Rosen GM, Winalski CS, Midura RJ. *In vitro* toxicity in long-term cell culture of MR contrast agents targeted to cartilage evaluation. *Osteoarthritis Cartilage* 2014;22(9):1337-45.
11. UNI EN ISO 10993-12:2012. *Valutazione biologica dei dispositivi medici - Parte 12: Preparazione dei campioni e materiali di riferimento*. Milano Ente Nazionale Italiano di Unificazione 2012.
12. Ammendolia MG, Iosi F, De Berardis B, Guccione G, Superti F, Conte MP, Longhi C. *Listeria monocytogenes* behaviour in presence of non-UV-irradiated titanium dioxide nanoparticles. *PLoS One* 2014;9(1):e84986.
13. Ursini CL, Maiello R, Ciervo A, Fresegna AM, Buresti G, Superti F, Marchetti M, Iavicoli S, Cavallo D. Evaluation of uptake, cytotoxicity and inflammatory effects in respiratory cells exposed to pristine and -OH and -COOH functionalized multi-wall carbon nanotubes. *J Appl Toxicol* 2016;36:394-403.