



RAPPORTI ISTISAN 18|15

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Dispositivi medici contenenti nanomateriali: caratterizzazione ultrastrutturale, microanalitica e tossicologica *in vitro*

A cura di
B. De Berardis e F. Superti



TECNOLOGIE
E SALUTE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Dispositivi medici contenenti nanomateriali:
caratterizzazione ultrastrutturale,
microanalitica e tossicologica *in vitro***

A cura di
Barbara De Berardis e Fabiana Superti
Centro Nazionale Tecnologie Innovative in Sanità Pubblica

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**Rapporti ISTISAN
18/15**

Istituto Superiore di Sanità

Dispositivi medici contenenti nanomateriali: caratterizzazione ultrastrutturale, microanalitica e tossicologica *in vitro*.

A cura di Barbara De Berardis e Fabiana Superti

2018, iii, 41 p. Rapporti ISTISAN 18/15

Il presente rapporto riunisce i risultati, i materiali e i contributi originali prodotti dalle ricerche condotte da due Unità Operative (UO) nell'ambito del Progetto "RinnovareNano". Lo scopo del progetto, finanziato dalla Regione Lazio, è stato quello di incoraggiare la sinergia tra le imprese presenti nel territorio e l'Istituto Superiore di Sanità al fine di garantire un uso sicuro e responsabile dei nanomateriali. Obiettivo delle due UO è stato quello di acquisire dati utili all'implementazione dei metodi di caratterizzazione e alla trasferibilità di metodi *in vitro* per la valutazione della sicurezza biologica di dispositivi medici portatori di nanostrutture (nanostrutturati).

Parole chiave: Nanomateriali; Dispositivi medici, Caratterizzazione fisico-chimica; Microscopia elettronica; Microanalisi a raggi X; Valutazione del rischio

Istituto Superiore di Sanità

Medical devices containing nanomaterials: ultrastructural, microanalytical and toxicological *in vitro* characterization.

Edited by Barbara De Berardis and Fabiana Superti

2018, iii, 41 p. Rapporti ISTISAN 18/15 (in Italian)

This report brings together the results, the materials and the original contributions produced by the research conducted by two Working Groups (WGs) as part of the "RinnovareNano" project. The aim of the project, funded by the Lazio Region, was to encourage the synergy between the companies present in the territory and the Istituto Superiore di Sanità in order to guarantee a safe and responsible use of nanomaterials. The two WG purpose was to acquire useful data for the characterization method implementation and for the transferability of *in vitro* methods useful for the evaluation of biological safety of nanostructured medical devices.

Key words: Nanomaterials; Medical devices; Physico-chemical characterization; Electron microscopy; X-ray microanalysis; Risk assessment

Per informazioni su questo documento scrivere a: barbara.deberardis@iss.it, fabiana.superti@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

De Berardis B, Superti F (Ed.). *Dispositivi medici contenenti nanomateriali: caratterizzazione ultrastrutturale, microanalitica e tossicologica in vitro*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2018. (Rapporti ISTISAN 18/15).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



INDICE

Presentazione	iii
----------------------------	-----

1. Caratterizzazione ultrastrutturale e microanalitica di dispositivi medici contenenti nanomateriali

Barbara De Berardis, Fabiana Superti

1.1. Introduzione	1
1.2. Caratterizzazione dei dispositivi medici contenenti nanomateriali	3
1.2.1. Preparazione e analisi dei campioni per la caratterizzazione ultrastrutturale e microanalitica di DM-NP	4
1.2.2. Preparazione e analisi dei campioni per la caratterizzazione ultrastrutturale e microanalitica del nanomateriale di riferimento	4
1.3. Risultati della caratterizzazione dei DM-NP e del nanomateriale di riferimento	5
1.3.1. Determinazione delle caratteristiche fisico-chimiche dell'argento colloidale (DM-NP 1) mediante TEM e FESEM/EDX	5
1.3.2. Caratterizzazione fisico-chimica del cerotto con nanocristalli di argento (DM-NP 2) mediante FESEM/EDX	7
1.3.3. Valutazione del rilascio di nanoparticelle dal DM-NP 2 mediante FESEM/EDX	11
1.3.4. Determinazione delle caratteristiche fisico-chimiche del nanomateriale di riferimento "as received"	13
1.4. Caratterizzazione delle sospensioni utilizzate nei saggi di tossicità	13
1.4.1. Sospensioni di DM-NP 1 in DMEM-HG usate nei saggi <i>in vitro</i>	13
1.4.2. Estratti del DM-NP 2 usati nei saggi di citotossicità	14
1.4.3. Sospensioni di AgNM20 in H ₂ O Milli-Q-BSA (0,05% w/v)	15
1.4.4. Sospensioni di AgNM20 utilizzate nei saggi <i>in vitro</i>	16
1.5. Conclusioni	18
Bibliografia	19

2. Valutazione della citotossicità di dispositivi medici nanostrutturati a base di nanoparticelle di argento

Fabiana Superti, Agostina Pietrantonì, Magda Marchetti, Barbara De Berardis

2.1. Introduzione	20
2.2. Tossicità <i>in vitro</i> di dispositivi medici contenenti nanomateriali	21
2.2.1. Cellule	23
2.2.2. DM-NP e NP di controllo	23
2.2.3. Metodo di preparazione del campione	23
2.2.4. Test colorimetrici	24
2.2.4.1. Saggio del Rosso Neutro	24
2.2.4.2. Test MTT	24
2.2.4.3. Controlli interni ai test	24
2.2.4.4. Analisi dei dati e criteri di accettabilità	25
2.2.5. DM-NP 1: test di citotossicità (saggio diretto)	25
2.2.6. DM-NP 2: test di citotossicità (saggio previa estrazione)	26

2.2.7. Valutazione morfologica della citotossicità: microscopia elettronica a scansione.....	27
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	27
2.3. Risultati degli studi <i>in vitro</i>	28
2.3.1. Test di citotossicità (controlli)	28
2.3.2. DM-NP 1: test di citotossicità (saggio diretto).....	30
2.3.3. DM-NP 1: valutazione morfologica della citotossicità tramite FESEM	33
2.3.4. DM-NP 1: valutazione morfologica della citotossicità tramite TEM	34
2.3.5. DM-NP 2: VALUTAZIONE della citotossicità tramite saggio del Rosso Neutro e test MTT (saggio previa estrazione)	35
2.3.6. DM-NP 2: valutazione morfologica della citotossicità tramite FESEM.....	36
2.3.7. DM-NP 2: valutazione morfologica della citotossicità di AgNM20 tramite FESEM/EDX.....	38
2.3.8. DM-NP 2: valutazione morfologica della citotossicità tramite TEM	38
2.4. Conclusioni	39
Bibliografia	40

PRESENTAZIONE

Il presente rapporto riunisce i risultati, i materiali e i contributi originali prodotti dalle ricerche condotte da due Unità Operative (UO) nell'ambito del Progetto "RinnovareNano - Ricerca e innovazione responsabile delle nanotecnologie: valutazione della sicurezza e adeguamento normativo, a supporto dello sviluppo industriale, e realizzazione di una piattaforma informativa sulle nanotecnologie finalizzata all'accesso e alla diffusione delle conoscenze" finanziato dalla Regione Lazio e condotto nel periodo 2015-2018. Lo scopo del Progetto era la realizzazione di strumenti e lo sviluppo di azioni di supporto alle realtà industriali della regione, coinvolte in attività di ricerca e innovazione nel settore delle nanotecnologie, per la valutazione del rischio di nanomateriali (NM) in differenti ambiti applicativi: chimico, cosmetico, farmaceutico, agroalimentare e biomedicale.

In particolare in ambito biomedico obiettivo delle due UO del Progetto era l'acquisizione di dati utili all'implementazione dei metodi di caratterizzazione e alla trasferibilità di metodi *in vitro* per la valutazione della sicurezza biologica di dispositivi medici portatori di nanostrutture (nanostrutturati). A tal fine è stata utilizzata la norma ISO 10993-5 per i dispositivi medici, integrandola con le considerazioni della Opinion del Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENHIR), della ISO/TR 10993-22 e le linee guida del Working Party on Manufactured Nanomaterial (WPMN) dell'Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), relative alla caratterizzazione fisico-chimica degli NM per la valutazione della loro sicurezza (OECD ENV/JM/MONO(2012)40).

Il rapporto è stato strutturato in due sezioni distinte: la prima, dedicata agli aspetti attinenti la caratterizzazione fisico/chimica di NM e di dispositivi medici contenenti NM; la seconda inerente alla messa a punto di protocolli per la caratterizzazione *in vitro* del potenziale tossicologico di NM e di dispositivi medici contenenti NM a supporto dell'analisi dei rischi ad essi collegati.

Barbara De Berardis e Fabiana Superti
Centro Nazionale Tecnologie Innovative in Sanità Pubblica

1. CARATTERIZZAZIONE ULTRASTRUTTURALE E MICROANALITICA DI DISPOSITIVI MEDICI CONTENENTI NANOMATERIALI

Barbara De Berardis, Fabiana Superti

Centro Nazionale Tecnologie Innovative in Sanità Pubblica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

1.1. Introduzione

Le nanotecnologie sono largamente utilizzate in una grande varietà di applicazioni e la nanomedicina e, più in generale, i Dispositivi Medici (DM) rappresentano uno dei campi più promettenti.

La ricerca e lo sviluppo delle nanotecnologie mirano a utilizzare le peculiari proprietà fisiche, chimiche e biologiche dei NanoMateriali (NM) o di materiali nanostrutturati per applicazioni nel campo della diagnostica, del “drug-delivery”, della medicina rigenerativa e dei DM. Gli NM possono essere presenti nei DM in diversi modi: possono trovarsi nei compositi per il riempimento dentale, essere liberi, come ad esempio nel “drug-delivery”, aggiunti come agenti antibatterici in medicazioni di ferite, usati nei rivestimenti di impianti per prevenire infezioni e migliorare la biocompatibilità del DM, oppure inglobati al fine di rafforzare i biomateriali.

Gli Organismi Notificati hanno identificato nanotubi di carbonio nei cementi ossei, polveri di nano-idrossiapatite nel riempimento osseo, nano-ceramiche nei materiali per la ricostruzione dei denti, NanoParticelle (NP) di argento come rivestimento di impianti e cateteri o come agente antibatterico nella medicazione di ferite.

Le possibili applicazioni degli NM nei DM implicano una potenziale esposizione agli NM stessi. Il potenziale rischio derivante dall'uso di DM contenenti NM o nanostrutturati (DM di seguito indicati come DM-NP) è associato principalmente alla possibilità di rilascio degli NM liberi da parte dei DM. Tuttavia non possono essere esclusi eventuali effetti tossici degli NM che rimangono ancorati al DM, dovuti alla loro composizione chimica e/o alla loro maggiore reattività. Numerosi studi tossicologici, infatti, hanno mostrato che l'attività biologica degli NM e la loro interazione con le strutture subcellulari non possono essere predette dalle proprietà delle sostanze e dei composti chimici costituenti. Ne segue che è fondamentale la valutazione della sicurezza dei DM-NP, vista la loro attesa crescente applicazione in ambito sanitario, così come l'identificazione e la caratterizzazione dettagliata degli NM presenti nei DM.

La Commissione Europea ha pubblicato due proposte di revisione della legislazione sui DM: una sui DM (COM (2012) 542) e una sui DM-diagnostici *in vitro* (COM (2012) 541). Esse comprendono una definizione degli NM, tratta dalla raccomandazione 2011/696 / UE della Commissione, e disposizioni sulla classificazione del rischio, l'etichettatura e le istruzioni per l'uso di DM contenenti NM. Inoltre nei requisiti generali di sicurezza è rivolta particolare attenzione alla progettazione e produzione di DM in modo tale da ridurre al minimo i rischi legati alle dimensioni e alle proprietà delle particelle utilizzate. La proposta di revisione pone i DM-NP nella classe di rischio più elevato (classe III) a causa delle incertezze ancora associate ai potenziali rischi derivanti dall'esposizione agli NM.

Nella norma europea ISO 10993-1 “Valutazione biologica dei dispositivi medici Parte 1- Valutazione e prove nell’ambito di un processo di gestione dei rischi” (1), sono incluse considerazioni generali su come eseguire una valutazione della sicurezza biologica del DM, in base alla categoria del DM, alla sua applicazione e al suo utilizzo, e quindi alla sua posizione e tempo di contatto con i tessuti. La norma ISO 10993-1: 2009 (1) contiene una serie di test per la valutazione della sicurezza biologica in base all’uso del DM. Le parti successive della serie ISO 10993 descrivono aspetti o metodi di prova più specifici. Tale normativa è inerente alla valutazione della biocompatibilità e tossicità di biomateriali tradizionali, non degli NM o materiali nanostrutturati e quindi non è specifica per i DM-NP.

Visto il crescente impiego degli NM nel campo dei DM, la Commissione Europea ha richiesto allo SCENIHR una “Opinion on the guidance on the determination of potential health effects of nanomaterials used in medical devices” sulla valutazione del rischio dei DM-NP (2). Essa tiene conto delle due categorie di DM (invasivi e non-invasivi) e si pone l’obiettivo di fornire un contributo utile per la classificazione delle diverse categorie dei DM-NP in base al loro livello di rischio. Lo SCENIHR (2) evidenzia la necessità di identificare e caratterizzare da un punto di vista fisico-chimico gli NM presenti nel DM in tutti gli stadi del processo di realizzazione del DM, dallo stadio della sua progettazione, del suo sviluppo, fino alla sua realizzazione finale. In tale documento, fondamentali per l’identificazione dell’esposizione all’NM presente nel DM e per la valutazione delle sue proprietà fisico-chimiche nel DM finale sono la caratterizzazione dell’NM usato come materiale di partenza per realizzare il DM e la valutazione del potenziale rilascio dell’NM dal DM stesso. Recentemente è stata redatta una nuova norma ISO/TR 10993-22 per la valutazione biologica dei dispositivi medici che contiene una sezione (Parte 22) con la guida agli NM (3). Questo documento fornisce un quadro generale su gli aspetti più importanti che devono essere considerati nel valutare la sicurezza dei DM-NM e indica il modo in cui le altre parti della serie ISO 10993 possono essere utilizzate quando si tratta della valutazione degli NM. In generale le procedure descritte nella serie ISO 10993 possono essere utilizzate per la valutazione biologica di quei DM che contengono NM che non sono rilasciati da tale dispositivo, in quanto parte integrante dello stesso. La guida sottolinea la necessità di testare l’NM presente nel DM e, in caso di rilascio, gli NM rilasciati dal DM stesso. In particolare la norma ISO/TR 10993-22 (3) include considerazioni sulla caratterizzazione degli NM, sulla preparazione dei campioni per la loro valutazione, sul rilascio degli NM o nano-oggetti da parte del DM e sulla valutazione biologica degli NM. Non sono forniti protocolli dettagliati né per la caratterizzazione dei DM-NP né per i saggi *in vitro* per la valutazione della loro sicurezza biologica.

L’obiettivo dell’attività di ricerca svolta nell’ambito del progetto “RinnovareNano - Ricerca e innovazione responsabile delle nanotecnologie: valutazione della sicurezza e adeguamento normativo, a supporto dello sviluppo industriale, e realizzazione di una piattaforma informativa sulle nanotecnologie finalizzata all’accesso e alla diffusione delle conoscenze” consiste nell’acquisire dati utili all’implementazione dei metodi di caratterizzazione e alla trasferibilità di metodi *in vitro* per la valutazione della sicurezza biologica di DM-NM. Per raggiungere tale obiettivo è stata utilizzata la norma ISO 10993-5 (4) per i dispositivi medici, integrandola con le considerazioni della Opinion dello SCENHIR, della ISO/TR 10993-22 (2, 3) e le linee guida del Working Party on Manufactured Nanomaterial (WPMN) dell’Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), relative alla caratterizzazione fisico-chimica degli NM per la valutazione della loro sicurezza (5).

Sono stati selezionati due diversi tipi di DM-NP: argento (Ag) colloidale (DM-NP 1) contenente nanoparticelle libere, ben disperse in un liquido grazie alla loro carica elettrica e sottoposte al moto Browniano e un cerotto avente al suo interno una superficie nanostrutturata

in Ag (DM-NP 2). In Tabella 1 sono riportate le caratteristiche del DM-NP 1 indicate dal fornitore e quelle del DM-NP 2 reperibili in letteratura (6, 7). Poiché, secondo quanto suggerito dallo SCENIHR (2), è opportuno caratterizzare l'NM utilizzato per realizzare i DM-NP, è stato selezionato, come NM di riferimento, Ag con dimensioni di 20 nm (AgNM20 della Nanostructured and Materials IncAmorphous, purezza 99%) comparabili a quelle dell'NM presente nei due DM-NP oggetto di studio. La caratterizzazione dei DM-NP e dell'NM di riferimento è stata effettuata mediante microscopia elettronica analitica: microscopia elettronica a trasmissione (*Transmission Electron Microscopy*, TEM) e 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).

Tabella 1. Caratteristiche dell'Ag colloidale (DM-NP 1) e del cerotto nanostrutturato (DM-NP 2)

Caratteristiche dei DM-NP	DM-NP 1	DM-NP 2
Concentrazione Ag totale	5,00 ± 0,05 ppm	0,69-1,64 mg/cm ²
Concentrazione Ag in forma ionica	4,78 ± 0,05 ppm	N,D
Concentrazione Ag in forma particellare	1,10 ± 0,05 ppm	N,D
Diametro medio particelle	27,49 nm	16 nm

1.2. Caratterizzazione dei dispositivi medici contenenti nanomateriali

La caratterizzazione di un DM prevede la determinazione delle proprietà fisiche, chimiche, e meccaniche del materiale con cui è realizzato il DM.

Lo SCENIHR (2), in accordo con altri organismi internazionali, quali l'OECD e l'EFSA (European Food Safety Agency), ha individuato le caratteristiche fisico-chimiche che giocano un ruolo nell'induzione dei meccanismi di tossicità e quindi nella valutazione della sicurezza dei DM-NP. Le principali sono: dimensione primaria, distribuzione dimensionale, forma, area di superficie specifica, struttura cristallina, composizione chimica, reattività di superficie, carica di superficie, solubilità.

La caratterizzazione degli NM è complessa, specialmente se l'NM è presente in una matrice, come può accadere nel caso dei DM-NP. Lo SCENIHR (2) fornisce un elenco di tecniche analitiche da utilizzare per ciascun parametro di interesse nella caratterizzazione dei DM. Negli ultimi anni, infatti, sono state sviluppate varie tecniche analitiche per la determinazione della dimensione e della distribuzione dimensionale degli NM, basate prevalentemente su fenomeni fisici osservati nell'interazione delle particelle o su forze su scala nanometrica. Poiché non esiste una singola tecnica analitica in grado di determinare la distribuzione dimensionale nell'intervallo 1-100 nm in maniera soddisfacente, il WPMN, l'EFSA e altri organismi internazionali dichiarano che per la determinazione della dimensione delle NP bisognerebbe usare differenti tecniche a seconda dello stato in cui si presenta l'NM, quindi in polvere, disperso in un liquido o inglobato in un materiale solido o in una matrice. Una delle tecniche adottate per determinare la dimensione e la distribuzione dimensionale e quindi per identificare un NM in un prodotto di consumo o in un DM deve essere la Microscopia Elettronica (ME). La ME presenta il vantaggio di determinare per ogni singola particella dimensione, forma, struttura cristallina e, se abbinata a uno spettrometro a raggi X a dispersione di energia, consente di determinarne la composizione chimica. Il limite principale

è rappresentato dal fatto che essa non consente un'analisi quantitativa del campione e richiede tempi di analisi lunghi ed esperienza dell'operatore.

1.2.1. Preparazione e analisi dei campioni per la caratterizzazione ultrastrutturale e microanalitica di DM-NP

Per la caratterizzazione morfologica-ultrastrutturale e microanalitica a raggi X il DM-NP 1 è stato analizzato così come fornito dalla ditta produttrice.

I campioni per l'analisi TEM del DM-NP 1 sono stati preparati prelevando 10 μ L dalla sospensione del dispositivo, trasferiti su retini di Cu per TEM (400 maglie) rivestiti di un sottile film di C.

Per l'analisi al TEM (EM 208, FEI company) è stata utilizzata una tensione del fascio di elettroni pari a 80KV e un ingrandimento di 56.000x.

Per l'analisi FESEM/EDX del DM-NP 1 aliquote di 1 mL della sospensione del DM sono state trasferite su membrane di policarbonato con porosità di 0,050 μ m, al fine di ridurre gli artefatti nella preparazione del campione che possono portare alla formazione di agglomerati. Porzioni dei filtri ottenuti sono state montate su un portacampioni per ME a scansione e rivestite di un sottile film di Au. I campioni sono stati analizzati mediante un microscopio elettronico a scansione (Quanta inspect F, FEI Company) munito di un sistema di analisi semiautomatica delle particelle (Scandium, SEM Imaging Platform, Olympus). Mediante tale sistema per ciascuna particella sono stati determinati una serie di parametri morfologici: diametro di Feret, diametro minimo, diametro massimo, diametro equivalente, area, aspect ratio. Per l'analisi è stata utilizzata una tensione del fascio di elettroni incidenti pari a 30 KV, una distanza di lavoro di 10 mm e un ingrandimento pari a 40.000x. Sono state analizzate 3.000 particelle.

Il DM-NP 1 è stato inoltre caratterizzato anche nel terreno di coltura utilizzato per i saggi di citotossicità. Sono state eseguite quindi diluizioni seriali del DM-NP 1 in terreno Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose (DMEM-HG) (Sigma Aldrich) in condizioni di sterilità.

Il DM-NP 2 è stato aperto sotto una cappa a flusso laminare per colture cellulari Biohazard per prevenire eventuali contaminazioni. Il cerotto intero è stato tagliato in porzioni di 8 mm di diametro utilizzando punzoni sterili monouso per biopsia (KAI MEDICAL disposable biopsy punch). Una porzione del cerotto è stata montata su un portacampioni per ME a scansione, rivestita di un sottile film di Au e utilizzata per la caratterizzazione morfologica-ultrastrutturale e microanalitica a raggi X. Anche per la caratterizzazione del DM-NP 2 sono state utilizzate una tensione del fascio pari a 30KV e una distanza di lavoro di 10 mm. È stato inoltre valutato mediante FESEM/EDX l'eventuale rilascio di nanoparticelle di Ag da parte del cerotto. A tal fine il cerotto è stato posto in H₂O Milli-Q per 1 h, 6 h, 24 h, 72 h a 37°C. Per ogni tempo di incubazione è stato prelevato 1 mL della sospensione che è stato quindi trasferito su filtri in policarbonato e i campioni ottenuti sono stati preparati e analizzati come sopra descritto.

1.2.2. Preparazione e analisi dei campioni per la caratterizzazione ultrastrutturale e microanalitica del nanomateriale di riferimento

Sono state determinate le caratteristiche intrinseche dell'NM di riferimento AgNM20 "as received" dal fornitore. A tal fine è stata preparata una sospensione di 2,56 mg/mL di AgNM20 in H₂O Milli-Q, sottoposta a vigorosa agitazione in modo da favorire l'omogeneizzazione del campione; 200 μ L della sospensione ottenuta sono stati trasferiti su una membrana in

polycarbonato avente un diametro di 47 nm e una porosità di 0,05 µm. I campioni ottenuti sono stati preparati per l'analisi al FESEM/EDX come precedentemente descritto.

Sono state caratterizzate inoltre le sospensioni di AgNM20 utilizzate per i saggi *in vitro*. Sono state preparate sospensioni di 2,56 mg/mL dell'NM di riferimento pre-umettate in 0,5% vol di etanolo (96% di purezza) in 6 mL di H₂O Milli-Q con 0,05% w/v di *Bovine Serum Albumine* (BSA), utilizzando un protocollo di dispersione proposto e sviluppato in alcuni recenti progetti europei come NANOGENOTOX (8) e indicato anche dal WPMN dell'OECD nei suoi documenti sulla messa a punto di metodi per la preparazione dei campioni per la valutazione della sicurezza degli NM (5). Le sospensioni ottenute, disperse mediante un sonificatore a ultrasuoni a sonda, sono state diluite nel terreno di coltura utilizzato nei saggi di citotossicità in modo tale da ottenere le concentrazioni finali oggetto d'interesse per il confronto con i dispositivi medici selezionati. I campioni per l'analisi FESEM/EDX e TEM, ottenuti come precedentemente descritto, sono stati preparati immediatamente prima dei saggi di citotossicità.

1.3. Risultati della caratterizzazione dei DM-NP e del nanomateriale di riferimento

1.3.1. Determinazione delle caratteristiche fisico-chimiche dell'argento colloidale (DM-NP 1) mediante TEM e FESEM/EDX

L'analisi morfologica al TEM ha evidenziato nella preparazione di Ag colloidale la presenza di NP di forma sferica. La *primary size* di queste NP è compresa tra 5 nm e 26 nm. Queste NP si presentavano come singole o in forma di agglomerati di centinaia di NP (Figura 1a, 1b). La dimensione degli agglomerati è compresa tra 77 nm e 596 nm.

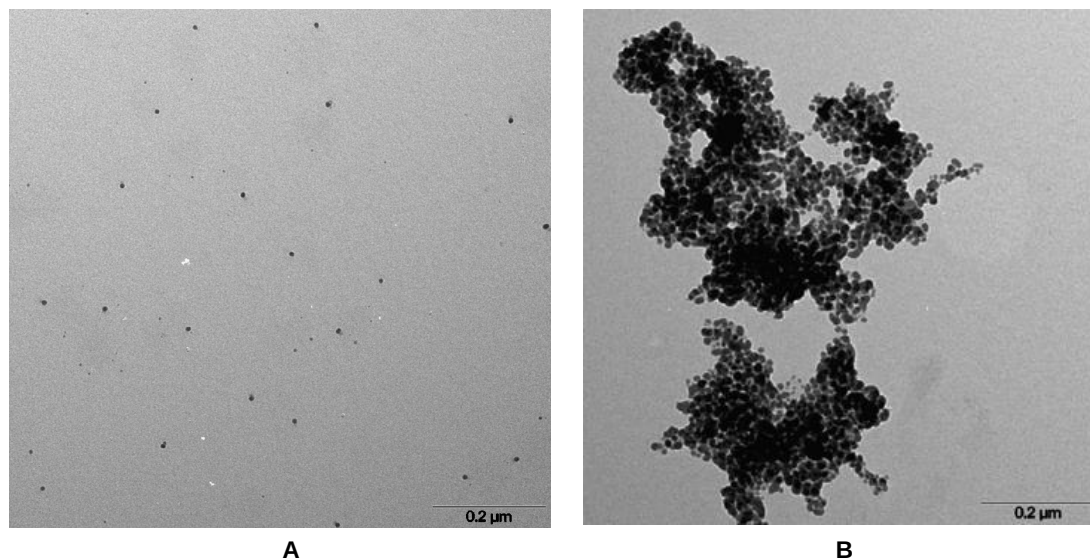


Figura 1. DM-NP 1: immagine TEM di singole NP (A) e di agglomerati di NP (B)

L'analisi al FESEM ha confermato la presenza di numerosi agglomerati (Figura 2). I dati morfologici ottenuti dall'analisi sono stati elaborati al fine di determinare la distribuzione dimensionale delle NP contenute nel dispositivo medico oggetto di studio. Essi mostrano che le NP di Ag colloidale presentano uno spettro granulometrico compreso tra 5 nm e 350 nm, con un valor medio di $19,9 \pm 21,6$ nm (Figura 3).

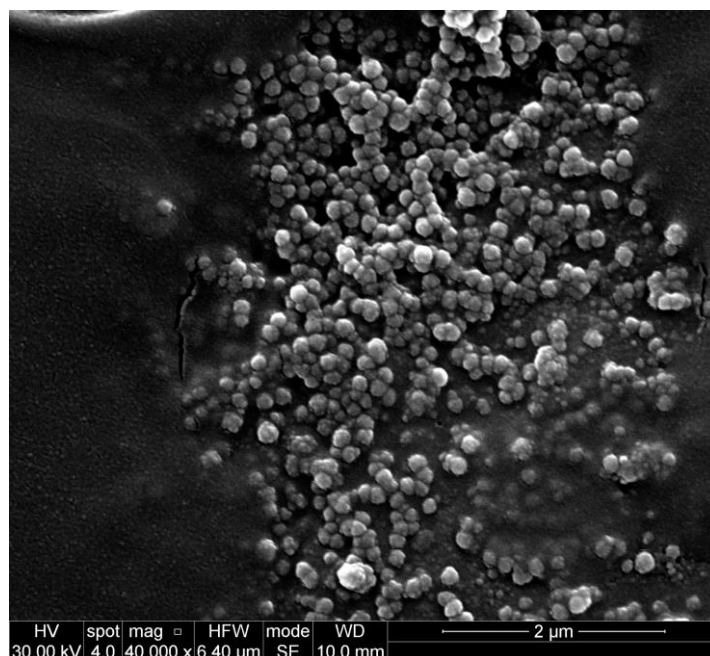


Figura 2. DM-NP 1: immagine FESEM di un agglomerato di NP di Ag presente nell'argento colloidale

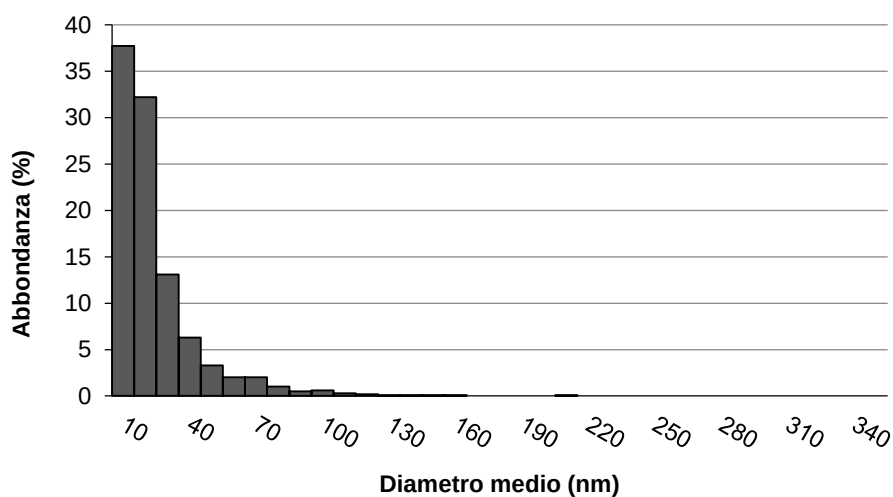


Figura 3. DM-NP 1: distribuzione dimensionale delle NP di argento colloidale ottenuta mediante analisi FESEM

1.3.2. Caratterizzazione fisico-chimica del cerotto con nanocristalli di argento (DM-NP 2) mediante FESEM/EDX

L'analisi morfologica della superficie del cerotto ha evidenziato che esso si presenta come un tessuto fitto di trecce, ciascuna delle quali costituita da numerose fibre che si avvolgono tra loro (Figura 4, Figura 5). Il diametro di queste fibre è compreso tra 8,25 μm e 15,21 μm .

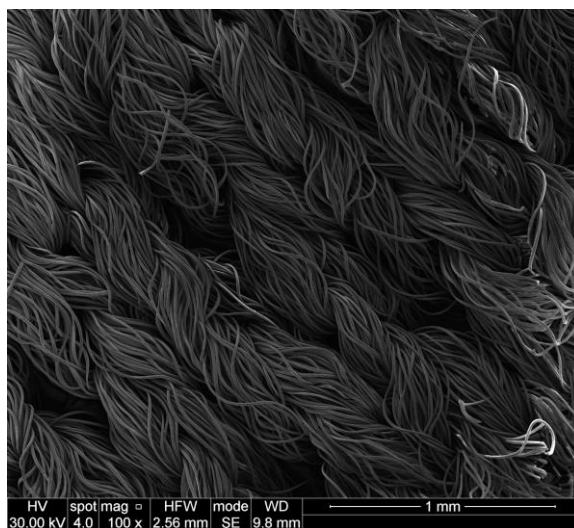


Figura 4. DM-NP 2: immagine FESEM (100x) a elettroni secondari (SE) della superficie del cerotto

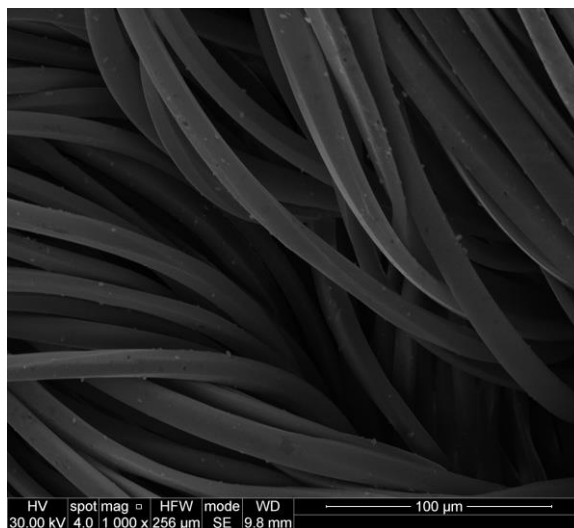


Figura 5. DM-NP 2: immagine FESEM (1.000x) a elettroni secondari (SE) delle fibre che costituiscono la superficie del cerotto

L'analisi ad alto ingrandimento delle fibre (60.000x) mostra che tutta la loro superficie è nanostrutturata ed è costituita da piccolissime particelle, le une vicino alle altre in modo da formare un tappeto unico (Figura 6). La distribuzione dimensionale di queste particelle è compresa tra 16 nm e 85 nm e presenta un massimo nell'intervallo granulometrico tra 20 e 30 nm con un'abbondanza pari al 37,3% (Figura 7).

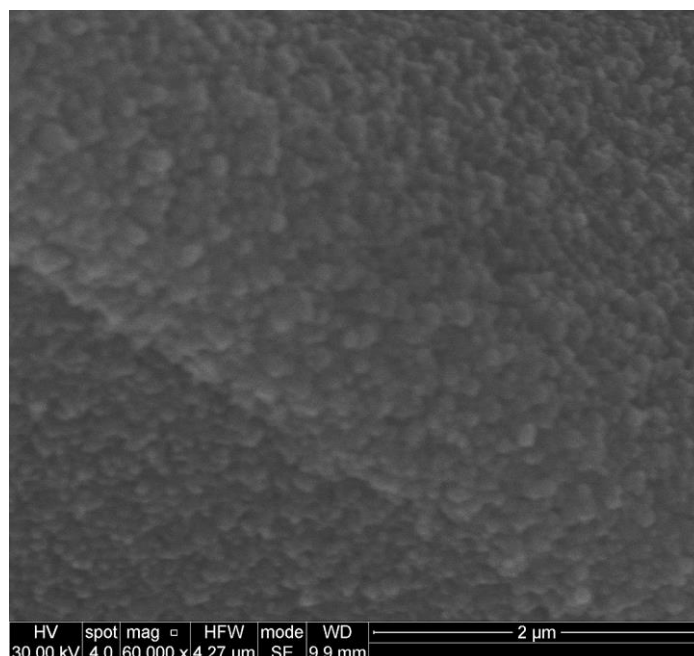


Figura 6. DM-NP 2: immagine FESEM (60.000x) a elettroni secondari (SE) della superficie di una fibra del cerotto. La superficie è ricoperta interamente da uno strato non uniforme di nanoparticelle

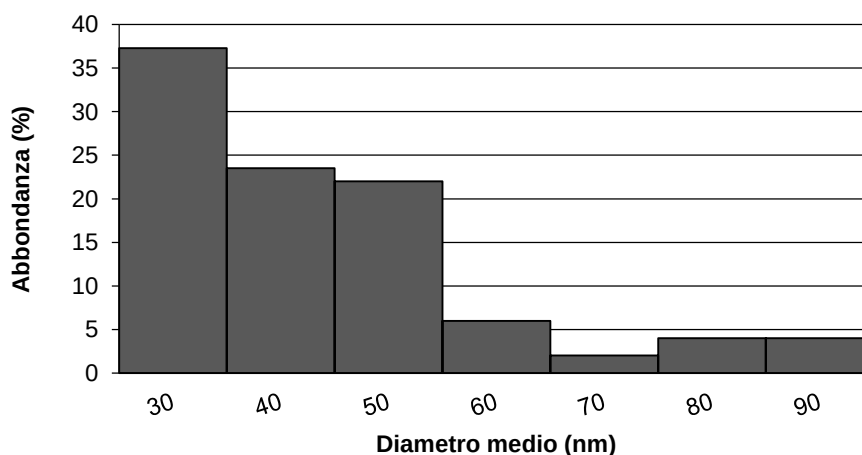


Figura 7. DM-NP 2: distribuzione dimensionale delle NP di Ag presenti sulla superficie del cerotto determinata mediante analisi FESEM

Lo spettro EDX raccolto dalle particelle del cerotto ha permesso di verificare che esse sono costituite da Ag (Figura 8).

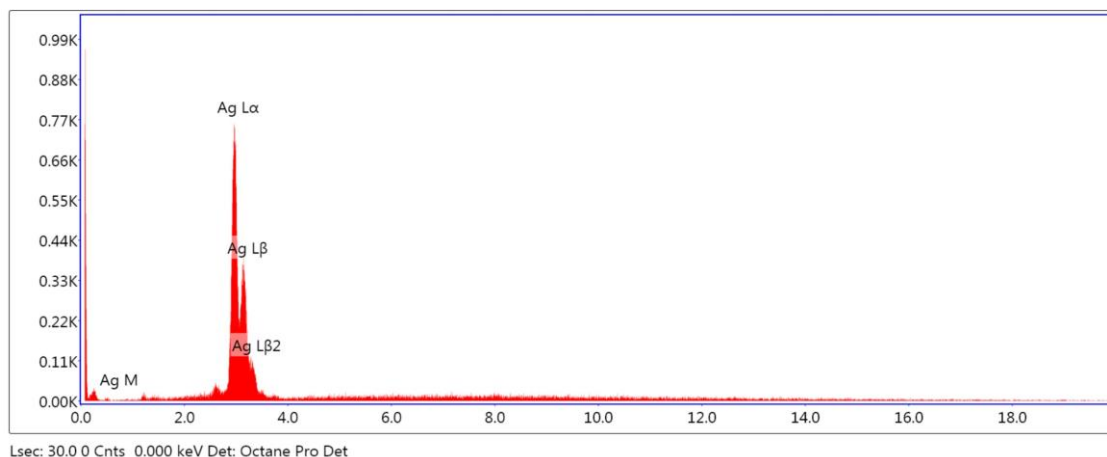


Figura 8. DM-NP 2: spettro EDX acquisito dalle nanoparticelle presenti sulla superficie delle fibre del cerotto

È stata quindi raccolta una mappa a raggi X su di un'area del cerotto corrispondente a 8,29 mm² al fine di rilevare gli elementi chimici presenti su di essa e la loro distribuzione (Figura 9). La spettrometria a raggi X a dispersione di energia ha mostrato nell'area in esame la presenza di Ag e C. La successiva mappa a raggi X ha evidenziato che le fibre che formano il cerotto sono costituite da un substrato di C su cui sono adese le AgNP (Figura 10, Figura 11, Figura 12).

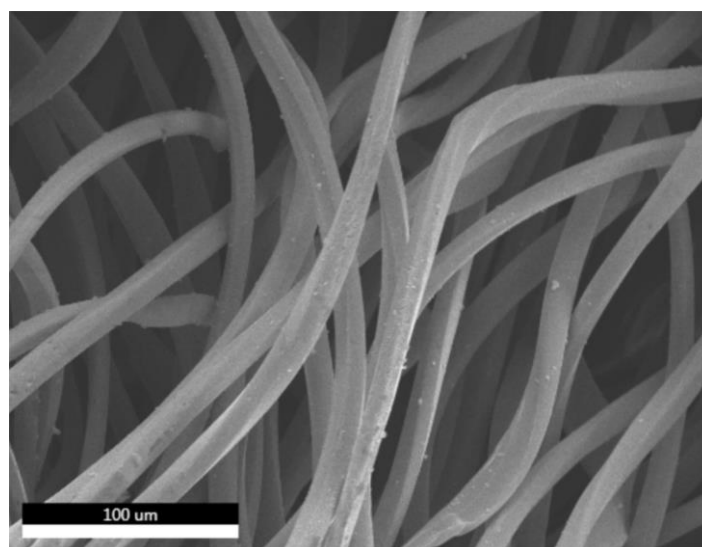


Figura 9. DM-NP 2: immagine FESEM dell'area del cerotto su cui è stata raccolta una mappa a raggi X

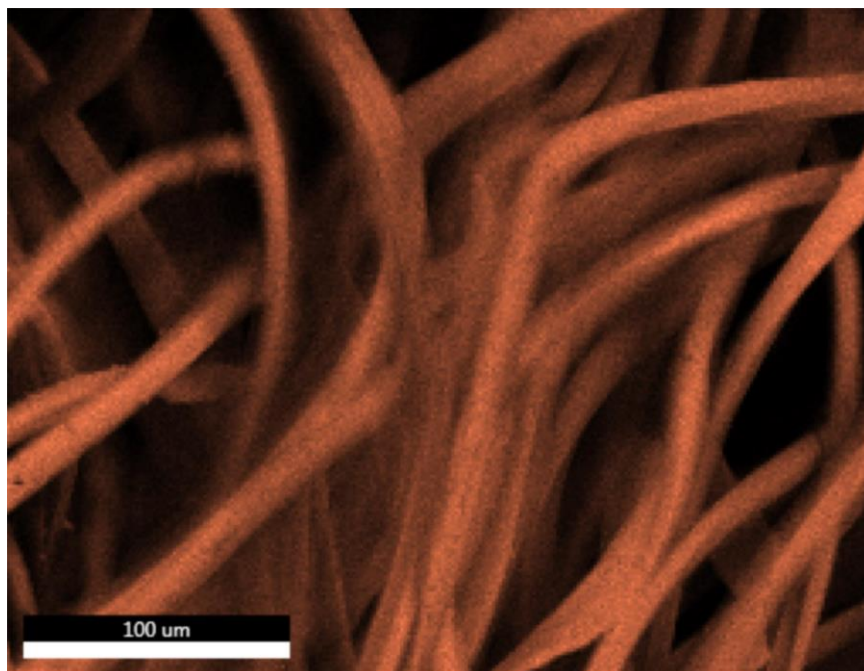


Figura 10. DM-NP 2: mappa a raggi X relativa alla distribuzione di Ag sull'area del cerotto (ottenuta selezionando la regione di interesse Ag L_ROI)

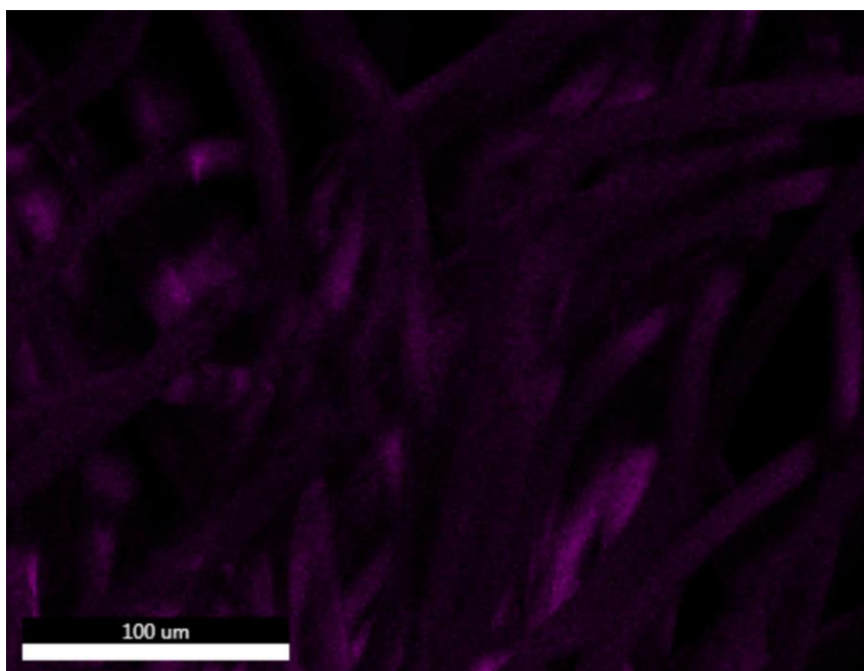


Figura 11. DM-NP 2: mappa a raggi X relativa alla distribuzione di C sull'area del cerotto in esame (ottenuta selezionando la regione di interesse C K_ROI)

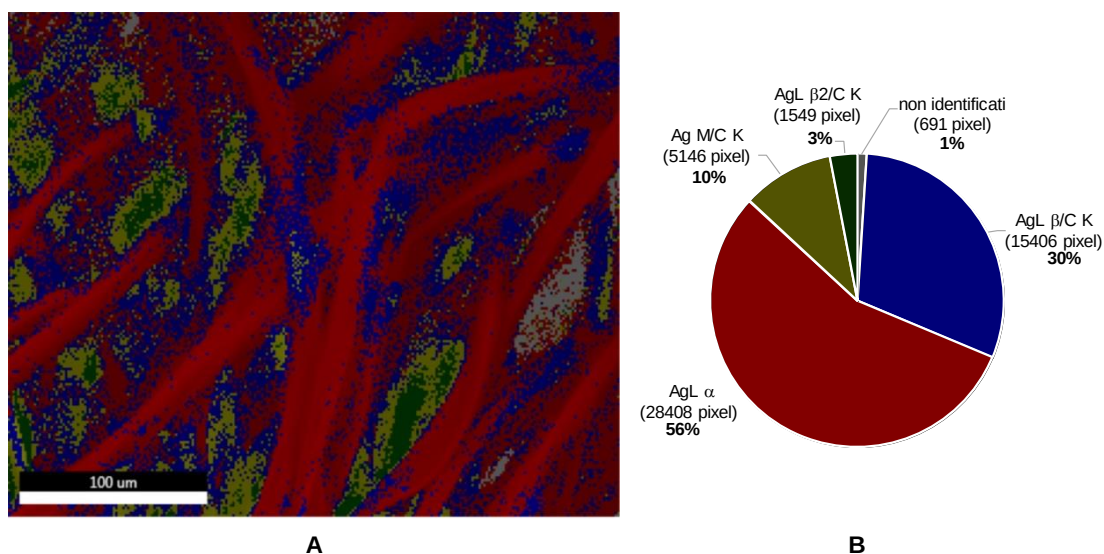


Figura 12. DM-NP 2: mappa a raggi X distribuzione degli elementi (Ag e C) presenti sull'area del cerotto (ottenuta selezionando le regione di interesse Ag_ROI e C_K_ROI) (A) e distribuzione percentuale degli elementi identificati (B)

1.3.3. Valutazione del rilascio di nanoparticelle dal DM-NP 2 mediante FESEM/EDX

L'osservazione ha evidenziato che il cerotto dopo 1 h di incubazione in H_2O Milli-Q rilascia nanoparticelle di Ag aventi un diametro di circa 30 nm (Figura 13). Dopo 6 h (Figura 14), 24 h (Figura 15), 72 h (Figura 16) di contatto aumenta il numero di NP rilasciate, si formano agglomerati che a loro volta si organizzano formando dei grandi cluster.

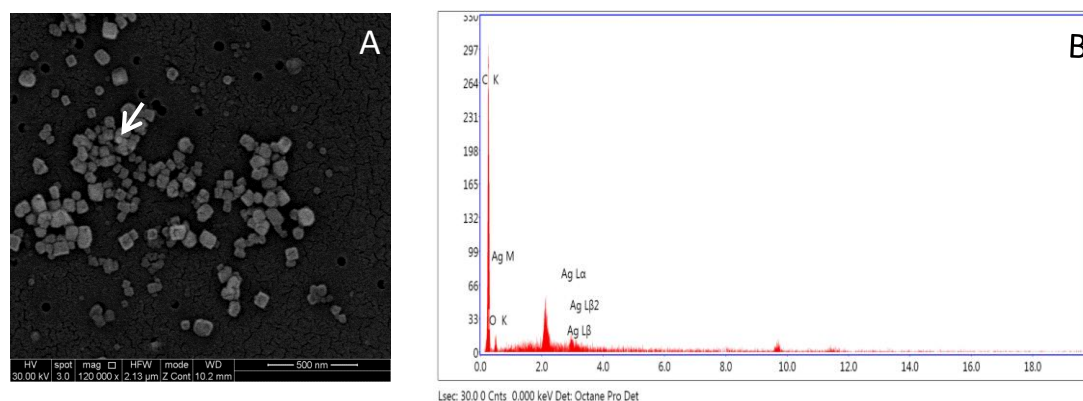


Figura 13. DM-NP 2: A) immagine FESEM di nanoparticelle rilasciate dopo 1 h di incubazione in H_2O Milli-Q; B) spettro EDX acquisito dalle nanoparticelle

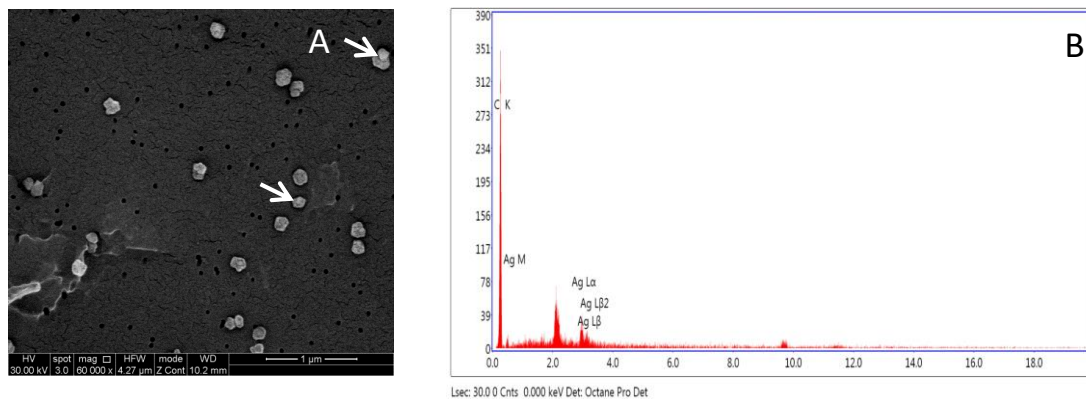


Figura 14. DM-NP 2: A) immagine FESEM di nanoparticelle rilasciate dopo 6 h di incubazione in H₂O Milli-Q; B) spettro EDX acquisito dalle nanoparticelle

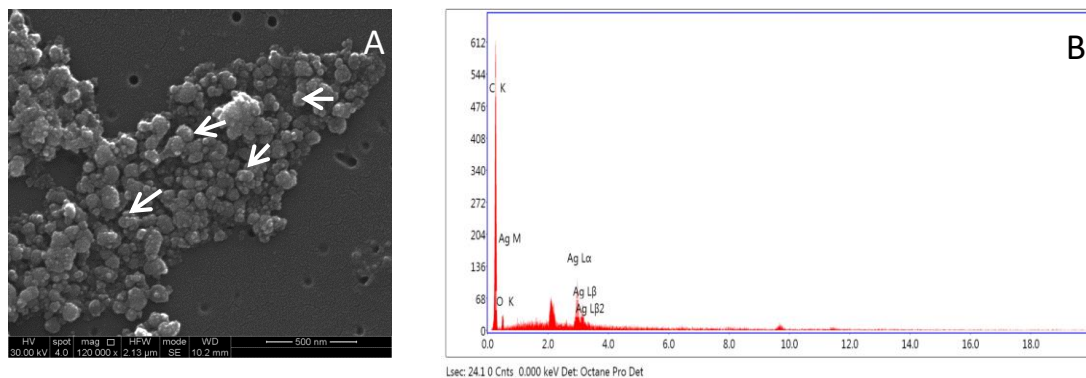


Figura 15. DM-NP 2: A) immagine FESEM di agglomerati osservati dopo 24 h di incubazione in H₂O Milli-Q di nanoparticelle; F) spettro EDX acquisito dalle nanoparticelle

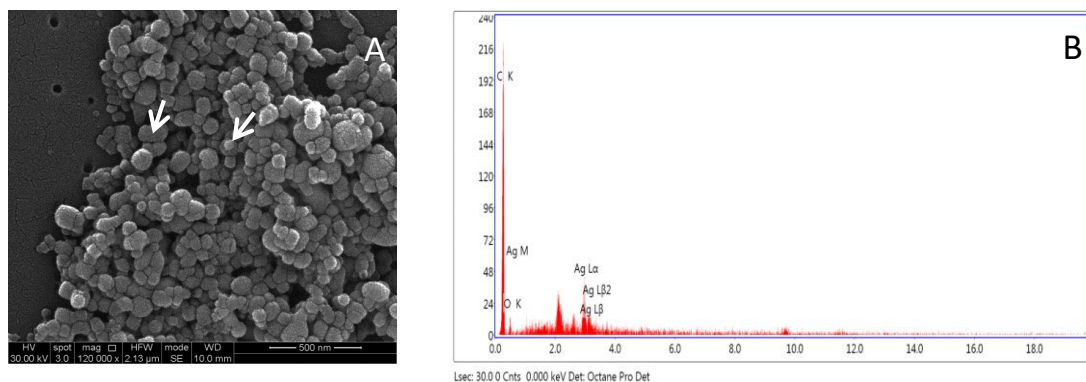


Figura 16. DM-NP 2: A) immagine FESEM di agglomerati osservati dopo 72 h di incubazione in H₂O Milli-Q di nanoparticelle; F) spettro EDX acquisito dalle nanoparticelle

1.3.4. Determinazione delle caratteristiche fisico-chimiche del nanomateriale di riferimento “as received”

L'analisi TEM dell'NM di riferimento Ag NM20 ha mostrato che esso è costituito da particelle di forma sferica di dimensione primaria pari a 29 ± 8 nm. Esse si presentano prevalentemente sotto forma di agglomerati che possono raggiungere dimensioni di alcuni μm . In Figura 17 è illustrata la distribuzione dimensionale ottenuta: il diametro medio delle NP è compreso tra 49 nm e $4,49 \mu\text{m}$ e il valor medio della distribuzione è pari a 541 ± 608 nm. Nella distribuzione dimensionale si possono distinguere tre differenti regioni, quella più abbondante compresa tra 60 e 200 nm, una seconda compresa tra 220 e 720 nm e infine una terza tra 780 nm e $1,06 \mu\text{m}$. Solo il 13,5% delle particelle analizzate presentano un diametro medio inferiore ai 100 nm.

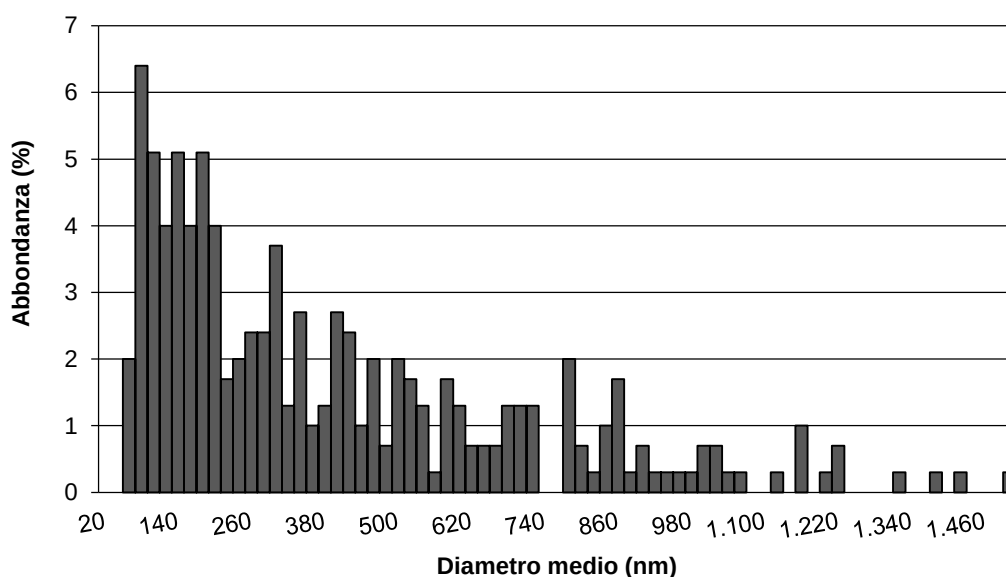


Figura 17. Distribuzione dimensionale dell'NM di riferimento Ag NM20 “as received”

1.4. Caratterizzazione delle sospensioni utilizzate nei saggi di tossicità

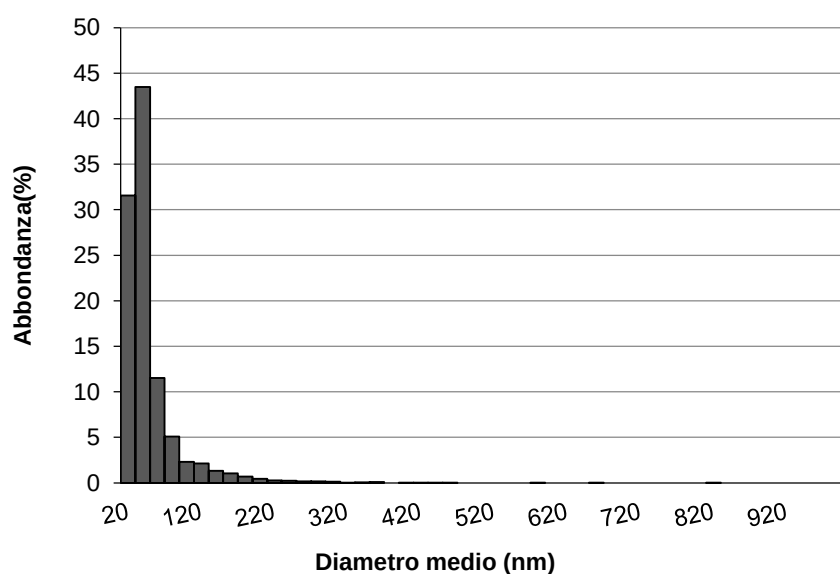
1.4.1. Sospensioni di DM-NP 1 in DMEM-HG usate nei saggi *in vitro*

L'osservazione dei campioni al FESEM ha evidenziato che le particelle di Ag presenti nelle sospensioni utilizzate per i saggi di citotossicità presentano uno spettro granulometrico compreso tra 10 nm e 260 nm. Il 75% delle particelle ha dimensioni comprese tra 10 nm e 40 nm e il 94% inferiori ai 100 nm. Il diametro medio della distribuzione è pari a 40 ± 11 nm.

In Tabella 2 sono mostrati i valori medi delle distribuzioni dimensionali delle sospensioni di DM-NP 1 nel terreno di coltura ottenute per ciascun esperimento. In Figura 18 è illustrata la distribuzione dimensionale media delle sospensioni di DM-NP 1.

Tabella 2. Diametri medi delle distribuzioni dimensionali delle sospensioni di DM-NP 1 in DMEM

Esperimento	Diametro medio (nm)
1	39 ± 28
2	52 ± 52
3	25 ± 18
4	52 ± 44
5	31 ± 30
6	40 ± 31

**Figura 18. DM-NP 1: distribuzione dimensionale delle particelle di Ag colloidale presenti nelle sospensioni utilizzate per i saggi di citotossicità**

1.4.2. Estratti del DM-NP 2 usati nei saggi di citotossicità

Il cerotto nanostrutturato è stato incubato per 1 h, 6 h, 24 h, 72 h in 8,3 mL di terreno di coltura, usato nei saggi *in vitro*, alla temperatura di 37°C in presenza di CO₂ al 5%. Da ciascuno degli estratti è stato prelevato un millilitro e trasferito su membrane in policarbonato (47 mm di diametro, porosità 0,05 µm). I campioni ottenuti sono stati analizzati mediante FESEM/EDX come descritto nelle precedenti sezioni.

Dopo 1 h e 6 h di contatto del cerotto con il terreno di coltura non sono state rinvenute NP nell'estratto. Le NP sono state invece rilevate dopo 24 h (Figura 19) e 72 h di esposizione (Figura 20). Esse avevano un diametro medio compreso tra 27 nm e 70 nm. La microanalisi a raggi X ha mostrato che erano costituite da Ag e Cl.

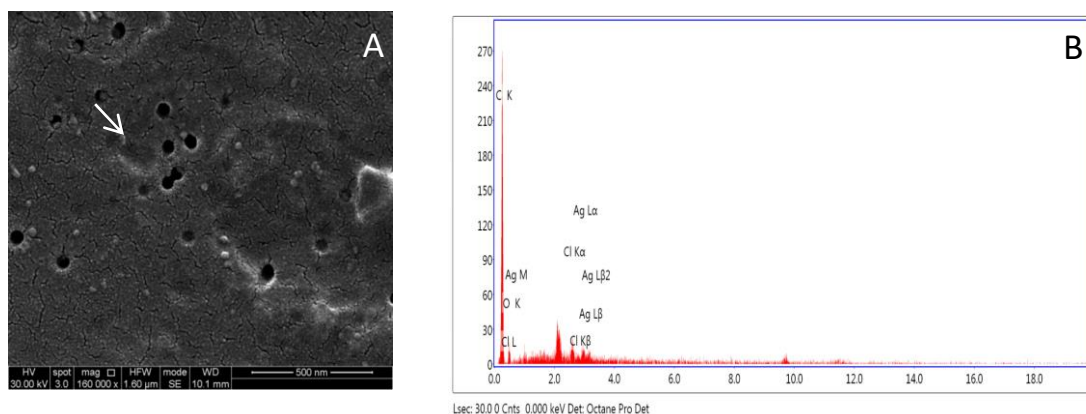


Figura 19. DM-NP 2: A) immagine FESEM di una NP di 27 nm rilevata nell'estratto dopo 24 h di incubazione in DMEM-HG; B) spettro EDX acquisito dalla NP

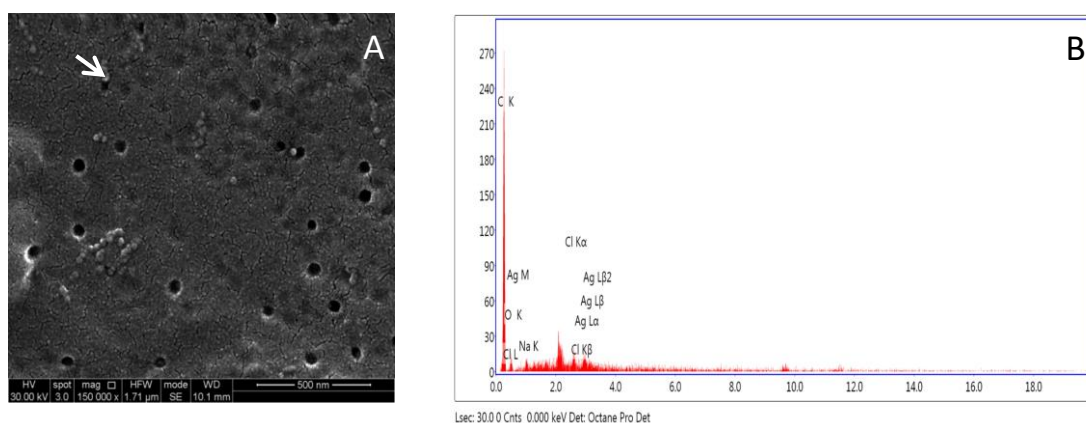


Figura 20. DM-NP 2: A) immagine FESEM di una NP di 38 nm rilevata nell'estratto dopo 72 h di incubazione in DMEM-HG; B) spettro EDX acquisito dalla NP

1.4.3. Sospensioni di AgNM20 in H₂O Milli-Q-BSA (0,05% w/v)

L'osservazione al FESEM ha evidenziato che nelle sospensioni di Ag NM 20 in Milli-Q – BSA (0,05% w/v) erano presenti numerosi e grandi agglomerati, in alcuni casi di dimensioni fino a 1,5 µm.

In Tabella 3 sono mostrati i diametri medi delle distribuzioni dimensionali delle sospensioni dell'NM di riferimento ottenute per ciascuno degli esperimenti.

Il valor medio di tale caratteristica fisica delle particelle di AgNM20 disperse in Milli-Q–BSA (0,05% w/v) è pari a 132 ± 58 nm.

In Figura 21 è mostrato lo spettro granulometrico della media delle distribuzioni dimensionali ottenute.

Tabella 3. Diametri medi delle distribuzioni dimensionali delle sospensioni dell'NM di riferimento AgNM20 in Milli-Q-BSA (0,05%) aventi una concentrazione di 2,56 mg/mL e realizzate immediatamente prima degli esperimenti *in vitro*

Esperimento	Diametro medio (nm)
1	104 ± 111
2	240 ± 220
3	101 ± 152
4	93 ± 124
5	161 ± 191
6	96 ± 97

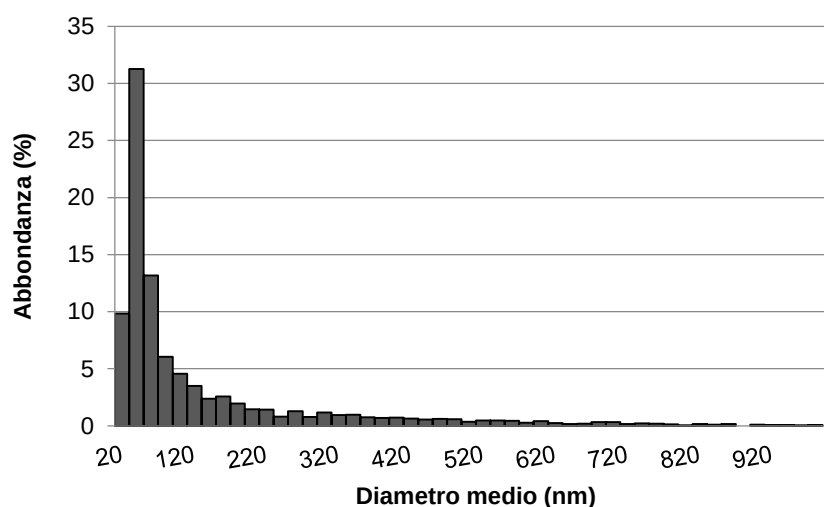


Figura 21. Distribuzione dimensionale delle sospensioni di Ag NM20 in H₂O Milli-Q alla concentrazione di 2,56 µg/mL utilizzate per realizzare le diluizioni utilizzate nei saggi di citotossicità

1.4.4. Sospensioni di AgNM20 utilizzate nei saggi *in vitro*

Sono state caratterizzate le sospensioni dell'NM di riferimento utilizzate nei saggi di citotossicità ottenute diluendo le sospensioni di Ag NM20 in DMEM-HG alle concentrazioni più basse e più alte usate per i test *in vitro* dei DM-NP (2,5 µg/mL, 125 µg/mL, 500 µg/mL).

In Tabella 4 sono mostrati i diametri medi delle distribuzioni dimensionali delle sospensioni in DMEM-HG dell'NM di riferimento.

Tabella 4. Diametri medi delle distribuzioni dimensionali delle sospensioni dell'NM di riferimento AgNM20 in DMEM-HG utilizzate per i saggi di citotossicità.

Concentrazione (µg/mL)	Diametro medio (nm)
2,5	130 ± 66
125	145 ± 23
500	162 ± 47

I dati di caratterizzazione delle sospensioni di AgNM20 in DMEM-HG mostrano uno stato di agglomerazione delle NP che aumenta all'aumentare della concentrazione delle sospensioni.

La percentuale di particelle sospese con diametro medio inferiore ai 100 nm è risultata pari al 69% per le sospensioni di 2,5 µg/mL, al 47 % per quelle aventi una concentrazione di 125 µg/mL e uguale al 32 % per quelle a 500 µg/mL.

Nelle Figure 22, 23 e 24 sono mostrati gli spettri granulometrici della media delle distribuzioni dimensionali di AgNM20 in DMEM-HG alle differenti concentrazioni usate nei saggi di citotossicità.

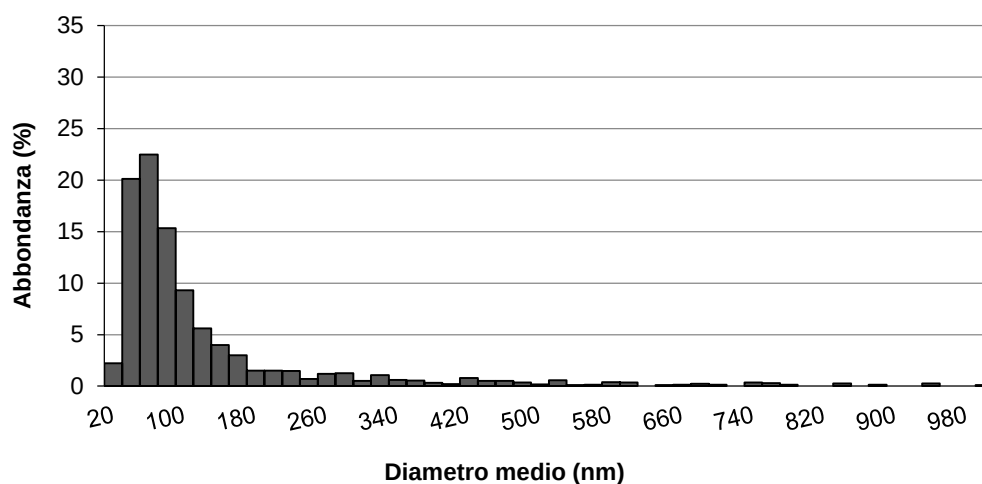


Figura 22. Distribuzione dimensionale delle sospensioni di AgNM20 in DMEM-HG alla concentrazione di 2,5 µg/mL utilizzate per i saggi di citotossicità

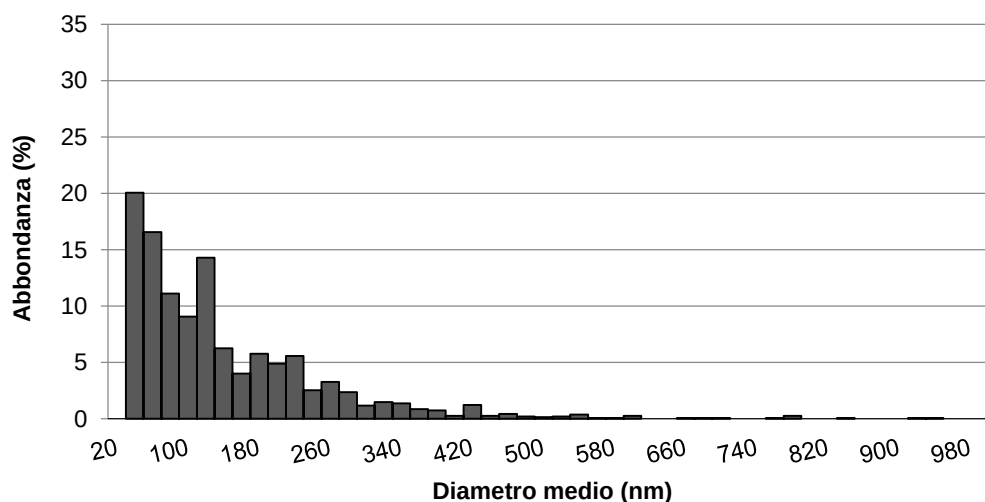


Figura 23. Distribuzione dimensionale delle sospensioni di AgNM20 in DMEM-HG alla concentrazione di 125 µg/mL utilizzate per i saggi di citotossicità

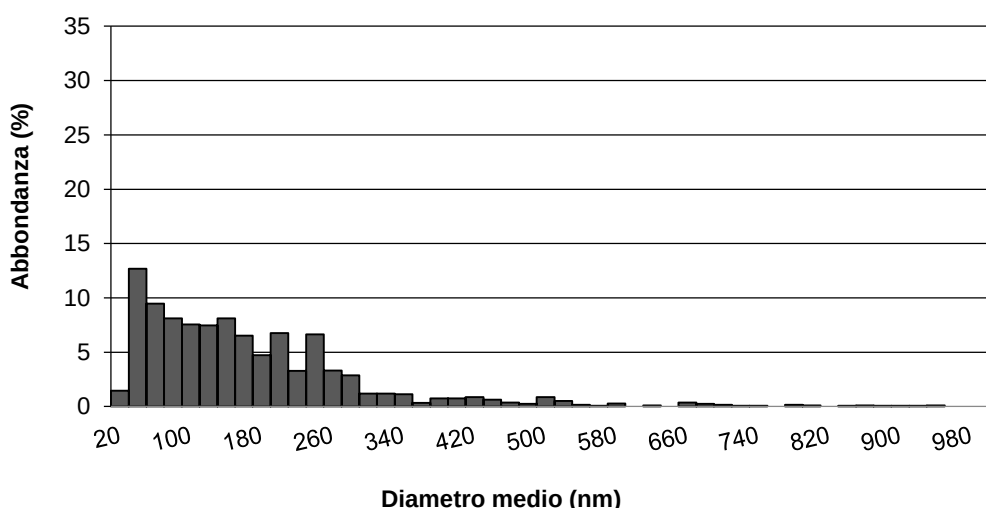


Figura 24. Distribuzione dimensionale delle sospensioni di AgNM20 in DMEM-HG alla concentrazione di 500 µg/mL utilizzate per i saggi di citotossicità

1.5. Conclusioni

Le caratteristiche del DM-NP 1 determinate mediante tecniche ultrastrutturali (microscopia elettronica a trasmissione e a scansione), non sono completamente in accordo con quelle dichiarate nelle specifiche del produttore, misurate con altre tecniche analitiche. L'analisi al TEM ha mostrato infatti che nel DM-NP 1 sono presenti NP di Ag aventi una dimensione primaria compresa tra 5 e 26 nm. Inoltre la distribuzione dimensionale, ottenuta mediante l'analisi al FESEM, ha evidenziato uno spettro granulometrico ampio in cui l'ottantatré per cento delle particelle analizzate presenta un diametro medio compreso tra 5 e 30 nm.

Il DM-NP 2 rilascia NP quando è incubato sia in H₂O Milli-Q, sia in terreno di coltura utilizzato nei saggi *in vitro*. I dati ottenuti mediante FESEM/EDX hanno mostrato che, all'aumentare del tempo d'esposizione in H₂O Milli-Q, il rilascio di NP aumenta. Esse inoltre agglomerano in cluster di dimensioni via via crescenti. Notevolmente diversa appare la situazione in cui il cerotto è incubato in terreno di coltura: il rilascio di NP è notevolmente inferiore e all'aumentare del tempo di esposizione non si registra né un aumento del numero di NP rilasciate, né una loro agglomerazione.

La caratterizzazione mediante microscopia elettronica delle sospensioni usate nei saggi *in vitro* ha evidenziato uno spettro granulometrico molto ampio e la presenza di numerosi agglomerati sia nelle sospensioni in DMEM-HG del DM-NP 1 sia in quelle dell'NM di riferimento AgNM20. I dati relativi alle sospensioni nel terreno di coltura mostrano un differente stato di agglomerazione delle sospensioni di AgNM20 e del DM-NP 1. Sospensioni con caratteristiche fisiche differenti, in particolare diametro medio e stato di agglomerazione, comportano una differente interazione nanoparticella-cellula e quindi una diversa risposta cellulare.

I dati acquisiti dal progetto nel loro insieme confermano che la microscopia elettronica a trasmissione e quella a scansione munite di spettrometria a raggi X a dispersione di energia,

rappresentano un potente strumento analitico che consente di ottenere informazioni essenziali sugli NM e sui DM-NP, come forma, dimensione primaria, distribuzione dimensionale, composizione chimica. Tali metodiche sono particolarmente importanti se nell'NM o nel DM-NP sono presenti particelle non sferiche o aventi morfologie differenti tra loro. Ciò è dovuto al fatto che altre tecniche impiegate per caratterizzare gli NM, come ad esempio il Dynamic Light Scattering, si basano sull'assunzione della forma sferica delle NP, di conseguenza la presenza di particelle aventi forma differente, ad esempio irregolari, a bastoncino (*rod*), cubiche, o fili sottili (*nanowire*), può portare a una stima non corretta della distribuzione dimensionale dell'NM. Occorre tuttavia implementare e armonizzare nuovi protocolli per la determinazione della dimensione e distribuzione dimensionale degli NM mediante microscopia elettronica, partendo dalle Standard Operating Procedure (SOP) per la preparazione e l'analisi dei campioni e, soprattutto, identificare quale parametro morfologico (diametro di Feret, diametro medio, diametro massimo) è necessario misurare al fine di ottenere dati comparabili con quelli determinati mediante altre tecniche analitiche che si basano su principi fisici diversi.

Bibliografia

1. UNI EN ISO 10993-1:2010. *Valutazione biologica dei dispositivi medici - Parte 1: Valutazione e prove all'interno di un processo di gestione del rischio*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2010.
2. 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.
3. ISO/TR 10993-22:2017. *Biological evaluation of medical devices -- Part 22: Guidance on nanomaterials*. Geneva: International Organization for Standardization; 2017.
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. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 36. Guidance on sample preparation and dosimetry for the safety testing of manufactured nanomaterials*. Paris: OECD; 2012. (OECD ENV/JM/MONO(2012)40).
6. Burrell RE, DemLing R, Pancani S, Papp A, Strand O, Voinchet V. The role of Acticoat TM with nanocrystalline silver in the management of burns. *Burns* 2004; 30(Suppl.1):S1-S9.
7. Rigo C, Roman M, Munivvra 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. Jensen KA, Kembouche Y, Christiansen E, Jacobsen NR, Wallin H, Guilot C, Spalla O, Witschger O. *Report N° 3. The generic NANOGENOTOX dispersion protocol-Standard Operation Procedure (SOP). NANOGENOTOX Deliverable*. Copenhagen: National Research Centre for the Working Environment; 2011.

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.

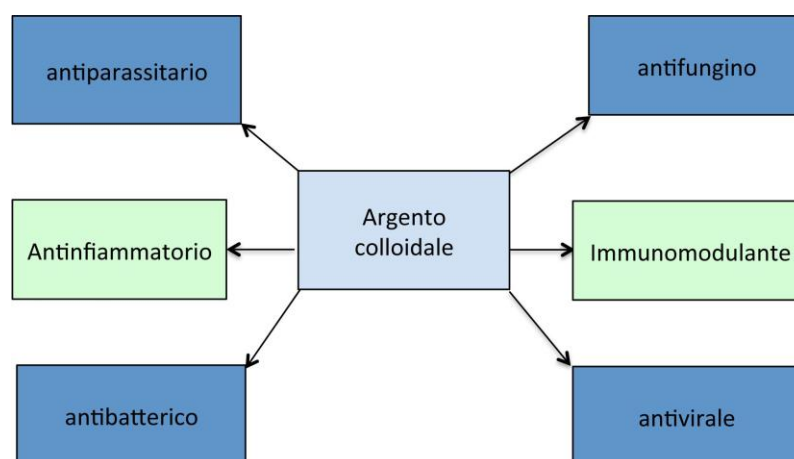


Figura 1. Proprietà dell'argento colloidale

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).

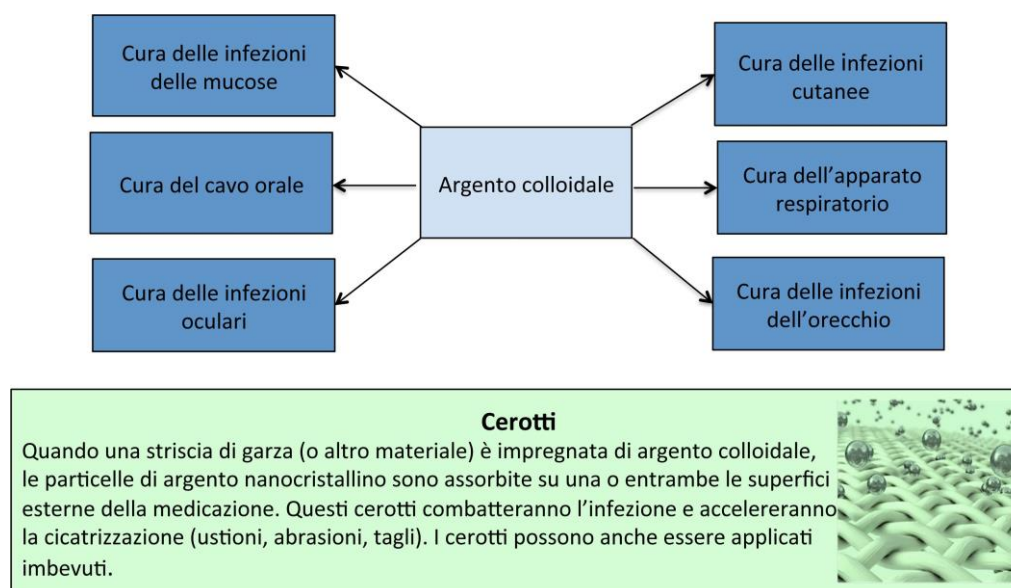


Figura 2. Applicazioni dell'argento colloidale

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.

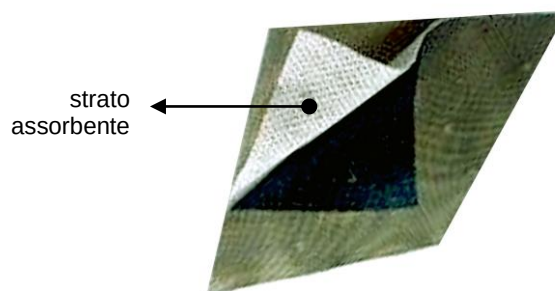


Figura 3. Cerotto nanostrutturato

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), streptomycin (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),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.

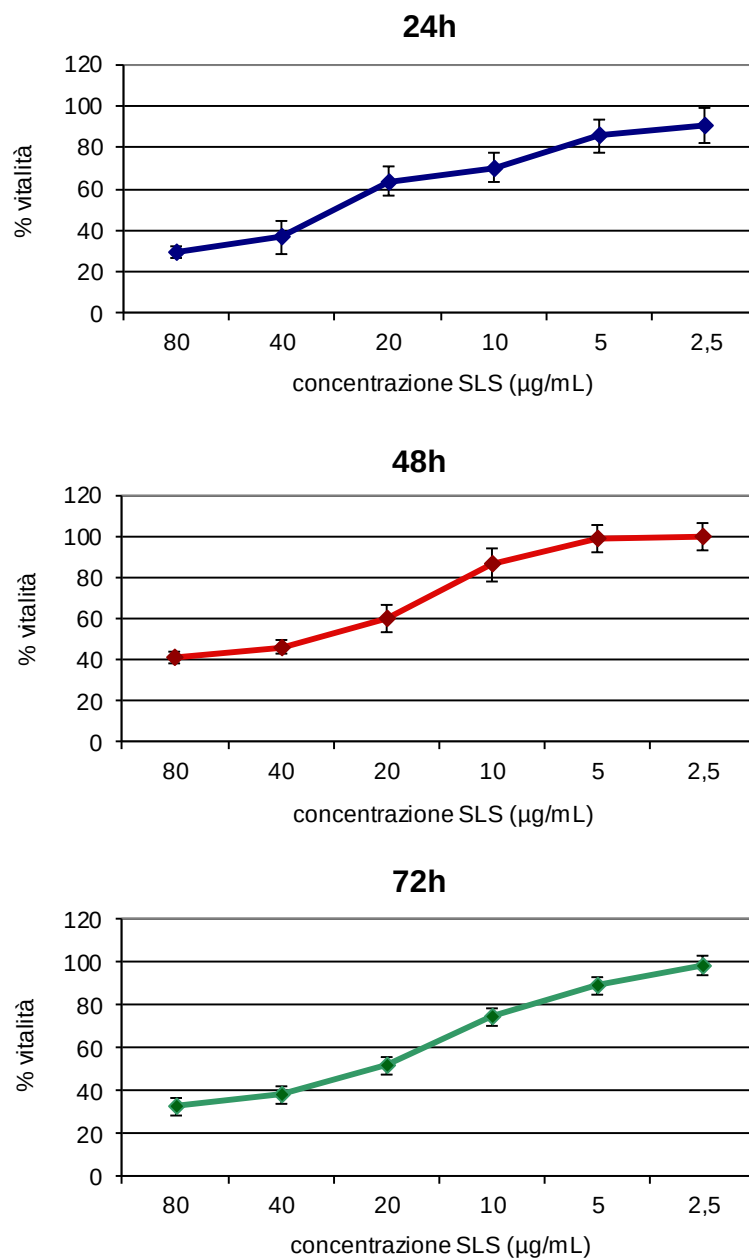


Figura 5. Curva dose-risposta dell'SLS misurata con il saggio del Rosso Neutro dopo 24, 48 e 72 ore di incubazione

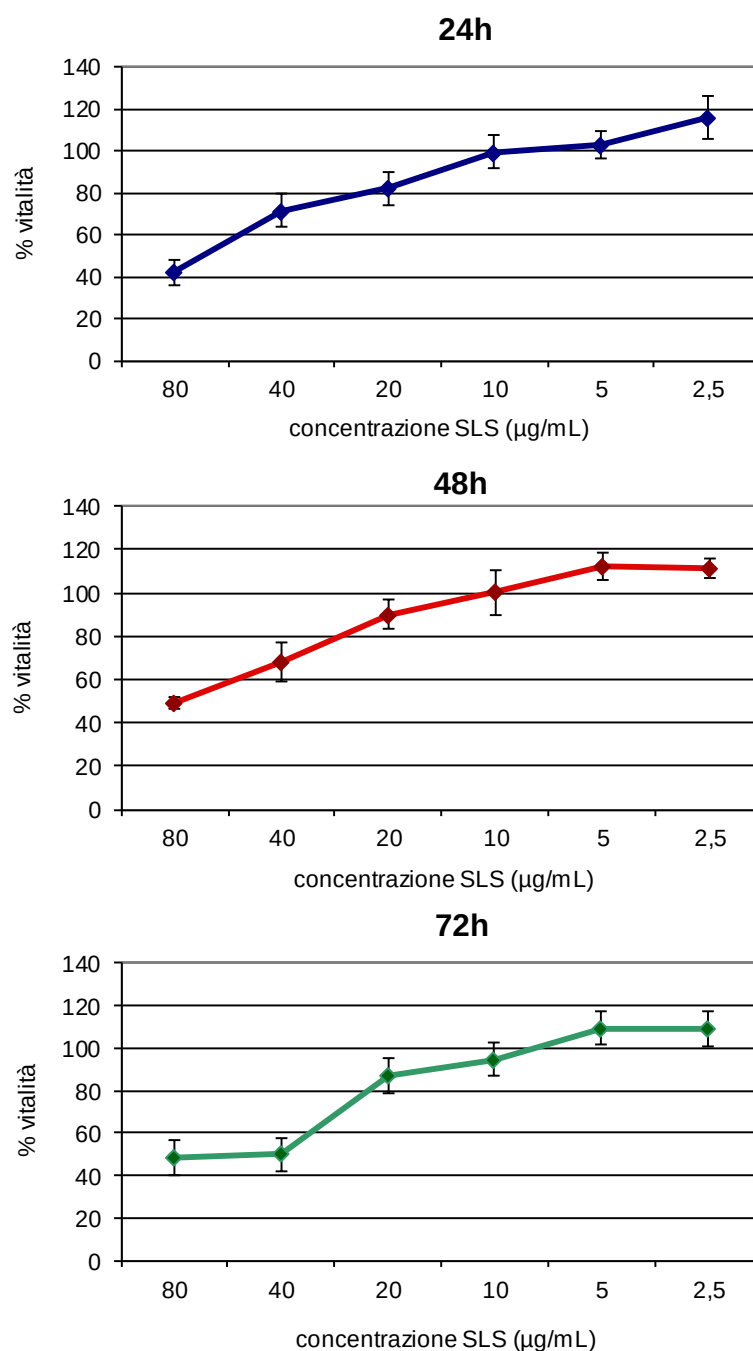


Figura 6. Curva dose-risposta dell'SLS misurata con il test MTT dopo 24, 48 e 72 ore di incubazione

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 $\mu\text{g/mL}$ per l'SLS e di 4 μM per la Staurosporina.

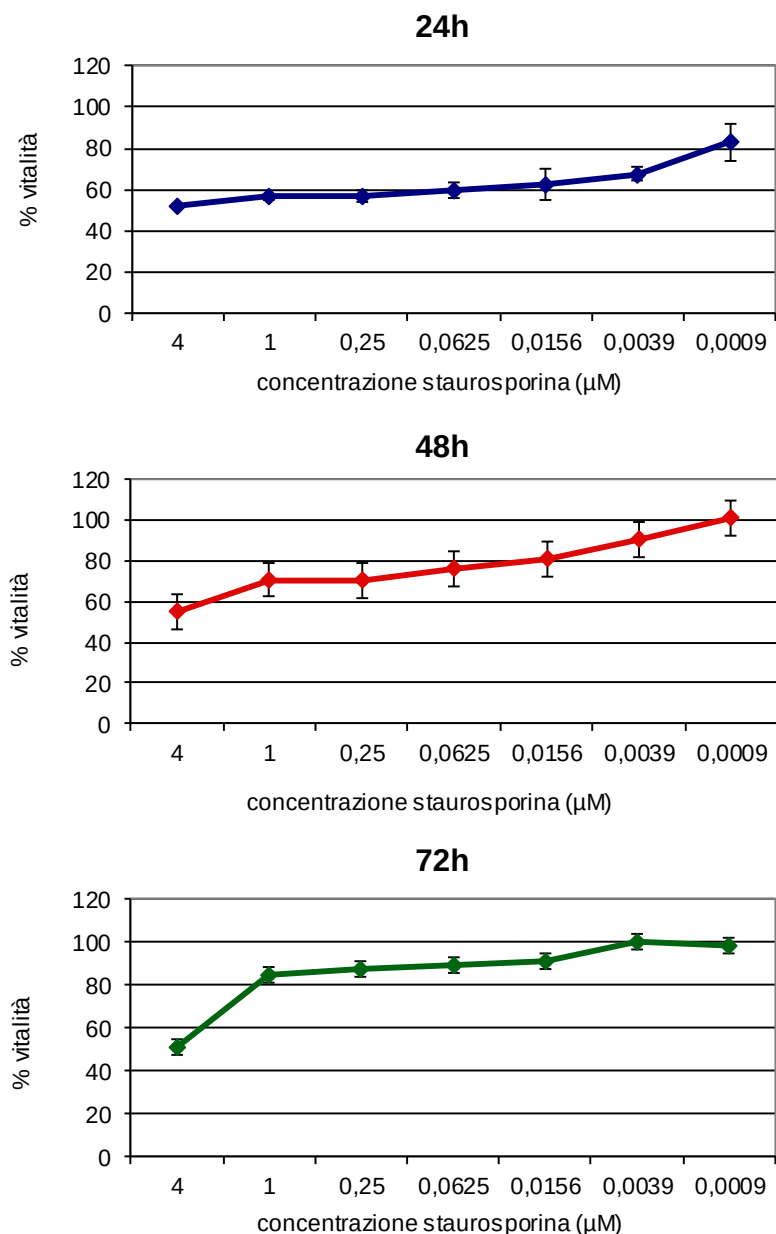


Figura 7. Curva dose-risposta della Staurosporina misurata con il test MTT dopo 24, 48 e 72 ore di incubazione

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.

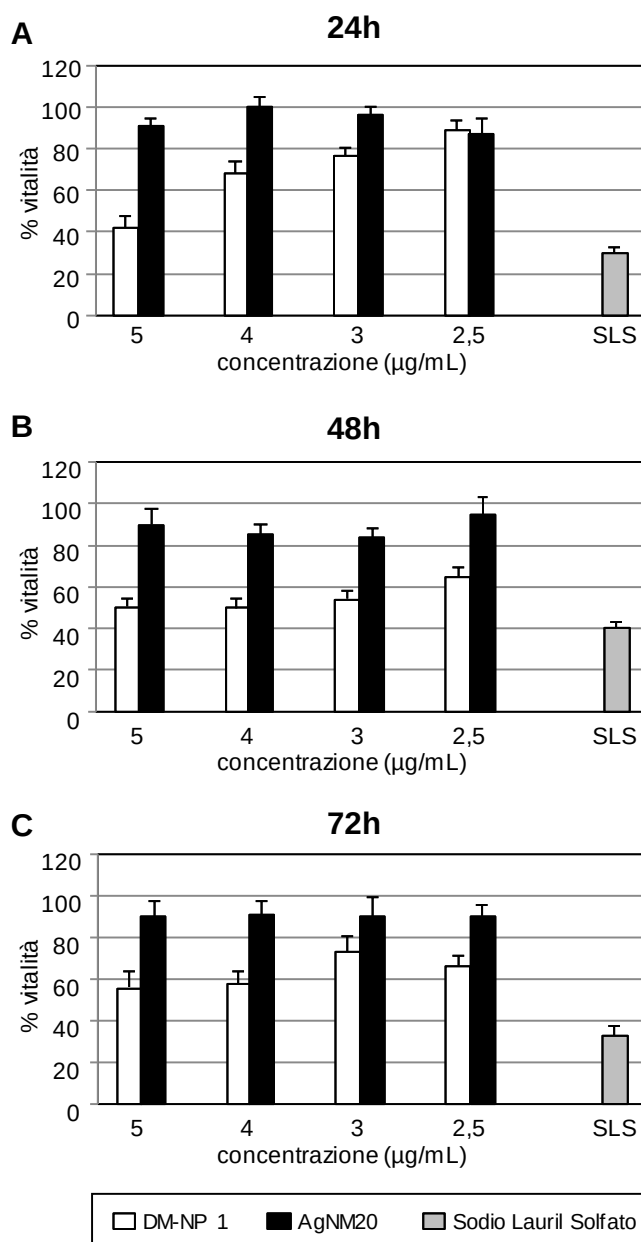


Figura 8. DM-NP 1: risultati del saggio del Rosso Neutro espressi come percentuale rispetto al controllo negativo (cellule non trattate): A) 24 h di esposizione; B) trattamento ripetuto per altre 24 h; C) trattamento ripetuto per ulteriori 24 h. I dati sono la media $\pm$ SD di sei esperimenti

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.

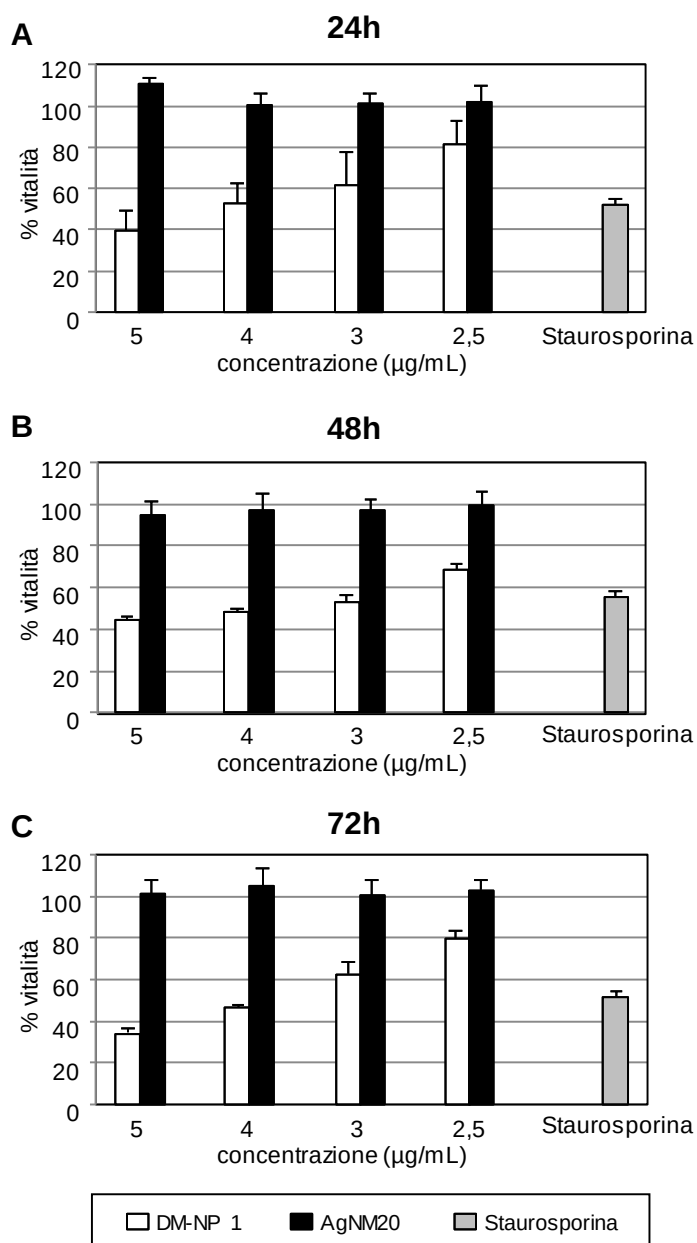


Figura 9. DM-NP 1: risultati del test MTT espressi come percentuale rispetto al controllo negativo (cellule non trattate): A) 24 h di esposizione; B) trattamento ripetuto per altre 24 h; C) trattamento ripetuto per ulteriori 24 h. I dati sono la media $\pm$ SD di sei esperimenti

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

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

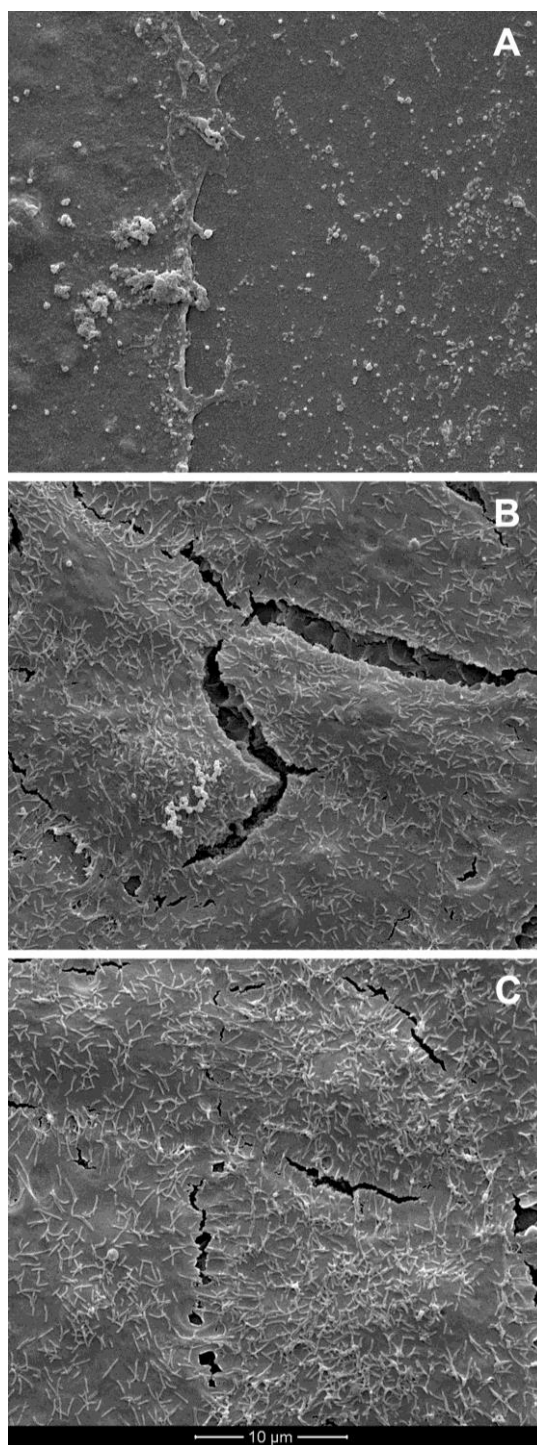


Figura 10. Analisi al FESEM dell'interazione tra DM-NP 1, AgNM20 e cellule Vero:
Cellule trattate per 72h (24+24+24 h) con il DM-NP 1 (A) e con AgNM20 (B);
Cellule di controllo (C)

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.

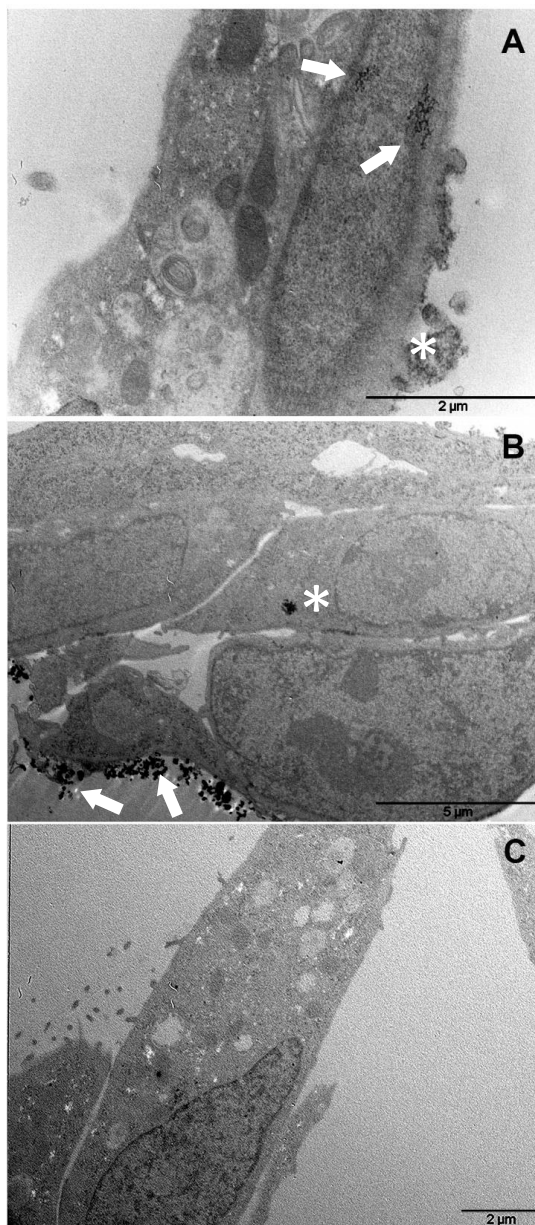


Figura 11. Analisi al TEM dell'interazione tra DM-NP 1, AgNM20 e cellule Vero:
Cellule trattate per 72h (24+24+24 h) con il DM-NP 1 (A) e con AgNM20 (B);
Cellule di controllo (C)

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 elettron denso 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).

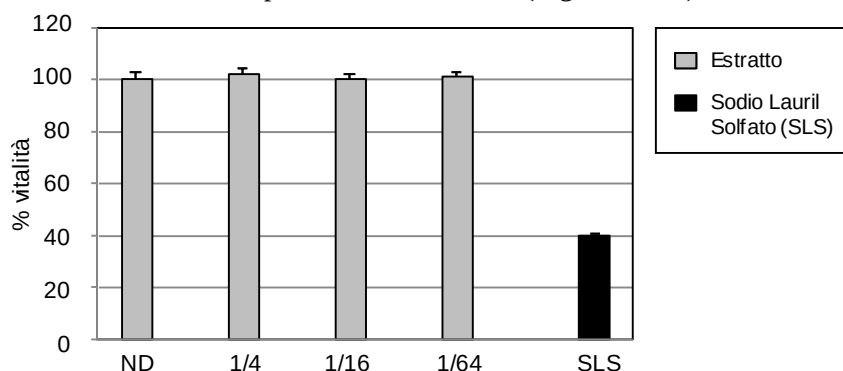


Figura 12. Estratto del DM-NP 2: risultati del saggio del Rosso Neutro
I dati sono la media $\pm$ SD di sei esperimenti

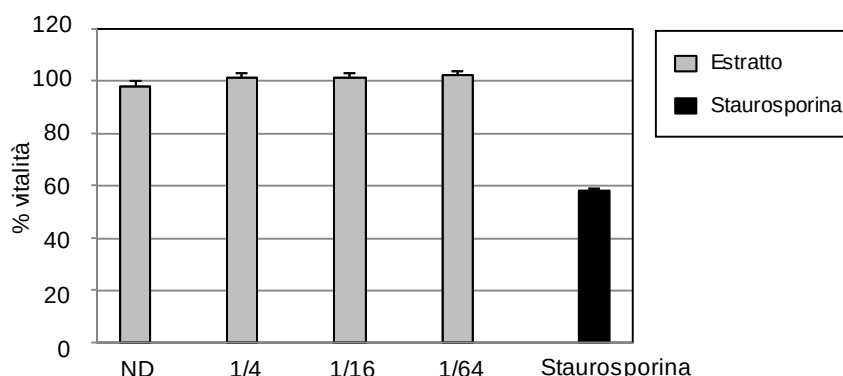


Figura 13. Estratto del DM-NP 2: risultati del test MTT.
I dati sono la media $\pm$ SD di sei esperimenti

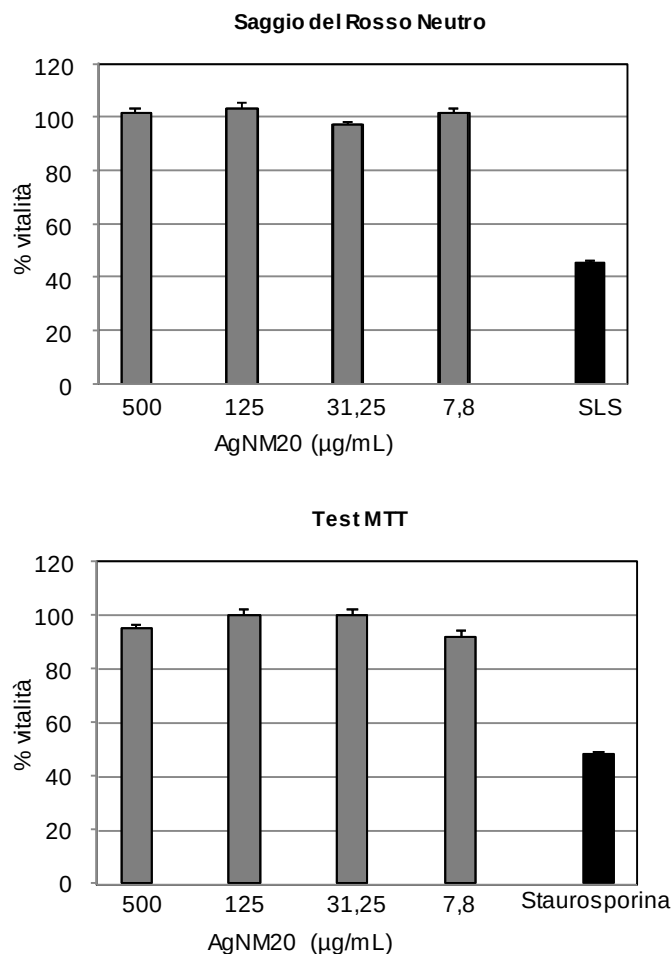


Figura 14. DM-NP 2: risultati del saggio del Rosso Neutro e del test MTT su AgNM20 (controllo). I dati sono la media $\pm$ SD di sei esperimenti

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.

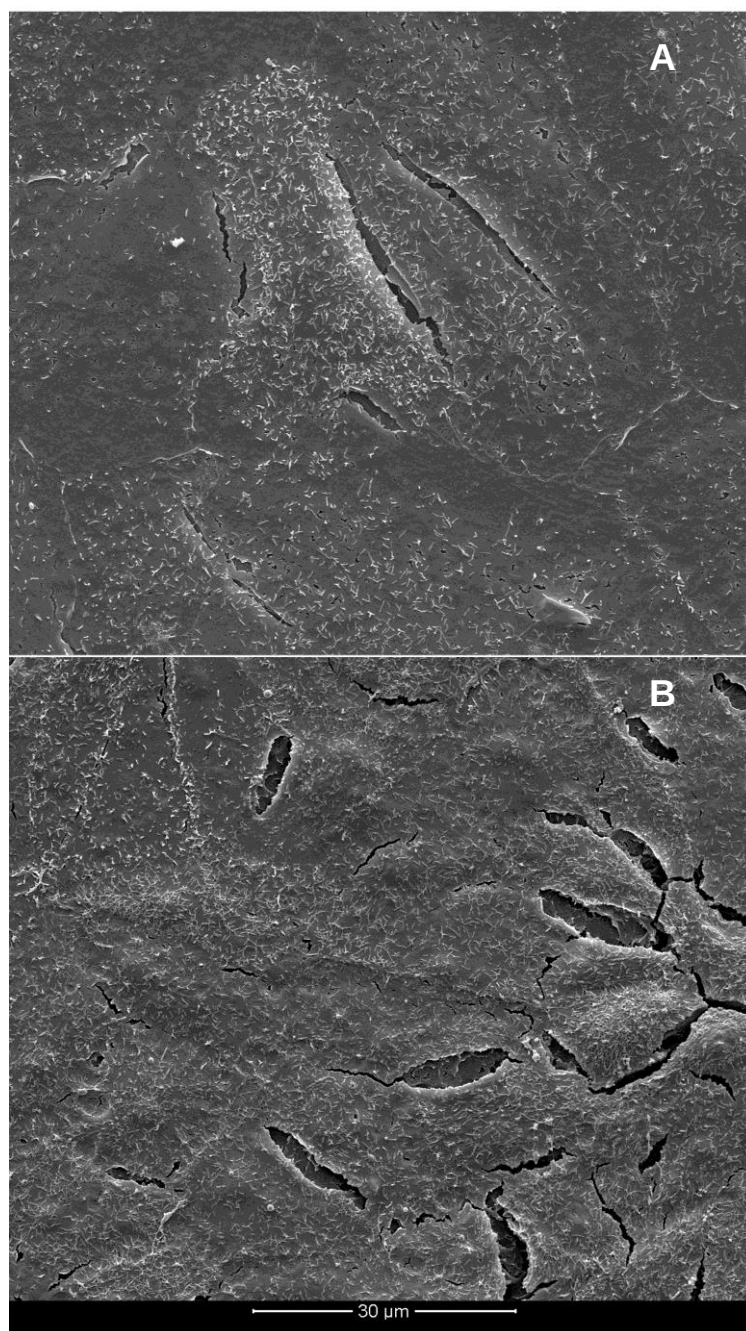


Figura 15. DM-NP 2: A: cellule di controllo; B: cellule trattate con l'estratto (non diluito)

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.

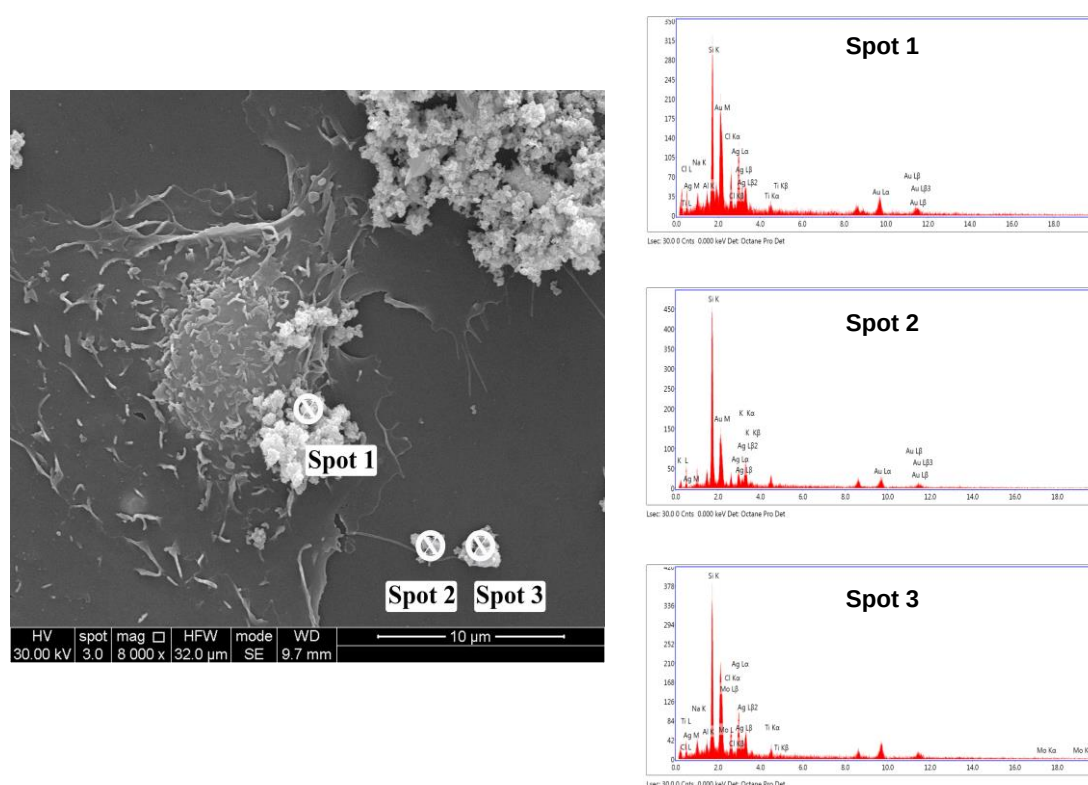


Figura 16. DM-NP 2: analisi al FESEM/EDX di cellule Vero trattate con AgNM20 (500 µg/mL) (controllo). Spot 1, 2, 3: spettri EDX acquisiti dagli agglomerati di AgNM20

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.

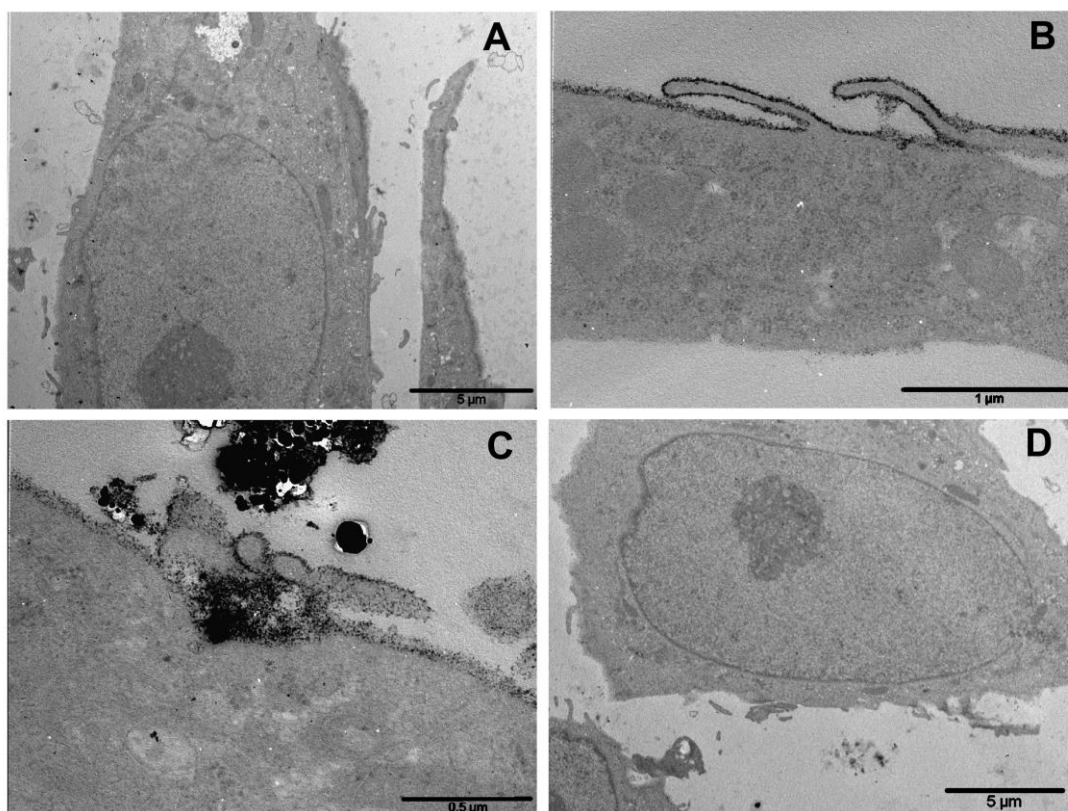


Figura 17. DM-NP 2: analisi al TEM dell'interazione tra estratto, AgNM20 e cellule Vero. A) Cellule trattate con l'estratto non diluito del DM-NP 2; B) Cellule trattate con AgNM20 (125 µg/mL); C) Cellule trattate con AgNM20 (500 µg/mL); D) Cellule di controllo

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.

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di dicembre 2018*

*Stampato in proprio
Servizio Comunicazione Scientifica – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, gennaio 2019