



**Politecnico
di Torino**

RELAZIONE LABORATORI

**Formazione pratica in nanotecnologie biomediche e terapie
avanzate**

Gruppo 6

Claudia D'Agostino – s337584

Martina d'Ambrosio – s328954

Mariano Fontanarosa – s333914

Introduzione

L'obiettivo è la sintesi di nanoparticelle polimeriche per il trattamento del glioblastoma, un tumore cerebrale con una prognosi complessa, che i normali farmaci non riescono a raggiungere. A tale scopo, vengono realizzati due tipi di nanoparticelle: a rilascio di farmaco e a rilascio di siRNA. Dopo la sintesi, si testa l'internalizzazione delle nanoparticelle da parte di cellule della microglia, che vengono successivamente inglobate in un idrogel contenente uno sferoide tumorale, che rappresenta un modello tridimensionale di glioblastoma, in modo da simulare il trasporto delle nanoparticelle verso il tumore.

Materiali

- DSPE-PEG (2000) CARBOXY NHS (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[carboxy(polyethylene glycol)-2000, NHS ester] (sodium salt)) in etOH 10%
- EGG PG (1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-sn-1-glycerol sodium salt, L- α -phosphatidylglycerol (Egg, Chicken) (sodium salt)) in etOH 10%
- EGG Liss Rhod PE (L- α -Phosphatidylethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (Ammonium Salt) (Egg-Transphosphatidylated, Chicken)) in etOH 10%
- Acetonitrile (ACN)
- Poliuretano in ACN
- Acqua distillata (ddH₂O)
- Farmaco Bortezomib (BTZ)
- Albumina di siero bovino (BSA) in ddH₂O
- Buffer fosfato salino (PBS)
- Bicinchoninic Acid Assay (BCA) Reagent A e B
- Sale di tetrazolio (MTS)
- Poly(allylamine hydrochloride) (PAH) (187 cariche positive / mol, PM=17500 g/mol)
- siRNA (40 cariche negative / mol, PM =13851 g/mol)
- Agarosio
- Tris-acetato EDTA (TAE)
- SYBR Green (C₃₂H₃₇N₄S)
- H₂O nuclease free (H₂O N-)
- Gelatina metacrilata (GelMA) (100% DoM)
- Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (LAP)
- Acido ialuronico (HA) (PM: 80-130k Da)
- Fluorescein Isothiocyanate-Dextran FD4 (PM=4000 Da)
- Fluorescein Isothiocyanate-Dextran FD70 (PM=70000 Da)
- Cellule HMC3 (microglia)
- FITC Conjugate
- Trypan Blue (C₃₄H₂₈N₆O₁₄S₄)
- Cellule U87 (sferoide tumorale)
- TRITONX-100 5% in PBS
- Falloidina marcata con fluoresceina isotiocinata in BSA 1%
- DAPI (C₁₆H₁₅N₅)

Metodi

Preparazione di nanoparticelle polimeriche incapsulanti BTZ, funzionalizzate con BSA (NPs1)

Per la preparazione di nanoparticelle polimeriche funzionalizzate a rilascio di farmaco, si è utilizzata la tecnica della nanoprecipitazione. Per formare la soluzione lipidica, sono stati inseriti in una vial sotto agitazione (60°C, 300 rpm) 200 µg di DSPE-PEG (2000) CARBOXY NHS, 240 µg di EGG PG, 10 µg di 18:1 LISS RHOD PE e 1560 µL di ddH₂O. La soluzione è stata mantenuta in agitazione per 15 minuti, dopodiché sono stati aggiunti, goccia a goccia, una soluzione di 1 mg di poliuretano e 50 µg di BTZ e 1 mL di ddH₂O. Tutta la soluzione è stata poi centrifugata per 15 minuti a 3200 rpm all'interno di filtri per centrifuga (cutoff di 10 kDa). È stato poi aggiunto ancora 1 mL di ddH₂O per diluire la soluzione e si è ripetuta la centrifugazione, al cui termine è stato raccolto il liquido contenuto nel filtro ed è stato diviso equamente in due eppendorf.

Per la funzionalizzazione, sono stati aggiunti 145 µg di BSA a mezza formulazione di nanoparticelle. È stato aggiunto 1 mL di PBS e la soluzione è stata lasciata in agitazione in frigo overnight (al buio, 4°C, 350 rpm), per poi essere centrifugata per 12 min a 3200 rpm per rimuovere i residui di sali di PBS. Si è poi aggiunto 1 mL di ddH₂O e la soluzione è stata nuovamente centrifugata, raccogliendola poi in una eppendorf e successivamente centrifugandola per la terza volta per 10 minuti a 10000 rpm, in modo da separare le nanoparticelle

funzionalizzate dal surnatante. Infine, la proteina non reagita è stata raccolta in una eppendorf, mentre le nanoparticelle sono state ridisperse in ddH₂O, per poter poi effettuare le successive caratterizzazioni.

È stata condotta un'analisi con il Dynamic Light Scattering (DLS), rilevando i seguenti parametri: diametro idrodinamico, indice di polidispersità (PDI) e potenziale zeta. Per questa analisi, sono stati testati tre campioni:

- nanoparticelle vuote prima della funzionalizzazione con BSA;
- nanoparticelle vuote dopo la funzionalizzazione con BSA;
- nanoparticelle incapsulanti BTZ non funzionalizzate.

È stata poi calcolata la resa del processo di sintesi delle nanoparticelle (*Formula 1*), mediando i risultati ottenuti da quattro campioni. Il peso totale dei reagenti include il peso dei lipidi messi in soluzione, del polimero e del farmaco BTZ, per un totale di 150 mg.

$$Resa (\%)_i = \frac{\text{Peso di una formulazione di NPs}}{\text{Peso totale dei reagenti}} \cdot 100 \quad (\text{Formula 1})$$

È stata anche calcolata l'efficacia di incapsulamento del BTZ (EE%) (*Formula 2*) di tre campioni, misurandone l'assorbanza tramite spettroscopia UV/Vis in corrispondenza del picco caratteristico del BTZ (268 nm) e, a partire dalla calibrazione effettuata con soluzioni di BTZ a concentrazione nota, derivandone la corrispondente concentrazione e, di conseguenza, la massa (considerando 0.5 mL di volume per i primi due campioni ed 1 mL di volume per il terzo campione).

$$EE(\%) = \frac{\text{Quantità di farmaco nelle NPs}}{\text{Quantità di farmaco fornito}} \cdot 100 \quad (\text{Formula 2})$$

È stato calcolato successivamente il rilascio di BTZ, valutandolo su tre campioni. Ciascun campione è stato inserito in 1 mL di acqua ed incubato a 37°C per durate temporali incrementali (1, 3, 24, 48, 72 e 96 h). Ad ogni time point, le nanoparticelle sono state separate dalla soluzione di rilascio tramite centrifuga. La soluzione di rilascio è stata poi rimossa e congelata, mentre le nanoparticelle sono state ridisperse in acqua e incubate sino al time point successivo. All'ultimo time point, tutte le soluzioni di rilascio sono state liofilizzate overnight e ridisperse in 0,5 mL di ACN. Per ciascun campione, sono stati misurati i valori di assorbanza in spettroscopia UV/Vis a 268 nm, è stata calcolata la concentrazione di BTZ corrispondente a partire da una calibrazione con standard a concentrazione nota e, di conseguenza, la quantità di BTZ presente in ciascun campione ad ogni time point. Sono poi stati calcolati la quantità di BTZ rilasciata cumulativamente a ciascun time point (*Formula 3*) e il rilascio percentuale (*Formula 4*).

$$Rilascio_{timepoint_i} = \text{Quantità farmaco}_{timepoint_i} + \text{Rilascio}_{timepoint_{i-1}} \quad (\text{Formula 3})$$

$$Rilascio (\%)_{timepoint_i} = \frac{\text{Rilascio}_{timepoint_i}}{\text{Farmaco Contenuto nelle Particelle}} \cdot 100 \quad (\text{Formula 4})$$

La funzionalizzazione con BSA è stata quantificata tramite BCA, un saggio che permette, tramite una quantificazione indiretta, di misurare la quantità di proteine rimaste in sospensione dopo la reazione di funzionalizzazione. Effettuando delle diluizioni in serie in ddH₂O, sono stati preparati 8 standard di BSA con concentrazioni note per la calibrazione e si è determinato il volume totale di BCA Working Reagent (WR) necessario per analizzare i campioni e gli standard di calibrazione (*Formula 5*), che risulta essere pari a 2000 µL.

$$\text{Volume Totale WR} = (n^\circ \text{ standard} + n^\circ \text{ campioni}) \cdot n^\circ \text{ replicati} \cdot \text{volume WR a campione} \quad (\text{Formula 5})$$

Per preparare i 2000 µL di WR, sono stati miscelati Reagente A e Reagente B in rapporto 50:1, ovvero 1961 µL di Reagente A e 39 µL di Reagente B. Sono quindi stati aggiunti, in 9 pozzetti di una piastra, 25 µL di ciascuno standard o campione e 200 µL di WR. La piastra è stata successivamente coperta con alluminio ed incubata a 37°C per 30 minuti, al termine dei quali è stata misurata l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 562 nm con un lettore di piastra. Si è ricavata la concentrazione di BSA e di conseguenza la massa di BSA presente in ciascun surnatante (considerando un volume di surnatante pari a 0.25 mL), e si è calcolata la resa del processo di funzionalizzazione (*Formula 6*).

$$Resa(\%) = \frac{BSA_{iniziale} - BSA_{surnatante}}{BSA_{iniziale}} \cdot 100 \quad (\text{Formula 6})$$

La funzionalizzazione con BSA delle nanoparticelle è stata anche valutata anche tramite un'analisi con QCM-D, uno strumento che permette di ottenere la misura di variazioni di massa, tramite la valutazione di variazioni in frequenza, e di ottenere informazioni sulle caratteristiche viscoelastiche di ciò che si deposita, tramite la valutazione della variazione di dissipazione.

Tramite la QCM-D si è inoltre determinato il rapporto ottimale tra il numero di gruppi funzionali carbossilici (COOH) attivati e il numero di molecole di albumina da far reagire per la funzionalizzazione, che garantisca un equilibrio tra le condizioni limite di funzionalizzazione insufficiente (causata da una quantità di reagenti non adeguata) e funzionalizzazione troppo lenta (causata dall'eccessivo ingombro sterico dei reagenti stessi). Questo rapporto risulta essere pari a 1:16.

Infine, è stata testata l'interazione delle nanoparticelle con cellule tumorali U87, osservando come influissero sulla vitalità cellulare. Sono state testate diverse condizioni di trattamento: con nanoparticelle vuote e con nanoparticelle cariche di BTZ, entrambe per concentrazioni di 10 µg/mL, 20 µg/mL e 50 µg/mL. Le cellule tumorali sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti ad una densità di 10000 cellule/pozzetto con 100 µL di mezzo di coltura e sono state lasciate in coltura per 24 h. Successivamente sono state incubate a tre diversi time point (24, 48, 72 h) con le nanoparticelle. Sono state utilizzate come controllo delle cellule non trattate. Al termine del tempo di incubazione, sono stati aggiunti 20 µL di reagente MTS ad ogni pozzetto e le cellule sono state poi incubate con il reagente per 3 ore a 37°C in incubatore. È stato infine acquisito per ciascun pozzetto, tramite un lettore di piastra, il segnale in assorbanza UV a 490 nm. Per ogni condizione di trattamento sono state acquisite tre misure. È stata quindi calcolata la vitalità cellulare (*Formula 7*).

$$Vitalità(\%) = \frac{Assorbanza_campione_{timepoint_i}}{Assorbanza_controllo_{timepoint_i}} \cdot 100 \quad (Formula\ 7)$$

Preparazione e caratterizzazione di NPs polimeriche incapsulanti siRNA (NPs2)

Per la realizzazione delle NPs2, sono stati uniti in una eppendorf 2 µg di PAH e 2.77 µg di siRNA, con rapporto N/P (cariche amminiche del PAH/cariche fosfato del siRNA) circa pari a 3, ottimizzato in modo da garantire la stabilità e l'efficacia del complesso PAH-siRNA. La soluzione è stata messa in incubazione per 30 minuti in ghiaccio e si è successivamente portato il volume a 1000 µL tramite l'aggiunta di H₂O N-. Il tutto è stato centrifugato a 14000 rpm per 15 minuti a 4°C, per poi prelevare 900 µL di surnatante che sono stati messi in una nuova eppendorf su cui sarà poi eseguita l'analisi per ottenere l'efficacia di incapsulamento (EE%). Sono stati aggiunti 900 µL di PBS alla preparazione, la si è messa a 37°C in incubatore per 1 h e, al termine del tempo, la si è centrifugata e si sono prelevati 900 µL di surnatante, che sono stati messi in una eppendorf su cui poi sarà eseguita l'analisi per ottenere il rilascio di siRNA dopo 1 h. Sono stati nuovamente aggiunti 900 µL di PBS e le nanoparticelle sono state messe in stufa per 7 giorni, per ottenere, al termine, anche il rilascio di siRNA a 7 giorni.

È stata calcolata l'efficacia di incapsulamento, misurando la quantità di siRNA non incapsulata nel surnatante tramite il Qubit™ 4 Fluorimetrie. È stata preparata la Working Solution (WS), con colorante e soluzione buffer in rapporto 1:200 (5 µL di colorante, 195 µL di buffer). Per la preparazione del campione da analizzare sono stati uniti 190 µL di WS e 10 µL del campione, per ottenere un rapporto 1:20 con volume finale pari a 200 µL.

Il rilascio di siRNA delle nanoparticelle a 7 giorni è stato valutato sia quantitativamente con l'utilizzo del Qubit™ sia qualitativamente tramite elettroforesi. È stato prelevato il campione dalla stufa ed è stato centrifugato (4° C, 14000 rpm, 15 min), dopodiché si sono prelevati 900 µL di surnatante da analizzare.

Per l'esecuzione dell'analisi elettroforetica si è dapprima preparato il gel di supporto in agarosio al 2% w/v. Si è sciolta la quantità necessaria di polvere di agarosio nel corrispettivo volume di TAE 1X in microonde (sono stati utilizzati 1 mg di agarosio in 50mL di TAE per l'apparecchio a disposizione) e, dopo aver verificato la sua buona solubilizzazione e l'assenza di bolle, si è lasciato raffreddare parzialmente l'agarosio. Dopo aver schermato il recipiente con alluminio, è stato aggiunto il SYBR Green in rapporto 1:10000 e la soluzione di agarosio è stata versata nel supporto, lasciandola poi gelificare al suo interno per 1 h. Una volta solidificato il gel, si è tolto delicatamente il pettine del supporto senza rompere i pozzetti che si erano formati grazie ad esso, si è inserito il gel all'interno della camera elettroforetica e si è aggiunta la TAE 1X fino al valore massimo indicato

e al ricoprimento dei pozzetti. Si sono caricati i campioni costituiti da 2 μ L DYE + 10 μ L di surnatante da analizzare nel gel all'interno del pozzetto. Si è quindi chiusa la camera elettroforetica e si è applicato un campo elettrico di 100 V per 30 minuti, per eseguire la corsa elettroforetica. I risultati sono stati visualizzati tramite esposizione ad una lampada UV.

Per l'analisi al Qubit™, il campione da analizzare è stato invece preparato mescolando il surnatante prelevato dal campione e la WS in proporzione 1:20.

Internalizzazione di nanoparticelle da parte delle cellule della microglia

Le cellule prese in esame sono le HMC3, scelte per la loro elevata attività fagocitica, per la capacità di infiltrarsi nella barriera ematoencefalica e il fatto di essere in grado di migrare autonomamente verso masse tumorali.

Si è partiti con la preparazione dei campioni cellulari. Tramite l'emocitometro, utilizzando lo staining con Trypan blue, si è valutata la concentrazione delle cellule in soluzione, come rapporto tra la somma delle cellule in ogni quadrante e il numero dei quadranti. Si sono seminati 4 pozzetti con una concentrazione di 100000 cellule/pozzetto in 0.5 mL di mezzo di coltura ciascuno.

Successivamente, si è passati alla parte di somministrazione e incubazione delle nanoparticelle (NPs1 e NPs2), considerando quattro condizioni differenti: controllo non trattato, NPs1 (200 μ g/mL), NPs2 (200 nM) e somministrazione mista di NPs1 e NPs2 (rispettivamente 200 μ g/mL e 200 nM).

Successivamente, tramite l'analisi al FACS, sono stati ottenuti il parametro Forward Scatter (FSC), correlato alla dimensione cellulare, ed il parametro Side Scatter (SSC), correlato alla granularità. Da questi parametri si è definita la Gating Region, ovvero la regione contenente una dimensione e un'organizzazione compatibile con quelle delle cellule analizzate, e si sono settate le soglie nei canali di fluorescenza di interesse. In particolare, alle NPs1 (contenenti rodamina) è stato attribuito il canale Yellow B fluorescence, mentre alle NPs2 (contenenti FITC Conjugate) è stato attribuito il canale Green B fluorescence.

Creazione e caratterizzazione idrogeli

Si sono realizzati due idrogeli (uno in GelMA ed uno in GelMA e HA) in modo da creare un modello tridimensionale dell'ambiente biologico circostante il glioblastoma e poter studiare il trasporto di nanoparticelle mediato da cellule della microglia all'interno di questo modello.

Per la preparazione dell'idrogelo in GelMa, la polvere di GelMa è stata aggiunta ad una soluzione acquosa di PBS contenente il fotoiniziatore LAP, in modo da ottenere una soluzione a una concentrazione del 5% w/v, che è successivamente stata miscelata con un vortex e incubata a 37°C fino alla completa gelificazione.

Per la preparazione dell'idrogelo GelMA/HA sono stati ripetuti gli stessi passaggi utilizzando HA al posto della GelMA, in modo da ottenere una soluzione a concentrazione 1% w/v di HA nel mezzo acquoso, con HA completamente solubilizzato, alla quale è stata successivamente addizionata una soluzione 5% w/v di GelMA ottenuta con lo stesso procedimento del primo idrogelo. Il tutto è stato nuovamente miscelato con un vortex e posto poi in incubatore a 37°C, fino alla completa gelificazione.

I due idrogeli sono stati quindi caratterizzati tramite analisi reologiche. Si sono innanzitutto eseguiti dei test di termoresponsività sull'idrogelo di sola GelMA:

- strain sweep test ($T=20^{\circ}\text{C}$, deformazione: 0.01-800%, oscillazione sinusoidale a $f = 1$ Hz);
- frequency sweep test ($T=20^{\circ}\text{C}$ e $T=37^{\circ}\text{C}$, deformazione = 1%, frequenza angolare: 0.1-100 rad/s);
- temperature ramp test (T : 0-37°C, oscillazione sinusoidale a $f = 1$ Hz).

Sempre sull'idrogelo di sola GelMA si sono anche eseguiti dei test di fotoresponsività:

- time sweep test ($T=25^{\circ}\text{C}$, deformazione = 1%, oscillazione sinusoidale a $f = 1$ Hz, radiazioni: UV a 365 nm, visibile a 405 nm con lampada OFF 60 s – ON 120 s – OFF 120 s);
- frequency sweep test ($T=37^{\circ}\text{C}$, deformazione = 1%, frequenza angolare: 0.1-100 rad/s, prima e dopo irraggiamento nel visibile).

Sono stati infine condotti i seguenti test sia sull'idrogelo in GelMA sia sull'idrogelo in GelMA/HA, irraggiando nel campo del visibile:

- time sweep test ($T=25^{\circ}\text{C}$, deformazione = 1%, oscillazione sinusoidale a $f = 1$ Hz, radiazioni: UV a 365 nm, visibile a 405 nm con lampada OFF 60 s – ON 120 s – OFF 120 s);
- strain sweep test ($T=37^{\circ}\text{C}$, deformazione: 0.01-500%, oscillazione sinusoidale a $f = 1$ Hz).

I due idrogeli ottenuti sono stati inoltre sottoposti a prove di swelling e di permeabilità.

Per le prove di swelling, i campioni sono stati liofilizzati, pesati e successivamente posizionati in una multiwell da 24, con l'aggiunta di 1 mL di PBS per ogni campione, ed incubati a 37°C per quattro diversi time point (30 min, 1 h, 2 h, 24 h). Ad ogni time point è stato rimosso il PBS, il campione è stato asciugato su carta, è stato pesato e successivamente si è aggiunto nuovamente 1 mL di PBS.

Per le prove di permeabilità, invece, si sono aggiunti 0.5 mL di una soluzione 0.5 mg/mL di FD ad ogni bijoux contenente il gel, ottenendo 4 campioni: idrogelo in GelMA con FD4, idrogelo in GelMA/HA con FD4, idrogelo in GelMA con FD70 e idrogelo in GelMA/HA con FD70. Ciascun campione è stato incubato a 37°C per 1.5 h e 24 h, prelevando ad ogni time point 100 µL di surnatante per l'analisi al plate reader. Questa è stata eseguita in assorbanza a 493 nm, ricavando, a partire da una calibrazione con standard a concentrazione nota, la concentrazione di FD, che è servita poi per valutare il rilascio di FD nel tempo e di conseguenza la permeabilità degli idrogeli.

Unione degli elementi del modello e staining cellulare

Si sono preparati modelli tridimensionali di glioblastoma, incapsulando sferoidi di cellule tumorali U87 (8000 cellule/sferoide) in 20 µL di idrogelo GelMA/HA, insieme a cellule della microglia HMC3 (500000 cellule/mL di idrogelo) con membrana marcata con DiD Cell-Labeling solution (fluorescente in rosso). Il gel è stato lasciato in coltura per 3 giorni per permettere la migrazione delle cellule della microglia verso lo sferoide. Dopo aver rimosso il mezzo di coltura da questo modello e aver eseguito due risciacqui in PBS per 5 minuti, si è proceduto con il fissaggio per 20 minuti con 300 µL di PFA al 4% in PBS e sono stati poi effettuati ulteriori tre risciacqui. La permeabilizzazione è stata eseguita preparando un buffer di TRITONX-100 allo 0.5% e incubando il campione con 200 µL della soluzione buffer per 10 minuti, dopo aver rimosso il PBS già presente. In seguito, si è eseguito un ulteriore lavaggio e, dopo aver preparato il buffer di bloccaggio (250 µL di BSA all'1% diluita in PBS), si è incubato il campione con 200 µL di questo per 20 minuti. A bloccaggio ultimato, si è rimossa la soluzione e si è incubato il campione per 45 minuti al buio con 140 µL di Falloidina, per marcare i filamenti di actina, e successivamente per 10 minuti con 140 µL di una soluzione di DAPI 1 mg/mL, per marcare i nuclei, con un lavaggio intermedio. In seguito a ulteriori 3 risciacqui di 3 minuti in PBS, si è proceduto con l'acquisizione delle immagini in fluorescenza.

Risultati

1) Caratterizzazione NPs1

Analisi con Dynamic Light Scattering (DLS)

Dall'analisi dei dati ottenuti (*Grafico 1*), si osserva innanzitutto che il diametro idrodinamico maggiore si ha nel caso delle nanoparticelle vuote post-funzionalizzazione, coerentemente con il corretto avvenimento della funzionalizzazione per aggiraffaggio di BSA. Il caso con il diametro minore è invece, come prevedibile, quello senza funzionalizzazione né farmaco. Per quanto riguarda l'indice di polidispersità, in tutti i casi il valore rientra nel range auspicato per l'applicazione (0-1) e risulta, anzi, essere un valore abbastanza basso, il che vuol dire che le particelle sono molto simili tra loro come dimensioni. Infine, il potenziale zeta risulta negativo, coerentemente con le caratteristiche dei materiali utilizzati nella sintesi. Il potenziale più vicino allo zero si ha nel caso delle nanoparticelle funzionalizzate, poiché la BSA, carica positivamente, va ad abbassare la carica negativa del sistema.

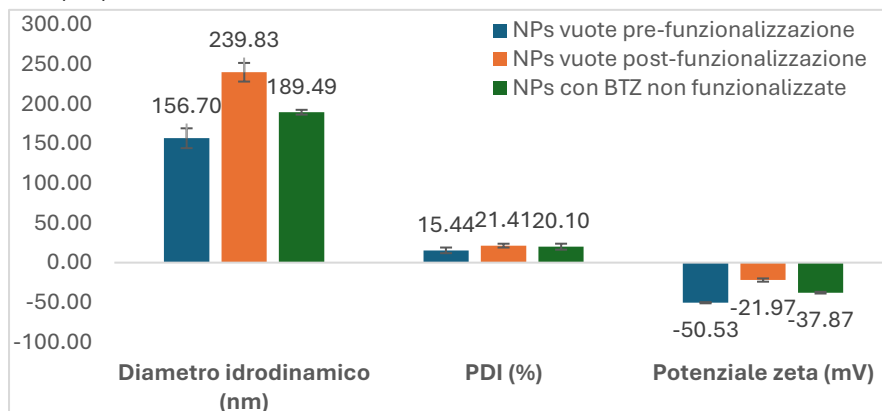


Grafico 1: confronto dei risultati ottenuti dall'analisi con il DLS

Resa del processo di sintesi delle nanoparticelle ed efficacia di incapsulamento del farmaco

Mediando i risultati ottenuti da ciascun campione, la resa risulta essere pari a $73.06 \pm 18.72 \%$, mentre l'efficacia di incapsulamento del farmaco risulta essere pari a $6.98 \pm 1.31 \%$.

Rilascio di farmaco

Nel *Grafico 2* è riportato l'andamento del rilascio del farmaco in funzione del tempo.

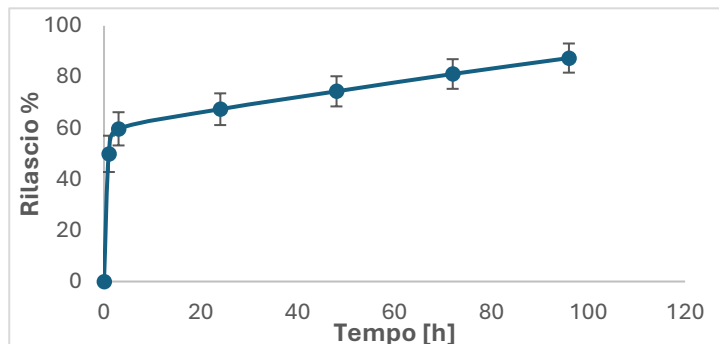


Grafico 2: rilascio di BTZ in funzione del tempo

Si nota che il rilascio a 1 h, che caratterizza l'entità del burst release osservato, è pari circa alla metà del farmaco incapsulato e che, ai time point successivi, il rilascio di farmaco aumenta ulteriormente (con un andamento pressoché lineare) fino ad arrivare intorno al 90%, evidenziando quindi un rilascio pressappoco completo entro l'ultimo time point analizzato.

Quantificazione indiretta della funzionalizzazione con BSA tramite saggio BCA

La resa del processo di funzionalizzazione risulta essere pari a $36.08 \pm 10.95 \%$.

Al termine dell'incubazione, si è, inoltre, osservato un cambiamento di colore macroscopico da verde a viola. Infatti, il colore verde iniziale era dovuto agli ioni rame Cu^{2+} presenti in soluzione. A seguito dell'interazione delle proteine con gli ioni rame Cu^{2+} , questi si riducono a Cu^{1+} e vengono chelati dal BCA, dando di conseguenza la colorazione viola. Il colore viola è, quindi, proporzionale alla quantità di proteine in soluzione: più BSA è presente più la colorazione viola sarà intensa.

Analisi con QCM-D

Nei grafici sottostanti sono state rappresentate la variazione di frequenza in funzione del tempo (*Grafico 3a*) e la variazione di dissipazione in funzione del tempo (*Grafico 3b*). Lo 0 corrisponde in entrambi i grafici alla condizione di partenza costituita da nanoparticelle polimeriche non funzionalizzate.

In entrambi i grafici si osservano tre regioni. Partendo da sinistra, la prima regione corrisponde all'aggraffaggio dei lipidi, che stanno formando lo shell attorno al core polimerico. La seconda regione è, invece, relativa all'aggiunta di una fase che, come si vede dal *Grafico 3b*, comporta irrigidimento (ad esempio potrebbe essere avvenuta una reticolazione). Infine, la terza regione è legata all'aggraffaggio dell'albumina.

Nel *Grafico 3a* si osserva, inoltre, una risalita delle frequenze alla fine della prima e della terza regione, che potrebbe essere dovuta al lavaggio.

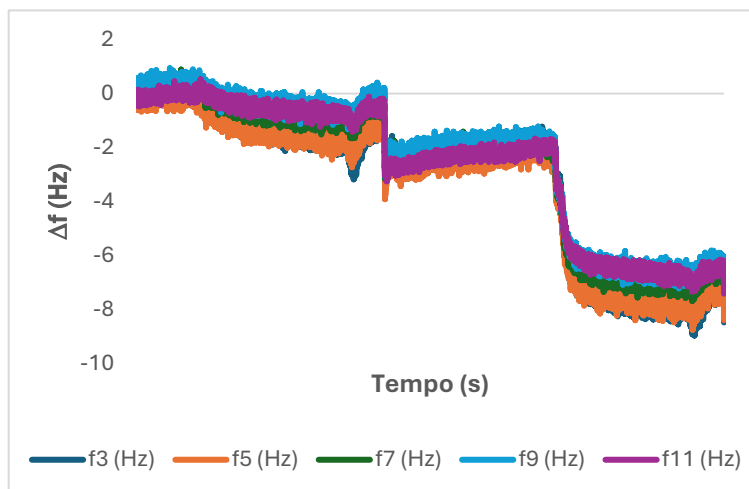


Grafico 3a: Δf in funzione del tempo

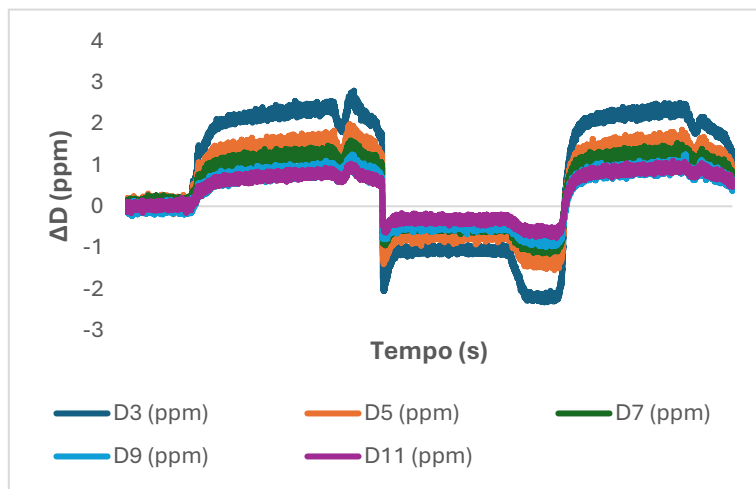
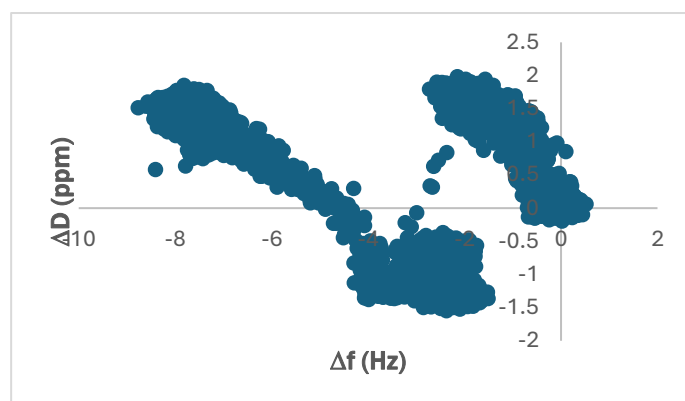


Grafico 3b: ΔD in funzione del tempo

Scegliendo l'armonica 5, è stato rappresentato anche il grafico $\Delta D-\Delta f$ (Grafico 3c), in cui sono nuovamente visibili le tre fasi. In particolare, le nuvole di punti corrispondono ai plateau e indicano che la fase è avvenuta, mentre le "linee" formate dai punti rimanenti indicano il passaggio da una fase all'altra. La densità di punti di queste "linee" è inversamente correlata alla velocità del processo.

Grafico 3c: $\Delta D-\Delta f$



È quindi possibile risalire, tramite l'equazione di Sauerbrey, alla massa totale che si è depositata, che risulta pari a 40.9 ng, di cui 29.3 ng corrispondono alla massa dell'albumina.

Vitalità cellulare

Mediando i risultati ottenuti dalle tre misure, si ottengono i grafici sottostanti (Grafico 4a, Grafico 4b).

Nel Grafico 4a viene riportata la vitalità cellulare percentuale a ciascun time point relativa alla somministrazione di nanoparticelle vuote, mentre il Grafico 4b si riferisce all'utilizzo di nanoparticelle contenenti BTZ.

Si osserva che i campioni di cellule trattate con nanoparticelle vuote non evidenziano una riduzione significativa di vitalità cellulare nel tempo, al contrario di quelle trattate con nanoparticelle cariche di farmaco, che, invece, come ci si aspettava, risultano più efficienti nel ridurre la vitalità delle cellule tumorali rispetto a quelle vuote. In particolare, la concentrazione più efficace di nanoparticelle caricate con il BTZ risulta essere di 50 $\mu\text{g/mL}$, in cui la vitalità cellulare residua, dopo 72 h, appare diminuita circa del 70% rispetto a quella iniziale.

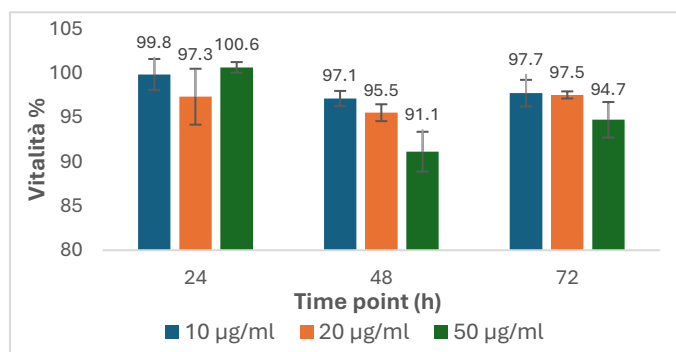


Grafico 4a: NPs vuote

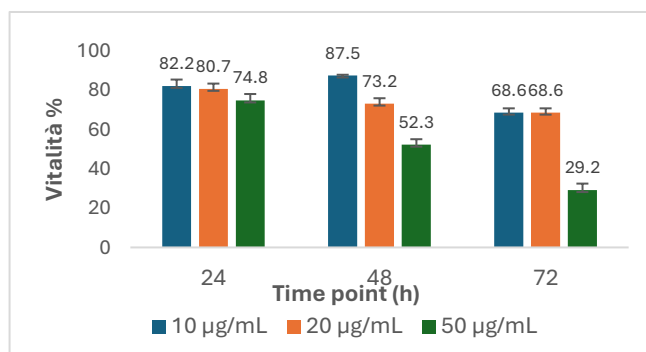


Grafico 4b: NPs incapsulanti BTZ

2) Caratterizzazione NPs2

Efficacia di incapsulamento (EE%) e rilascio di siRNA valutati tramite Qubit™ ed elettroforesi

Dall'analisi al Qubit™, risulta un'efficacia di incapsulamento del siRNA pari a 98.74%, che conferma come un rapporto N/P ottimale consenta un efficace incapsulamento, riducendo la quantità di siRNA disperso nel surnatante.

Il Grafico 5 riporta, invece, il rilascio percentuale di siRNA ai diversi time point. Si osservano un burst release di entità contenuta (circa 6%) ed un rilascio graduale, che confermano la stabilità di queste nanoparticelle in condizioni fisiologiche.

Anche la valutazione qualitativa del rilascio di siRNA tramite elettroforesi conferma che il rilascio dopo 30 minuti risulta estremamente basso, tanto che risulta difficile l'identificazione a occhio nudo delle bande di rilascio, a differenza degli standard.

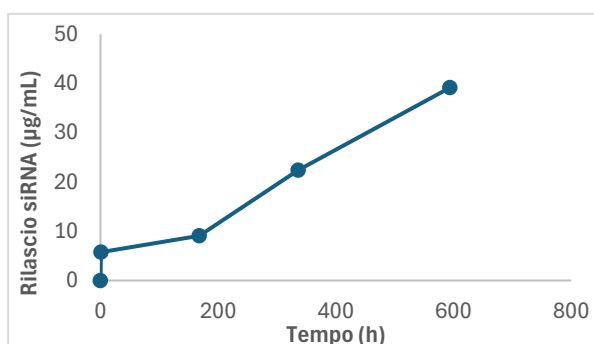


Grafico 5: valutazione quantitativa del rilascio di siRNA tramite Qubit™

3) Valutazione dell'internalizzazione delle NPs da parte delle cellule della microglia e creazione del modello tumorale tridimensionale.

Internalizzazione delle NPs da parte delle cellule della microglia

Dall'analisi al FACS emerge che circa il 36% delle NPs1 viene internalizzato (Grafico 6b), mentre l'internalizzazione delle NPs2 risulta superiore al 99% (Grafico 6c). Somministrando entrambe le NPs, l'internalizzazione delle NPs2 rimane pressoché completa, mentre quella relativa alle NPs1 scende leggermente (32%), poiché le NPs2 hanno più affinità con le cellule, per cui sono preferite in caso di somministrazione mista (Grafico 6d).

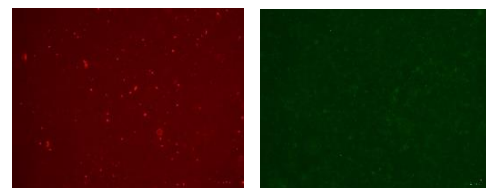


Figura 1: somministrazione di entrambe le NPs. A sx sono marcate le NPs1, a dx le NPs2.

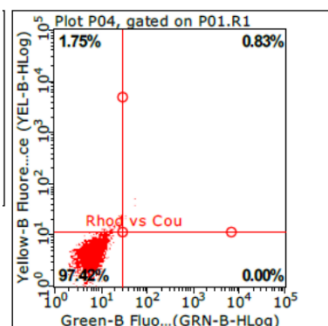


Grafico 6a: controllo

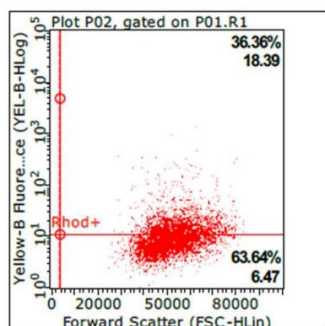


Grafico 6b: NPs1

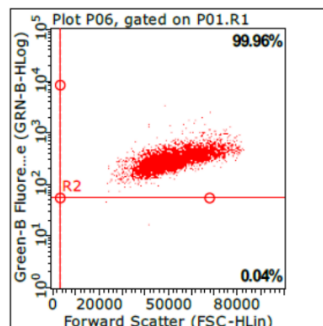


Grafico 6c: NPs2

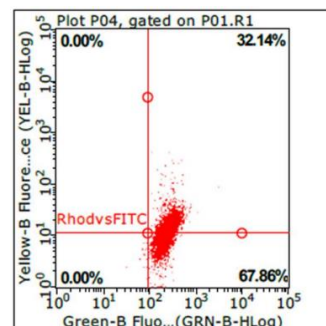


Grafico 6d: somministrazione mista

Analisi reologiche su idrogel in sola GelMA

Dallo strain sweep test si è ottenuto il Grafico 7, che rappresenta l'andamento dei moduli di taglio G' e G'' in relazione alla deformazione percentuale. La regione di viscoelasticità lineare risulta essere fino a $\gamma_L = 47.62\%$, dopodiché l'idrogel inizia ad andare incontro a progressivo fallimento meccanico fino a $\gamma_f = 311.20\%$, dove si ha l'intersezione tra G' e G'' e quindi il fallimento meccanico dell'idrogel.

Si osserva che si è ottenuto un gel con un network ben formato, poiché nella regione viscoelastica lineare $G' > G''$, con una distanza superiore a un ordine di grandezza. Questo è coerente con quello che ci si aspettava, dal momento che la GelMA è prevalentemente allo stato di gel al di sotto della temperatura di fine transizione sol-gel, che il temperature ramp test (Grafico 8) ha rilevato essere intorno ai 25°C (in particolare, è stata identificata la temperatura in cui inizia la transizione da gel a sol a $T_1 = 12.9^\circ\text{C}$, determinandola come il primo punto di decremento apprezzabile della viscosità, e la temperatura di fine transizione a $T_2 = 25.9^\circ\text{C}$, determinandola come il punto di primo assestamento della viscosità) e l'analisi è stata condotta a 20°C .

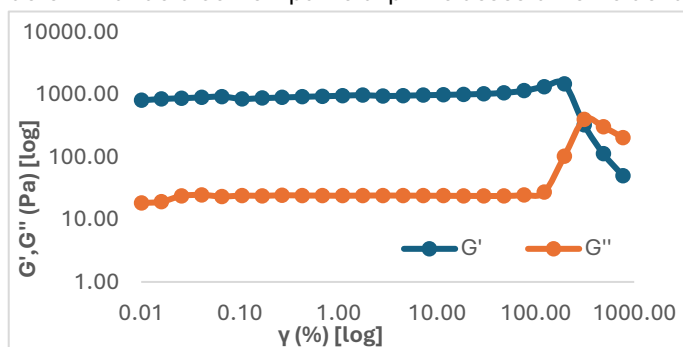


Grafico 7: strain sweep test

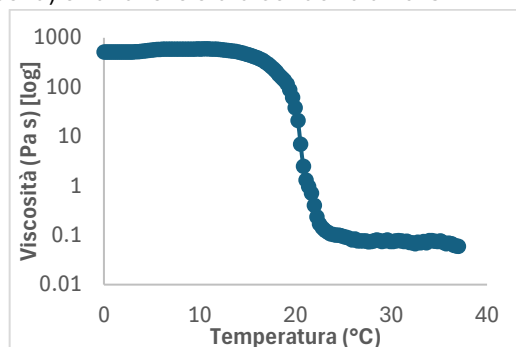


Grafico 8: temperature ramp test

Dal frequency sweep test si osserva nel primo caso ($T=20^\circ\text{C}$), analogamente a prima, $G' > G''$, con una distanza tra i due di almeno un ordine di grandezza, il che indica un gel completamente sviluppato (Grafico 9a).

Conducendo l'analisi a 37°C , invece, si osserva $G'' > G'$, quindi si è nella condizione di sol fino al punto di intersezione di G' e G'' , alla frequenza angolare di 100 rad/s (Grafico 9b).

Dal frequency sweep test si è ottenuta anche la conferma dell'avvenuto processo di reticolazione a seguito di irraggiamento. Infatti, prima della reticolazione, si osserva $G'' > G'$, che indica una condizione di sol (Grafico 10a), mentre dopo la reticolazione $G'' \ll G'$, coerentemente con una condizione di gel (Grafico 10b).

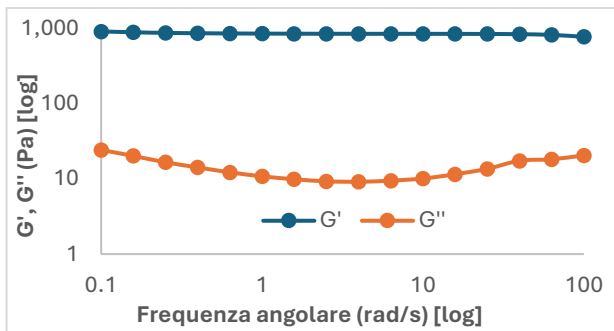


Grafico 9a: frequency sweep test ($T=20^{\circ}\text{C}$)

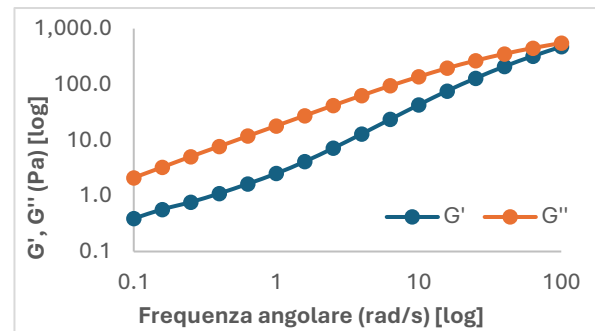


Grafico 9b: frequency sweep test ($T=37^{\circ}\text{C}$)

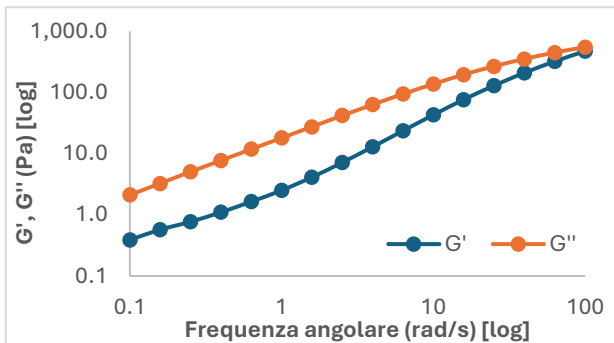


Grafico 10a: frequency sweep test pre-irraggiamento

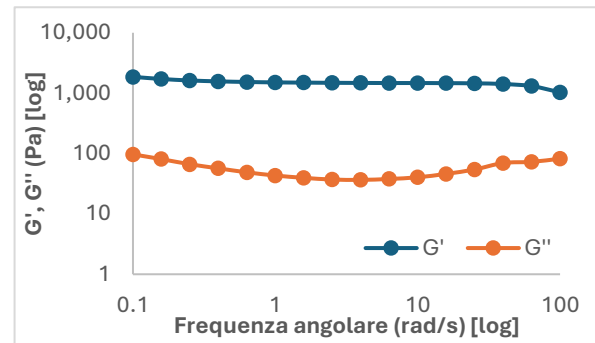


Grafico 10b: frequency sweep test post-irraggiamento

Analisi reologiche per confronto idrogelo in GelMA e idrogelo in GelMA/HA

Dal time sweep test (Grafico 11), si osserva che l'idrogelo in GelMA/HA richiede più tempo rispetto all'idrogelo in sola GelMA per far partire la reticolazione. Questo è dovuto alle molecole di HA, che sono delle molecole più grandi che vanno a "disturbare" il processo di reticolazione. Questo porta anche ad una minor variazione di G' rispetto a quella che si ha nell'idrogelo in GelMA. Alla fine del processo, tuttavia, si osserva che l'idrogelo in GelMA/HA risulta essere più reticolato, a causa di un punto di partenza più viscoso dovuto alla maggiore concentrazione polimerica.

Si osserva inoltre che nell'idrogelo in GelMA, nel tratto in cui non è ancora avvenuta la reticolazione, la misura di G' risulta essere molto rumorosa proprio a causa di una viscosità nettamente inferiore e molto vicina agli estremi inferiori di capacità di misura dello strumento alla temperatura di 25°C a cui è stato effettuato il test.

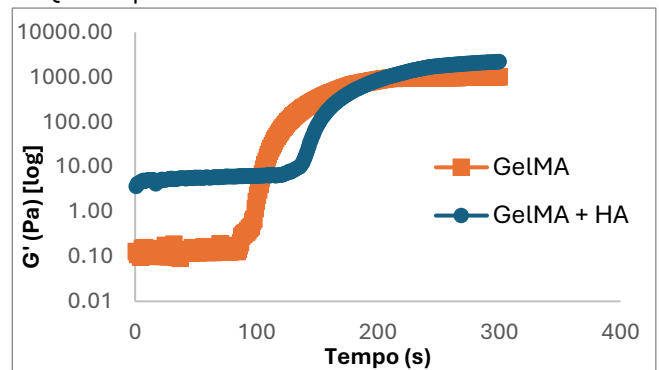


Grafico 11: time sweep test

Dallo strain sweep test (Grafico 12), invece, si osserva che, nonostante il test sia stato condotto a 37°C , gli idrogeli si trovano nella condizione di gel, perchè la reticolazione fa perdere la proprietà di termosensibilità.

Il primo tratto risulta lineare, poiché G' e G'' sono pressoché costanti, con valori un po' più alti nel caso dell'idrogelo in GelMA/HA, il che vuol dire che questo avrà una resistenza meccanica maggiore, dovuta alla maggior concentrazione polimerica di questa formulazione. Si osserva però che va incontro a fallimento meccanico per deformazioni minori ($\gamma_f = 195\%$) rispetto all'idrogelo in sola GelMA ($\gamma_f = 311\%$). Inoltre, nel caso dell'idrogelo in

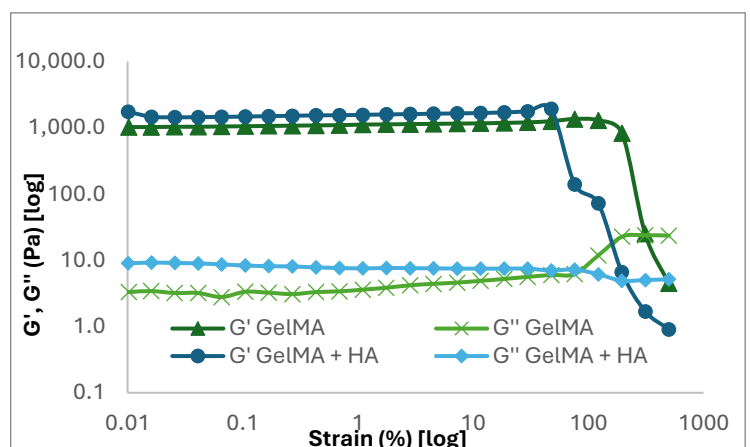


Grafico 12: strain sweep test

GelMA/HA, la regione di viscoelasticità lineare risulta più piccola e la distanza tra γ_L e γ_T risulta maggiore, il che denota una maggior resistenza alla propagazione delle cricche.

Nel tratto finale della curva relativa a G'' dell'idrogelato in sola GelMA, si osserva una salita, relativa al processo di hardening, che non si osserva invece nell'idrogelato in GelMA/HA, perché la presenza di molecole di HA fa perdere all'idrogelato questa caratteristica.

Dalla prova di swelling (Grafico 13) si osserva come si abbia un rigonfiamento maggiore nel caso dell'idrogelato in GelMA/HA, poiché le molecole di HA vanno ad allargare la maglia dell'idrogelato.

Dalla prova di permeabilità (Grafico 14) si osserva invece che, in generale, la permeabilità risulta superiore per l'idrogelato in GelMA/HA, soprattutto nel breve tempo, in cui si evidenzia in entrambi i casi una diffusione più rapida. Dopo 24 h, la permeabilità dell'idrogelato in GelMA/HA continua a risultare superiore nel caso di molecole con PM elevato (come la FD70), a causa della maggiore dimensione delle maglie, che permette una migliore diffusione di molecole di maggiore dimensione.

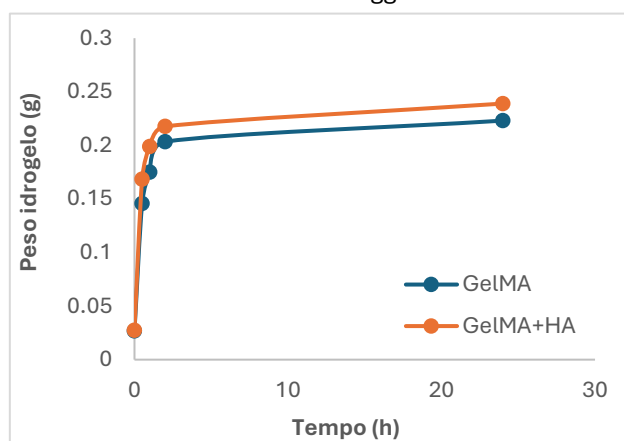


Grafico 13: prova di swelling

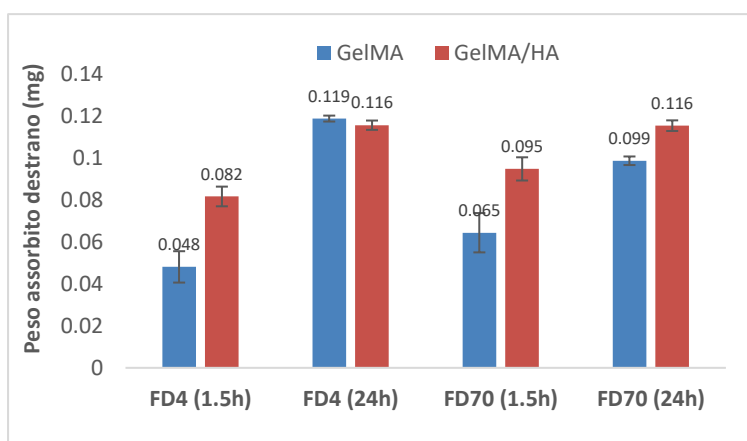


Grafico 14: prova di permeabilità

Analisi in fluorescenza del modello tumorale

Le immagini in fluorescenza ottenute dimostrano come le cellule della microglia siano in grado di migrare verso lo sferoide e di penetrare al suo interno (Figura 2a, cellule della microglia marcate in rosso), riuscendo quindi a portare all'interno dello sferoide le nanoparticelle (Figura 2b, cellule della microglia marcate in rosa e nanoparticelle marcate in rosso).

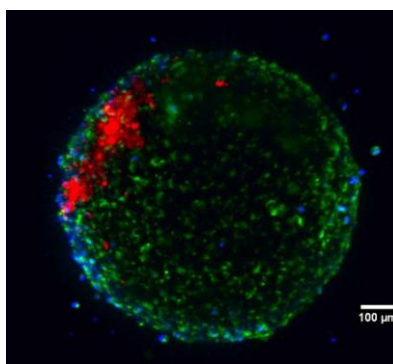


Figura 2a: sferoide contenente cellule della microglia

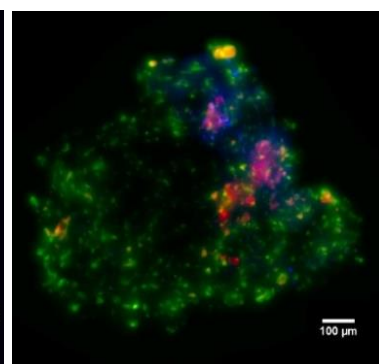


Figura 2b: sezione dello sferoide contenente NPs internalizzate in cellule della microglia

Conclusioni

I risultati ottenuti confermano il potenziale delle nanoparticelle sviluppate per applicazioni terapeutiche mirate nel trattamento del glioblastoma. Le NPs1 hanno dimostrato una significativa riduzione della vitalità cellulare tumorale, in particolare a concentrazioni elevate, grazie al rilascio efficiente del farmaco incapsulato. Le NPs2, invece, si sono distinte per l'elevata efficacia di incapsulamento e il rilascio controllato di siRNA, garantendo stabilità nel tempo. L'analisi in fluorescenza ha evidenziato la capacità delle cellule della microglia di internalizzare le nanoparticelle, in particolare le NPs2, e di trasportarle efficacemente all'interno di modelli tridimensionali di tumore.

Questi risultati sottolineano il potenziale combinato di nanoparticelle e vettori biologici come approccio promettente per terapie antitumorali e geniche innovative. Ulteriori studi sono necessari per ottimizzare la somministrazione e valutare l'efficacia in sistemi più complessi.