

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE E TECNOLOGIE CHIMICHE  
INDIRIZZO SCIENZE FARMACEUTICHE (XXIV CICLO)



A.D. MDLXII

## **MRI IN CAMPO BIOMEDICO E FARMACEUTICO : NANOPARTICELLE SPIO E OTTIMIZZAZIONE DEL CONTRASTO**

**Tutor :**  
**Prof.ssa Elisabetta Gavini**

**Tesi di Dottorato del**  
**Dott. Gilberto Mulas**

Anno Accademico : 2010-2011

*A MIA NONNA*

## ABSTRACT

Recently, great efforts have been made in order to develop new probes designed for Magnetic Resonance Imaging (MRI) and for cellular labeling. Superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles have been widely used as MRI negative contrast agents. Their major drawback is the difficulty in discriminating between SPIO induced signal loss and other sources of hypointense signal such as tissue interfaces, air or motion artifacts.

The objectives of present work were to prepare SPIO particles suitable for cell labelling and to develop new MRI techniques to obtain positive contrast from SPIO and other  $T_2$  agents like paramagnetic liposomes. SPIO particles were synthesized by the co-precipitation method and coated with citric acid, aminopropyltriethoxysilane (APTES) or polyamidoamine (PAMAM) dendrimers to reduce toxicity and to improve biocompatibility. Labeling experiments were performed by incubating stem cells and macrophages with different SPIO concentrations. Paramagnetic Dysprosium-HPDO3A complex encapsulating liposomes were prepared by the film rehydration method.

Cells were efficiently labeled with SPIO particles without loss of cell viability or proliferation. Positive contrast from SPIO was investigated and optimized using a modified IRON sequence. The positive contrast effect was detected for SPIO labeled cells and interestingly, it has been found that the potential of this approach may extend to paramagnetic agents accumulated in vesicles such as liposomes.

## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	Pag.8
PRINCIPI DI RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE (NMR)	Pag.9
✓ Tempo di rilassamento spin – reticolo $T_1$	Pag.12
✓ Tempo di rilassamento spin – spin $T_2$	Pag.12
PRINCIPI DI RISONANZA MAGNETICA PER IMMAGINI (MRI)	Pag.13
✓ Slice Selection	Pag.15
✓ Frequency encoding e Phase encoding	Pag.16
✓ Sequenze di acquisizione MRI e formazione dell'immagine	Pag.17
AGENTI DI CONTRASTO MRI	Pag.18
✓ Relassività	Pag.20
✓ Agenti di contrasto $T_1$	Pag.21
✓ Contributo inner sphere	Pag.22
✓ Contributo outer – sphere e second – sphere	Pag.23
✓ Agenti di contrasto $T_2$	Pag.23
✓ Meccanismo di rilassamento generato dalle SPIO	Pag.26
IMAGING MOLECOLARE E CELLULARE	Pag.27
APPLICAZIONI MRI IN CAMPO BIOMEDICO E FARMACEUTICO	Pag.29
SCOPO DEL LAVORO	Pag.31
<b>CAPITOLO I : SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI NANOPARTICELLE</b>	
SPIO	Pag.32
INTRODUZIONE	Pag.33
✓ Sintesi di nanoparticelle di ossido di ferro	Pag.33
MATERIALI E METODI	Pag.33
✓ Sintesi core magnetite	Pag.33
✓ Coating con acido citrico	Pag.34
✓ Coating con 3-amminopropiltriectossilano (APTES)	Pag.35
✓ Funzionalizzazione con Anidride Succinica	Pag.36
✓ Coupling con Bovine Serum Albumin (BSA)	Pag.37
✓ Modificazione della superficie con dendrimeri PAMAM	Pag.37
✓ Caratterizzazioni	Pag.40
✓ Analisi ai raggi X (XRD)	Pag.40

✓ Spettroscopia infrarossa in Trasformata di Fourier (FTIR)	Pag.41
✓ Analisi al Microscopio Elettronico a trasmissione (TEM)	Pag.41
✓ Analisi al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM)	Pag.42
✓ Dynamic Light Scattering (DLS)	Pag.42
✓ Elettroforesi SDS – PAGE	Pag.43
✓ Analisi MRI	Pag.44
✓ Analisi di Phantoms MRI	Pag.44
✓ Analisi MRI MC2	Pag.45
✓ Analisi MRI MNP PAMAM	Pag.46
✓ Calcolo della relaxività	Pag.47
✓ Relaxività e profili NMRD	Pag.47
✓ Quantificazione del Ferro	Pag.48
<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	Pag.49
✓ Analisi ai raggi X (XRD)	Pag.49
✓ FTIR delle nanoparticelle MC1 ed MC2	Pag.50
✓ FTIR delle nanoparticelle MAPTES1 E MAPTES2	Pag.51
✓ FTIR delle nano particelle MNP PAMAM	Pag.52
✓ Analisi al Microscopio Elettronico a trasmissione (TEM)	Pag.54
✓ Analisi al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM)	Pag.55
✓ Dynamic Light Scattering (DLS)	Pag.57
✓ Elettroforesi SDS – PAGE	Pag.57
✓ Analisi MRI MC2	Pag.58
✓ Analisi MRI MNP PAMAM	Pag.62
✓ Confronto relaxività tra MNP PAMAM	Pag.64
✓ Relaxività e profili NMRD	Pag.65
<b>CONCLUSIONI</b>	Pag.67
<b>CAPITOLO II : APPLICAZIONI BIOLOGICHE DELLE NANOPARTICELLE SPIO MC2 CON COATING DI ACIDO CITRICO</b>	Pag.68
<b>INTRODUZIONE</b>	Pag.69
✓ Cell Labeling con SPIO	Pag.69
✓ Cellule Staminali	Pag.70
✓ Macrofagi	Pag.71

MATERIALI E METODI	Pag.72
✓ Isolamento delle MSCs e coltura nel terreno specifico	Pag.72
✓ Esperimenti di cell labeling MSCs con MC2	Pag.72
✓ Conta cellulare e test di vitalità cellulare	Pag.73
✓ Adipogenesi	Pag.73
✓ Quantificazione del ferro intracellulare	Pag.73
✓ Analisi MRI su cellule staminali	Pag.74
✓ Labeling Macrofagi con SPIO MC2	Pag.74
✓ Colorazione con Prussian Blue	Pag.75
✓ Studi di citotossicità : test con resazurina	Pag.75
✓ Analisi MRI in vivo	Pag.76
RISULTATI E DISCUSSIONE	Pag.77
✓ Crescita e sviluppo delle cellule MSCs	Pag.77
✓ Esperimenti di cell labeling MSCs con MC2	Pag.77
✓ Conta cellulare e test di vitalità cellulare	Pag.80
✓ Adipogenesi	Pag.81
✓ Analisi MRI su cellule staminali e quantificazione del ferro	Pag.82
✓ Colorazione con Prussian Blue	Pag.83
✓ Studi di citotossicità : test con resazurina	Pag.84
✓ Analisi MRI in vivo	Pag.85
CONCLUSIONI	Pag.87
<b>CAPITOLO III : OTTIMIZZAZIONE DEL CONTRASTO MRI: SPIO E LIPOSOMI PARAMAGNETICI</b>	Pag.89
INTRODUZIONE	Pag.90
✓ Contrasto positivo con le particelle SPIO	Pag.90
✓ Liposomi e complessi paramagnetici	Pag.92
MATERIALI E METODI	Pag.93
✓ Ottimizzazione della Sequenza IRON modificata	Pag.93
✓ Preparazione liposomi con complesso di Disprosio incapsulato	Pag.93
✓ Sequenza IRON e cell labeling	Pag.94
RISULTATI E DISCUSSIONE	Pag.94
✓ Ottimizzazione della Sequenza IRON modificata	Pag.94
✓ Sequenza IRON, concentrazione ferro e volume di dispersione.	Pag.96

✓ Area, concentrazione e T <sub>2</sub>	Pag.96
✓ IRON e liposomi	Pag.97
✓ Sequenza IRON e cell labeling	Pag.98
CONCLUSIONI	Pag.99
CONCLUSIONI GENERALI	Pag.100
RINGRAZIAMENTI	Pag.101
BIBLIOGRAFIA	Pag.103

## INTRODUZIONE

La Risonanza Magnetica per Immagini (Magnetic Resonance Imaging, MRI) è una tecnica utilizzata in campo medico a scopo prevalentemente diagnostico per produrre immagini ad alta definizione dell'anatomia del corpo umano. Sin dal suo primo utilizzo, avvenuto nel 1973 per merito di P.C. Lauterbur, questa tecnica è diventata un'importante modalità di imaging non invasiva [1]. La tecnica MRI è basata sul fenomeno della Risonanza Magnetica Nucleare (NMR o MR) dimostrato per la prima volta, in maniera indipendente, da Bloch e Purcell nel 1946. Da allora la Risonanza Magnetica si è sviluppata in tecniche sofisticate con applicazioni in una larga varietà di discipline che ora includono fisica, chimica, biologia e medicina. Attraverso gli anni, la Risonanza Magnetica ha dimostrato di essere uno strumento valido per la determinazione della struttura molecolare e per lo studio delle dinamiche molecolari nei liquidi e nei solidi. Nei suoi più recenti sviluppi, l'applicazione della MR agli studi dei sistemi viventi ha attirato una considerevole attenzione da parte dei biochimici e dei clinici. Questi studi si sono evoluti lungo due strade parallele e complementari. Nella prima, la Risonanza Magnetica è utilizzata come un metodo spettroscopico per fornire informazioni chimiche sia da estratti cellulari e fluidi biologici (spettroscopia di risonanza magnetica nucleare NMR); sia da regioni selezionate all'interno di un sistema vivente in pratiche assolutamente non invasive (spettroscopia di risonanza magnetica MRS). Tali informazioni ottenute da un'area localizzata in un tessuto vivente forniscono preziosi dati metabolici che sono direttamente correlati allo stato di salute del tessuto stesso e, in principio, possono essere impiegate per monitorare la risposta del tessuto alla terapia. Nella seconda area di applicazione, la Risonanza Magnetica è adoperata come strumento di imaging diagnostico per ottenere informazioni anatomiche. Il rapido progresso della MR e la sua diffusione nelle diverse discipline scientifiche può essere in parte attribuito allo sviluppo delle tecniche a pulso con Trasformata di Fourier, introdotte alla fine degli anni sessanta. Un ulteriore impeto è stato dato dall'espansione dei Fast Fourier transform algorithms, dai progressi nella tecnologia del computer e dall'avvento dei magneti superconduttori ad alto campo. In seguito, l'introduzione di nuovi concetti sperimentali come la Risonanza Magnetica Bidimensionale, hanno permesso un ulteriore ampliamento delle sue potenziali applicazioni. Recentemente (Premio

Nobel P. Manfield e P.C. Lauterbur nel 2003), gli sviluppi della tecnica di Risonanza Magnetica per Immagini (MRI), hanno permesso l'applicazione di questo fenomeno fisico a sistemi in vivo e i continui miglioramenti tecnologici potenziano velocemente l'efficacia di questa disciplina [2].

In termini più specifici, l'MRI è una tecnica di imaging tomografico in grado di produrre immagini rappresentanti la distribuzione spaziale di determinate caratteristiche chimiche e fisiche interne di un oggetto a partire da segnali di risonanza magnetica. In particolare in campo biomedico i segnali a cui ci si riferisce sono quelli generati dai nuclei protonici ( $^1\text{H}$ ) delle molecole d'acqua o di grasso presenti nel campione sottoposto ad analisi [3, 4]. A differenza di altre tecniche di imaging tomografico, come la Positron Emission Tomography (PET), la Computed Tomography (CT) e la Single Photon Computed Tomography (SPECT), la tecnica MRI può generare : immagini di sezioni bidimensionali in ogni orientazione, immagini volumetriche tridimensionali e persino immagini a quattro dimensioni rappresentanti distribuzioni spaziali – spettrali o spaziali – temporali (es. imaging cardiaco) [2]. Inoltre la tecnica MRI non necessita dell'impiego di isotopi radioattivi per la generazione del segnale, come nel caso della PET o della SPECT, ed in più opera nel range delle radio frequenze. Per questo motivo il processo di imaging non implica l'uso di radiazioni ionizzanti e non ha effetti potenzialmente dannosi [5]. L'MRI risulta essere pertanto una pratica assolutamente non invasiva, e per questo è considerata una delle tecniche di elezione per l'analisi in vivo.

### **PRINCIPI DI RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE (NMR)**

Il fenomeno della Risonanza Magnetica Nucleare si basa sulla proprietà chimico fisica definita spin nucleare. Questa è la capacità di ruotare intorno al proprio asse nucleare, posseduta da alcuni nuclei contenenti un numero dispari di protoni o neutroni [4]. Il movimento di rotazione può essere rappresentato in termini di momento angolare di spin  $P$ , che a sua volta viene descritto dal numero quantico di spin  $I$  [6]. Quest'ultimo può assumere valori  $0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}$  e così via ( $I = 0$  significa nessuno spin). Nella tabella 1 sono riportati i valori corrispondenti ad alcuni dei nuclei principalmente utilizzati in NMR e MRI, tra i quali l'idrogeno  $^1\text{H}$  l'elemento più presente in natura e nel corpo umano.

**Tabella 1. Nuclei principalmente utilizzati in MRI e loro numero di Spin**

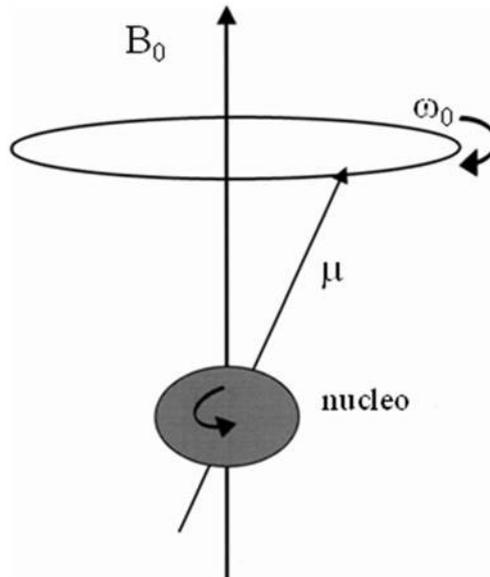
Nuclei	Protoni Spaiati	Neutroni Spaiati	Spin
<sup>1</sup> H	1	0	1/2
<sup>2</sup> H	1	1	1
<sup>31</sup> P	1	0	1/2
<sup>23</sup> Na	1	2	3/2
<sup>14</sup> N	1	1	1
<sup>13</sup> C	0	1	1/2
<sup>19</sup> F	1	0	1/2

I nuclei sono delle particelle cariche, pertanto la rotazione intorno al proprio asse genera un dipolo magnetico la cui intensità intrinseca è definita da un altro parametro chimico fisico: il momento magnetico nucleare  $\mu$ . La relazione tra il momento angolare di spin  $P$  di un nucleo e il momento magnetico  $\mu$  è descritta dalla seguente equazione :

$$\mu = \gamma P$$

dove  $\gamma$  rappresenta il rapporto giromagnetico, una costante fondamentale dei nuclei proporzionale al rapporto carica / massa. Quando un nucleo è posizionato all'interno di un campo magnetico applicato esterno (generalmente indicato con  $B_0$ ), il suo momento magnetico  $\mu$  tende a precedere nella direzione del campo magnetico  $B_0$  (Figura 1). La frequenza di precessione, definita Frequenza di Larmor ( $\omega_0$ ), è caratteristica per ciascun nucleo ed è direttamente proporzionale all'intensità del campo magnetico applicato  $B_0$  come espresso dalla seguente equazione [7] :

$$\omega_0 = \gamma B_0$$



**Figura 1. Movimento di precessione di un nucleo intorno ad un campo magnetico esterno**

Nel movimento di precessione il nucleo può assumere differenti orientazioni, che dipendono dal numero quantico di spin  $I$ , in accordo con la formula  $2I + 1$ . Nel caso del nucleo protonico  $^1\text{H}$  (con  $I = \frac{1}{2}$ ) sono possibili soltanto due orientazioni. A queste orientazioni corrispondono diversi livelli di energia, la cui differenza è direttamente proporzionale all'intensità del campo magnetico applicato :

$$\Delta E = \gamma B_0$$

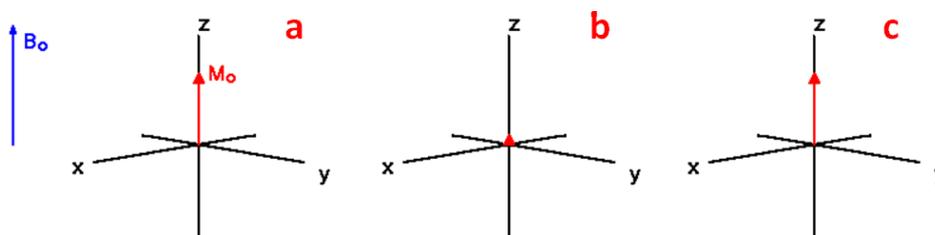
E' proprio su questa differenza di energia che si basa il fenomeno della risonanza magnetica nucleare. Se si irradia il campione con un pulso di radiofrequenza (RF) di energia pari alla differenza fra i livelli energetici del campione, ha luogo la risonanza e si registra l'assorbimento dell'energia RF. Dopo un determinato periodo di tempo il sistema tornerà allo stato di equilibrio attraverso vari processi di rilassamento, causando di conseguenza un decadimento del segnale elettrico indotto. Questo decadimento, definito decadimento dell'induzione libera o free induction decay (FID), rappresenta il segnale di output della Risonanza Magnetica Nucleare. Il processo di rilassamento può essere espresso in termini di rilassamento spin – reticolo o longitudinale descritto dal tempo  $T_1$ , e dal rilassamento spin – spin o trasversale descritto dal tempo  $T_2$  [8].

### Tempo di rilassamento spin – reticolo $T_1$

Il tempo di rilassamento  $T_1$  è definito tempo di rilassamento spin – reticolo, poiché descrive il processo di rilassamento attraverso interazioni dipolari tra il sistema di spin (che rappresenta il nucleo o campione) e il reticolo, vale a dire tutto ciò che sta intorno al nucleo. Il tempo  $T_1$  è anche definito tempo di rilassamento longitudinale poiché, in base alla fisica classica e alla rappresentazione grafica vettoriale del fenomeno della risonanza magnetica, descrive il ritorno all'equilibrio della magnetizzazione lungo l'asse longitudinale generalmente indicato con Z (Figura 2). L'equazione che esprime questo fenomeno in funzione del tempo  $t$  è la seguente:

$$M_z = M_0 ( 1 - e^{-t/T_1} )$$

Dove  $M_z$  rappresenta la magnetizzazione lungo l'asse longitudinale Z,  $M_0$  la magnetizzazione all'equilibrio ed il tempo di rilassamento  $T_1$  la costante di tempo del processo.



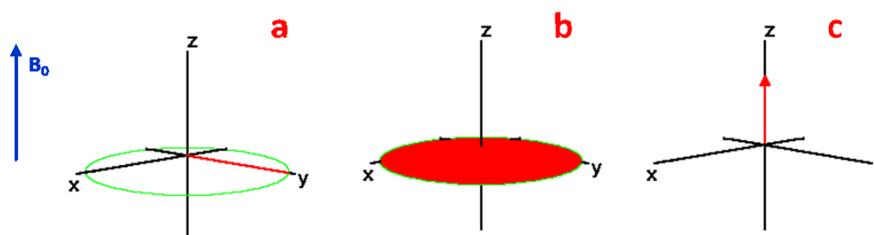
**Figura 2. Rappresentazione vettoriale del processo di rilassamento  $T_1$ . a) Magnetizzazione all'equilibrio, b) Magnetizzazione dopo l'eccitazione di Radiofrequenza, c) Ritorno della magnetizzazione alle condizioni di equilibrio.**

### Tempo di rilassamento spin – spin $T_2$

Il tempo di rilassamento  $T_2$  è definito tempo di rilassamento spin – spin, perché descrive il processo di rilassamento attraverso un'interazione dipolare tra tutti i sistemi di spin presenti nel campione. Viene definito anche come tempo di rilassamento trasversale poiché, sempre in termini vettoriali, rappresenta il ritorno all'equilibrio della componente del vettore di magnetizzazione nel piano trasversale XY (Figura 3):

$$M_{xy} = M_{xy0} e^{-t/T_2}$$

In questa equazione  $M_{xy}$  rappresenta la componente della magnetizzazione nel piano XY,  $M_{xy0}$  la componente della magnetizzazione lungo XY immediatamente dopo il pulso di eccitazione RF e il tempo di rilassamento  $T_2$  la costante di tempo del ritorno all'equilibrio[9].



**Figura 3. Rappresentazione vettoriale del processo di rilassamento  $T_2$ . a) Magnetizzazione nel piano XY immediatamente dopo il pulso di eccitazione RF, b) “Defasamento” della magnetizzazione dovuto all’interazione spin – spin, c) Ritorno della magnetizzazione alle condizioni di equilibrio.**

### **PRINCIPI DI RISONANZA MAGNETICA PER IMMAGINI (MRI)**

La tecnica MRI è una modalità di imaging tomografico utilizzata prevalentemente in campo biomedico, diagnostico e nel settore della ricerca scientifica. Come sottolineato in precedenza questa tecnica è in grado di generare immagini a partire dai segnali NMR dei nuclei protonici  $^1\text{H}$  delle molecole d’acqua o di grasso contenute nel campione che si sottopone ad analisi. Il principio di funzionamento della tecnica MRI è basato sull’applicazione di gradienti di campo magnetico, piuttosto che di un solo campo magnetico esterno come avviene generalmente nella tecnica NMR. I gradienti di campo vengono utilizzati per codificare spazialmente i segnali NMR provenienti dal campione e allo stesso tempo per poterli differenziare in base alla loro localizzazione spaziale [10]. E’ possibile esprimere meglio questo concetto attraverso un semplice esempio. Assumendo che il cranio di un dato paziente contenga solamente tre piccole regioni dove è presente una certa densità di spin di idrogeno, e applicando a queste regioni un campo magnetico esterno omogeneo, nel corrispondente spettro NMR sarebbe presente un solo picco di assorbimento ( Figura 4).

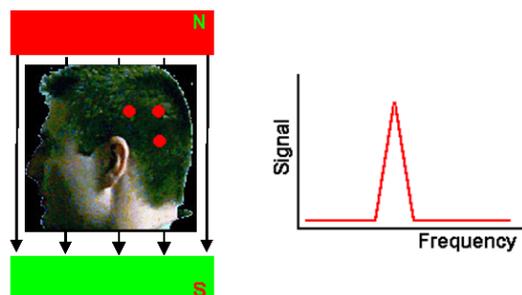


Figura 4. Esempio di un campione posto in un campo magnetico esterno omogeneo [9].

Per ottenere informazioni spaziali e contemporaneamente discriminare le tre regioni di spin, risulta pertanto necessaria l'applicazione di un gradiente di campo magnetico. In termini più semplici, questo gradiente può essere definito come la variazione del campo magnetico rispetto alla posizione lungo una determinata direzione [9].

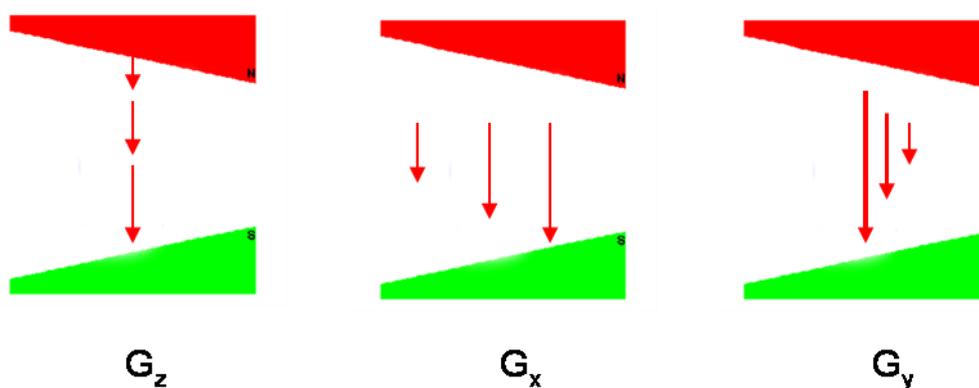


Figura 5. Gradienti di campi magnetici lungo le direzioni Z,X,Y.

In Figura 5 è riportato un esempio grafico rappresentante tre gradienti di campo magnetico (chiamati  $G_z$ ,  $G_x$ ,  $G_y$ ) lungo tre direzioni Z, X, Y. La lunghezza dei vettori (freccie rosse) sta ad indicare l'intensità del campo magnetico. Questi gradienti sono prodotti dalla combinazione del campo magnetico omogeneo principale  $B_0$  con piccoli campi magnetici (generati da apposite bobine) diretti nelle varie direzioni. Se, per esempio, un campione è sottoposto ad un gradiente  $G_x$  (lungo la direzione del piano X), i nuclei  $^1\text{H}$  in esso presenti sperimentano un'intensità di campo uguale a:

$$B_z(x) = B_0 + xG_x$$

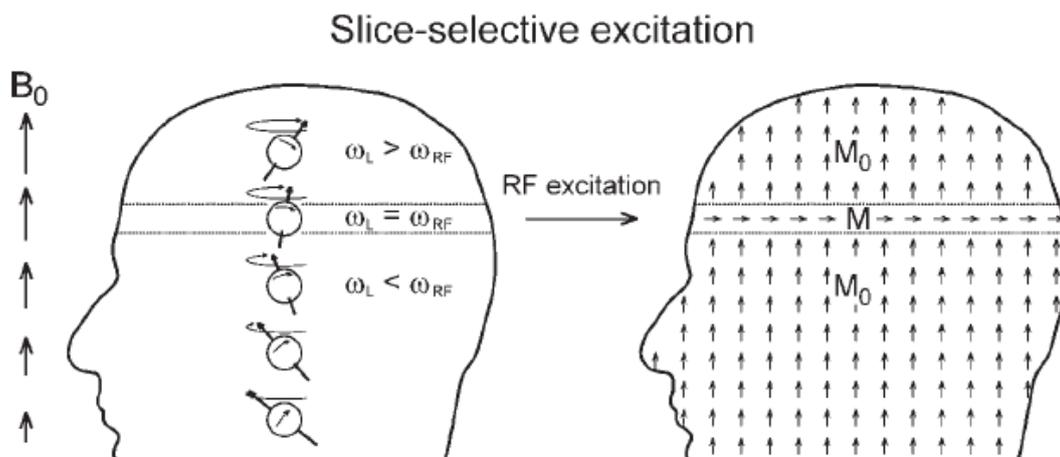
Dove  $B_z$  rappresenta il campo magnetico presente nella posizione  $x$ . Dal momento che la frequenza di Larmor di un nucleo è proporzionale al campo applicato ( $\omega = \gamma B_0$ ), i protoni  $^1\text{H}$  possiedono differenti frequenze di Larmor a differenti coordinate di  $x$  :

$$\omega(x) = \gamma(B_0 + x G_x)$$

Così, in presenza di un gradiente  $G_x$ , a piani di forza costante di campo corrispondono piani di frequenza di risonanza costante. Per questa ragione l'equazione precedente esprime una relazione diretta tra la posizione di un nucleo e la sua frequenza di risonanza (questa relazione è valida a prescindere dalla direzione del gradiente, può essere applicata per esempio anche per i gradienti  $G_z, G_y$ ) [2]. Basandosi su questo concetto, per ricostruire un'immagine i segnali derivanti da ciascun punto all'interno di un tessuto o di un organo devono essere correttamente identificati e mappati con i corrispondenti punti all'interno dell'immagine. Generalmente nella tecnica MRI vengono utilizzati tre principali metodi di discriminazione spaziale che utilizzano gradienti di campo: 1) Slice selection (selezione del piano di immagine), 2) Frequency encoding (codifica di frequenza) e 3) Phase encoding (codifica della fase).

### **Slice Selection**

La metodica di slice selection viene impiegata per eccitare in maniera simultanea i nuclei presenti in una specifica slice (sezione) di un tessuto o di un organo. Una volta eccitati, tutti i nuclei appartenenti alla sezione emetteranno segnale altrettanto simultaneamente. L'applicazione di un pulso di eccitazione RF in maniera contemporanea all'accensione del gradiente di campo magnetico fa in modo che vengano eccitati soltanto i nuclei la cui frequenza di Larmor  $\omega_L$  (o  $\omega_0$ ) eguaglia la frequenza  $\omega_{RF}$  del pulso RF applicato. La condizione  $\omega_L = \omega_{RF}$  è soddisfatta soltanto per i nuclei giacenti in una particolare sezione di tessuto perpendicolare al gradiente di campo magnetico (Figura 6).



**Figura 6. Rappresentazione grafica della slice selection. La presenza del gradiente produce una variazione lineare dell'intensità del campo magnetico  $B_0$  che da origine ad una variazione spaziale del valore della frequenza di Larmor. Sono eccitati solo i nuclei che soddisfano la condizione  $\omega_L = \omega_{RF}$  [4].**

Lo spessore della sezione dipende da parametri tecnici e strumentali come la bandwidth (larghezza di banda) del pulso RF e l'ampiezza del gradiente [4].

### Frequency encoding e Phase encoding

Dal momento che il pulso RF eccita tutto il tessuto presente nella slice selezionata, il segnale emesso rappresenta la somma dei contributi di tutti i nuclei presenti all'interno di essa. Per identificare singolarmente ciascun contributo, un'informazione spaziale viene codificata nel segnale per mezzo dell'applicazione di altri due gradienti successivi al pulso di eccitazione. Uno di questi è il gradiente di frequency encoding che, durante l'acquisizione dei dati, introduce un'informazione spaziale nella frequenza del segnale in base all'equazione  $\omega(n) = \gamma(B_0 + n G_n)$ . Perciò tessuti posizionati in punti dove il campo magnetico  $B_0$  è leggermente più forte avranno un segnale con una frequenza maggiore e viceversa. Il segnale dell'intera slice conterrà pertanto un range di frequenze corrispondenti ai contributi dei singoli elementi del tessuto. La tecnica di frequency encoding non è sufficiente per ricostruire l'immagine, poiché fornisce informazioni posizionali solo in una direzione [11]. Per questo motivo informazioni nella direzione perpendicolare sono ottenute tramite il meccanismo definito di phase encoding (Figura 7). Il principio di

applicazione di questo gradiente è simile al precedente, con l'unica differenza che nel frequency encoding i dati vengono acquisiti in continuo, mentre nel phase encoding in maniera discreta ed intervallata. Il processo di phase encoding viene ripetuto varie volte incrementando gradualmente l'ampiezza del gradiente.

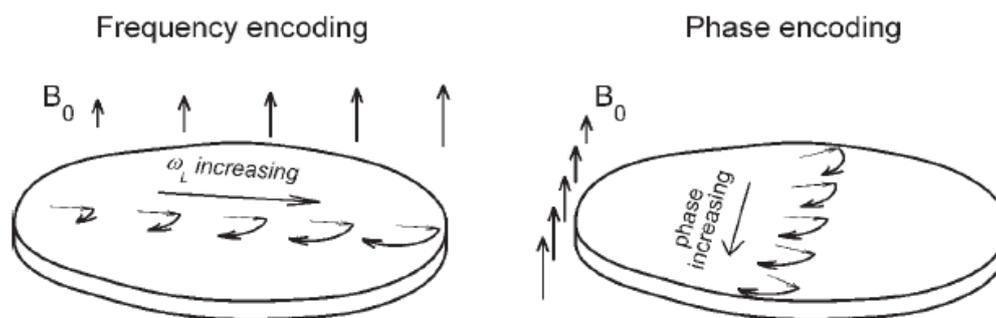


Figura 7. Rappresentazione grafica del Frequency e Phase encoding [4].

### Sequenze di acquisizione MRI e formazione dell'immagine

Una sequenza di acquisizione MRI è costituita da un insieme di impulsi di radiofrequenza RF di eccitazione intervallati da periodi di tempo (indicati con T e con altre abbreviazioni a seconda dei casi) nei quali si permette ai vari nuclei presenti nel campione di evolvere, rilassare e ritornare alle condizioni di equilibrio. Durante l'applicazione della sequenza l'intensità del segnale dei nuclei varia passando da valori minimi a massimi (echo), in maniera differente a seconda delle condizioni. Per ottenere un'immagine è necessario ripetere la sequenza di acquisizione varie volte. Parametri fondamentali da settare prima di un'acquisizione MRI sono il repetition time (TR), ovvero il tempo che intercorre tra una sequenza e quella successiva e l'echo time (TE) definito come il tempo che trascorre tra il pulso RF e l'ampiezza massima dell'echo. Altri parametri importanti sono il numero e lo spessore delle slices ed il field of view (FOV), l'area (quadrata o rettangolare) dell'immagine che contiene il campione che si sta sottoponendo ad analisi. In Figura 8 è riportato il diagramma temporale, la tipica rappresentazione grafica, di una generica sequenza MRI.

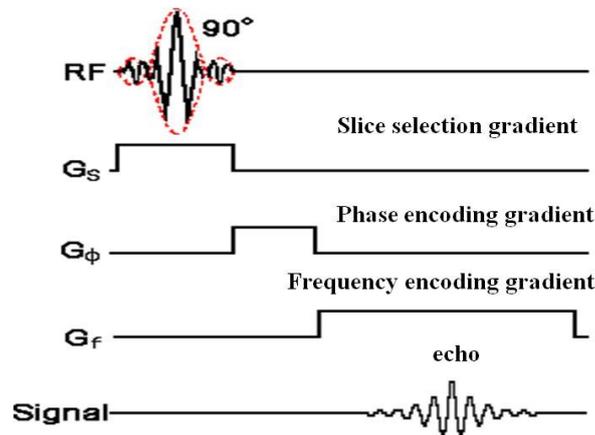


Figura 8. Diagramma temporale di un generica sequenza MRI

Dopo la ripetizione di  $n$  sequenze per una o più slices, i dati vengono immagazzinati nel computer in un array bidimensionale, definito  $k$ -space, e attraverso l'applicazione della Trasformata di Fourier bidimensionale (2DFT) si ottiene l'immagine desiderata [12] (Figura 9).

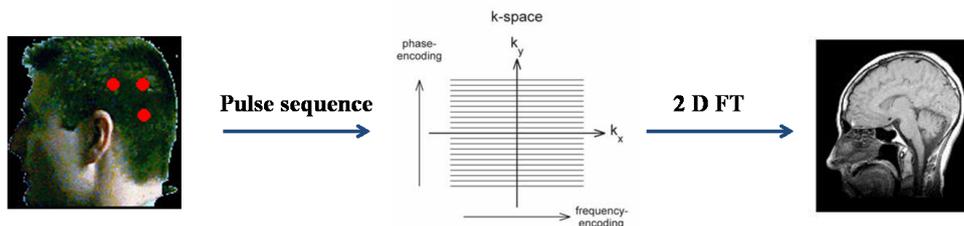


Figura 9. Schema riassuntivo della formazione dell'immagine MRI.

### AGENTI DI CONTRASTO MRI

Una tipica immagine MRI è una mappa raffigurante l'intensità del segnale NMR dei protoni delle molecole d'acqua. Il contrasto all'interno dell'immagine deriva proprio da differenze nell'intensità di questo segnale : regioni chiare corrispondono a grandi valori di intensità, mentre regioni scure coincidono con bassi valori (Figura 10). I fattori principali che determinano il contrasto MRI possono essere divisi in due categorie : intrinseci (dipendenti dal campione) ed estrinseci (dipendenti dall'esperimento). Tra i primi si possono citare i tempi di rilassamento  $T_1$  e  $T_2$  e la densità di spin (la quantità di acqua presente nel campione). Nella seconda categoria

sono invece compresi la forza del campo magnetico applicato, le sequenze di pulso e l'uso di agenti di contrasto. Il principale svantaggio dell'impiego della tecnica MRI come modalità di imaging è la sua intrinseca e relativa bassa sensibilità, se paragonata con metodi nucleari come PET e SPECT [13]. Questo comporta delle difficoltà nella visualizzazione della differenza di contrasto tra tessuti sani e patologici. Per indurre un contrasto addizionale è richiesto perciò l'uso di sostanze che siano in grado di influenzare alcune proprietà dei protoni dell'acqua fino ad ottenere un risultato osservabile. Tali sostanze sono chiamate agenti di contrasto MRI (CA). Negli ultimi anni il loro impiego è diventato parte integrante della tecnologia MRI per diverse applicazioni, infatti circa il 35% delle analisi viene ormai effettuato per mezzo di CA. E' verosimile inoltre che questa percentuale aumenti ulteriormente con lo sviluppo di nuovi agenti più efficienti e target specifici. Gli CA sono composti paramagnetici, superparamagnetici o ferromagnetici che in maniera catalitica accorciano i tempi di rilassamento dei protoni dell'acqua [14]. Tutti gli agenti di contrasto abbreviano sia il tempo di rilassamento spin – reticolo  $T_1$  che il tempo di rilassamento spin – spin  $T_2$ . Tuttavia è utile classificare gli agenti di contrasto in due gruppi : quelli che aumentano prevalentemente la velocità di rilassamento longitudinale ( $1/T_1$ ) e quelli che aumentano in prevalenza la velocità di rilassamento trasversale ( $1/T_2$ ). Alla prima categoria appartengono gli agenti  $T_1$ , anche chiamati agenti di contrasto positivi, poiché, mediante la ripetizione di varie sequenze di pulso, il loro effetto di riduzione del tempo  $T_1$  porta ad un aumento dell'intensità del segnale all'interno dell'immagine nelle zone dove essi sono localizzati. Gli agenti  $T_2$  sono invece definiti negativi, poiché per mezzo della loro capacità di diminuire selettivamente il  $T_2$  dei tessuti, causano una riduzione dell'intensità del segnale nelle zone dove essi sono accumulati, rendendole pertanto più scure. I complessi dei metalli paramagnetici appartenenti alla famiglia dei lantanidi (Gd, Dy, Tb) sono i principali rappresentanti degli agenti  $T_1$ , mentre le nanoparticelle superparamagnetiche di ossido di Ferro (SPIO) sono un esempio di agenti  $T_2$  (Figura 11).

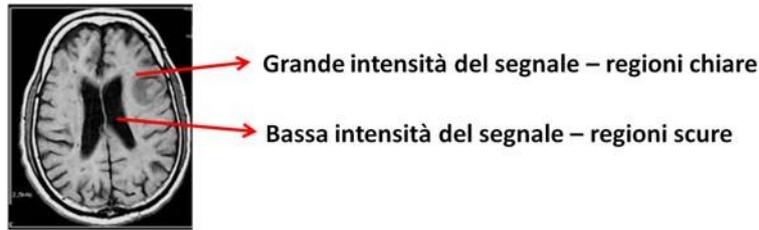


Figura 10. Contrasto in un immagine MRI

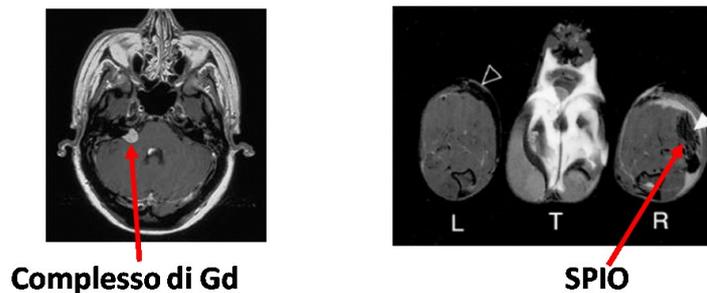


Figura 11. Agenti di contrasto positivi (a sinistra) e agenti di contrasto negativi (a destra)

### Relassività

La capacità di un agente di contrasto nel cambiare la velocità di rilassamento longitudinale ( $1/T_1$ ) e trasversale ( $1/T_2$ ) dei nuclei protonici viene espressa come relassività,  $r_1$  o  $r_2$  a seconda che ci si riferisca rispettivamente a  $1/T_1$  o  $1/T_2$ . In termini più specifici la relassività  $r_i$  è definita come la variazione della velocità di rilassamento dei protoni di un campione/tessuto dopo l'introduzione dell'agente di contrasto, normalizzata per la concentrazione dello ione metallico o dell'agente stesso :

$$(1/T_i)_{obs} = (1/T_i)_d + r_i [M] \quad i = 1, 2$$

Dove  $(1/T_i)_{obs}$  è la velocità di rilassamento in presenza dell'agente di contrasto,  $(1/T_i)_d$  la velocità di rilassamento (diamagnetica) in assenza di agente di contrasto ed  $[M]$  la concentrazione dello ione metallico o dell'agente di contrasto [14]. Il rapporto  $r_2/r_1$  è un indicatore delle proprietà rilassometriche di un agente di imaging, e viene spesso utilizzato per classificare un dato agente MRI come agente  $T_1$  o agente  $T_2$ . In generale per i complessi paramagnetici  $r_2/r_1$  varia tra 1 e 2, mentre per le nanoparticelle ed i colloidi superparamagnetici può raggiungere il valore di 50 [15].

## Agenti di contrasto T<sub>1</sub>

In presenza di un forte campo magnetico esterno, il momento magnetico degli ioni metallici paramagnetici si allinea con il campo magnetico applicato. Il moto molecolare di queste sostanze paramagnetiche può generare un campo magnetico locale fluttuante intorno ai protoni che si trovano nelle vicinanze. In queste condizioni si instaura un'interazione dipolare magnetica tra il momento magnetico dell'atomo paramagnetico e il più piccolo momento magnetico dei protoni delle molecole d'acqua. Le fluttuazioni casuali di queste interazioni dipolari riducono sia il tempo di rilassamento longitudinale T<sub>1</sub>, che il tempo di rilassamento trasversale T<sub>2</sub> dei protoni. Tra i vari metalli paramagnetici sono stati scelti come agenti di rilassamento lo ione Gadolinio [Gd(III)] e il Manganese [Mn(II)], sottoforma di complessi multimerici assemblati con legami covalenti (polimeri, dendrimeri,) [16] o non covalenti (liposomi) [17,18]. La scelta è ricaduta sul Gadolinio e sul Manganese poiché possiedono un grande momento magnetico (dovuto alla presenza di numerosi elettroni spaiati) e un lungo tempo di rilassamento elettronico [19, 20]. Per capire meglio il processo di rilassamento dei protoni, risulta utile classificare l'acqua che circonda il complesso metallico in tre categorie : inner sphere – water, dove l'ossigeno dell'acqua è direttamente coordinato con lo ione (Gd, Mn); second – sphere water, costituito dalle molecole d'acqua che idratano il complesso e hanno un tempo di residenza finito che è più lungo del tempo di traslazione diffusionale dell'acqua pura; ed infine outer sphere water, dove l'interazione tra l'acqua e lo ione è governata solamente dalla diffusione traslazionale (Figura 12) [14]. L'interazione dipolare magnetica coinvolge le molecole d'acqua di tutte e tre le sfere d'idratazione, di conseguenza la rilassività totale è espressa come somma dei tre contributi :

$$r_i = r_i^{is} + r_i^{ss} + r_i^{os} \quad (i = 1, 2)$$

dove  $r_i^{is}$  rappresenta la rilassività della inner-sphere,  $r_i^{ss}$  quella della second sphere, ed infine  $r_i^{os}$  la rilassività della outer sphere. I tre differenti contributi descrivono l'abilità dell'agente di contrasto nel catalizzare il rilassamento nucleare magnetico dei protoni dell'acqua, ed essi stessi si presentano in differenti gradi di importanza relativa nel determinare la rilassività totale.

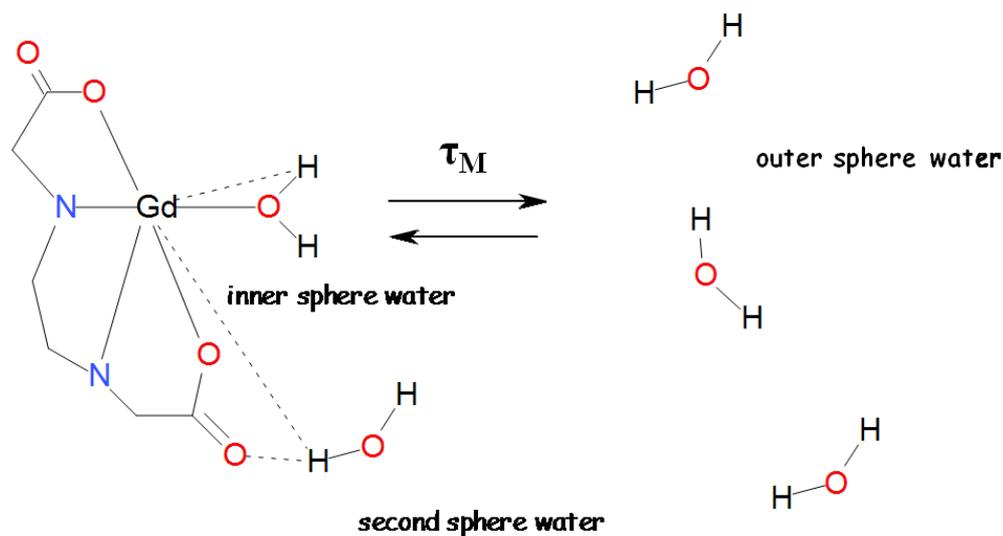


Figura 12. Sfere d'idratazione di un generico complesso di Gd.

### Contributo inner sphere

Tutti gli agenti di contrasto a base di gadolinio commercialmente disponibili presentano una o più molecole d'acqua nella loro sfera più interna di coordinazione. Le molecole d'acqua, dal sito di coordinazione del complesso, sono in scambio con l'acqua bulk circostante. La rilassività longitudinale è data dalla seguente equazione :

$$r_{1}^{is} = \frac{[CA] q}{55,6} \frac{1}{T_{1M} + \tau_M}$$

Dove q è il numero d'idratazione, che indica il numero di molecole d'acqua legate al metallo,  $\tau_M$  è il tempo di residenza nella sfera più interna e  $T_{1M}$  è il tempo di rilassamento longitudinale dei protoni dell'acqua legata.  $T_{1M}$  e  $\tau_M$  devono essere i più brevi possibili per avere un valore di rilassività accettabile . I valori di  $T_{1M}$  e di  $\tau_M$  sono dati dalle equazioni di Solomon – Bloembergen – Morgan (SBM) :

$$\frac{1}{T_{1M}} = \frac{2}{15} \frac{\gamma^2_{\text{H}} g^2 S(S+1) \beta^2}{r_{\text{H}}^6} \left[ \frac{3\tau_{\text{C1}}}{1 + \omega^2_{\text{H}} \tau_{\text{C1}}^2} + \frac{7\tau_{\text{C2}}}{1 + \omega^2_{\text{S}} \tau_{\text{C2}}^2} \right]$$

$$\frac{1}{\tau_{\text{C1}}} = \frac{1}{\tau_{\text{R}}} + \frac{1}{t_{\text{M}}} + \frac{1}{T_{1e}}$$

Queste due equazioni comprendono diversi parametri di risonanza magnetica nucleare, fra questi si può sottolineare l'importanza del tempo di correlazione  $\tau_{\text{C}}$ , un parametro indicativo della mobilità di una molecola. Il tempo di correlazione  $\tau_{\text{C}}$  è governato in maniera preponderante dal tempo di correlazione rotazionale  $\tau_{\text{R}}$ . Essendo  $\tau_{\text{R}}$  proporzionale all'effettivo raggio molecolare,  $\tau_{\text{C}}$  e di conseguenza  $r_1^{\text{is}}$ , sono determinati in maniera preponderante dalle dimensioni e dal peso molecolare del complesso [18].

### Contributo outer – sphere e second – sphere

Anche la outer – sphere e la second sphere danno un contributo alla rilassività totale. Questo contributo è descritto dal modello hard sphere di Hwang e Freed, dove il rilassamento è determinato principalmente dal coefficiente di diffusione dell'acqua. [14].

### Agenti di contrasto $T_2$

Le principali rappresentanti degli agenti di contrasto  $T_2$  sono le nanoparticelle Superparamagnetiche di ossido di ferro (SPIO) [21]. Esse sono costituite generalmente da due componenti principali, un nucleo cristallino magnetico di ossido di ferro (definito core) e un coating di superficie usualmente idrofilico. Il core è composto da una miscela di ossidi di ferro, magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e maghemite ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), nella quale gli atomi di ossigeno sono strettamente compattati in una struttura cristallografica cubica definita spinello inverso (o anti-spinello). La miscela viene anche definita magnetite non stechiometrica, poiché la magnetite può essere convertita a maghemite in condizioni ossidative e in maniera inversa la maghemite si riduce a magnetite in ambiente riducente [13]. Le due forme di ossido di ferro

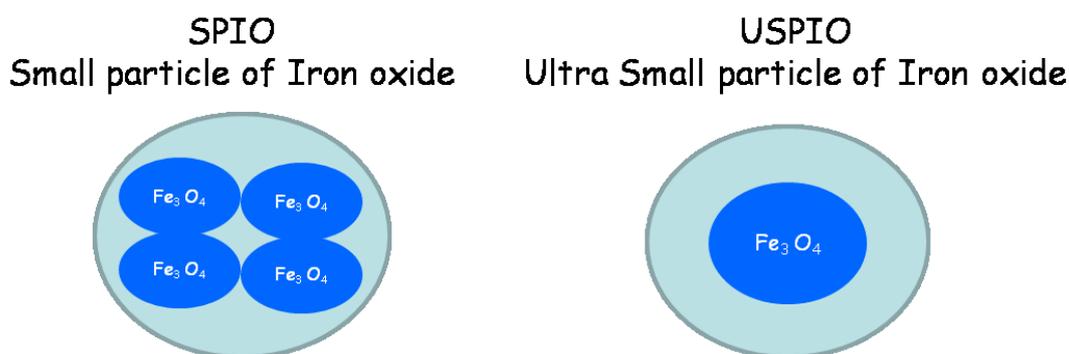
esibiscono proprietà magnetiche molto simili, infatti sia la magnetite che la maghemite possono essere definite superparamagnetiche. Il superparamagnetismo è un fenomeno che si verifica quando le nanoparticelle possiedono un diametro compreso tra 1 e 20 nm. In queste condizioni infatti le particelle risultano essere più piccole di un dominio magnetico di Weiss e possono essere considerate a singolo dominio. In presenza di un campo magnetico esterno gli spin magnetici dei vari domini si allineano generando un grande momento magnetico netto, costituito dalla somma dei momenti magnetici individuali. Questo momento magnetico netto risulta essere molto maggiore rispetto a quello generato dalle sostanze paramagnetiche (da cui deriva il termine superparamagnetico). Quando il campo magnetico esterno viene rimosso i singoli momenti magnetici si orientano nuovamente in maniera casuale ed il momento magnetico netto ritorna al valore di zero. Questo fenomeno differenzia le sostanze superparamagnetiche dai composti ferromagnetici che invece esibiscono una rimanenza magnetica, definita come la presenza di un momento magnetico a campo magnetico esterno nullo [22]. Come descritto in precedenza il secondo componente principale delle nanoparticelle SPIO è rappresentato dal coating superficiale, che risulta essere indispensabile per utilizzare le particelle stesse in applicazioni biomediche e farmaceutiche. La modificazione della superficie risulta infatti necessaria per prevenire l'aggregazione (dovuta a forze di attrazione di Van der Waals e a forze di interazione dipolare), ridurre la tossicità e per modificare la farmacocinetica e la biodistribuzione. Allo stesso modo è importante selezionare dei coating che garantiscano la possibilità di inserire ulteriori gruppi funzionali, essenziali per il legame con specifici ligandi, proteine, farmaci o molecole di interesse. I gruppi funzionali fosfati, solfati e carbossilati sono i più conosciuti ed utilizzati per questo scopo [23]. In base alla loro natura i materiali utilizzati per rivestire le nanoparticelle di ossido di ferro possono essere classificati in organici (monomeri e polimeri) ed inorganici (metalli ed ossidi). L'acido citrico e l'acido gluconico sono esempi di monomeri organici, in grado di fornire un sottile shell utile per prevenire l'aggregazione attraverso forze di repulsione elettrostatica [24]. Particelle SPIO sono state stabilizzate anche con monomeri di acidi grassi a lunga catena come l'acido oleico [25]. I polimeri organici rappresentano la classe di coatings più utilizzata per aumentare la biocompatibilità e la stabilità delle SPIO. Tra

questi si possono citare il destrano, il carbossimetil destrano, l'alcol polivinilico (PVA), il chitosano, l'amido, il polietilenglicole (PEG) e l'acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA) [26]. La farmacocinetica e la biodistribuzione delle particelle è influenzata non solo dalla natura del polimero ma anche dalla sua densità e carica. In alternativa ai materiali organici diversi gruppi di ricerca hanno utilizzato come coating materiali inorganici come oro e silice [27].

Le nanoparticelle di ossido di ferro vengono generalmente classificate nelle seguenti categorie :

- Ultra Small particle of iron oxide USPIO, con un diametro compreso tra 10-40 nm
- Small particle of iron oxide SPIO, con un diametro compreso tra 50-150 nm
- Oral SPIO, con un diametro compreso tra 300 nm e 3,5  $\mu\text{m}$ .

Le particelle SPIO sono costituite da un core policristallino di ossido di ferro, mentre le USPIO possiedono un core di natura monocristallina (Figura 13).



**Figura 13. Nanoparticelle SPIO e USPIO**

Esistono due sottocategorie delle particelle USPIO chiamate rispettivamente monocristalline iron oxide nanoparticles (MION, con diametro inferiore ai 30 nm) e cross-linked iron oxide (CLIO), una forma di MION con un legame di cross-linking con destrano. La tabella 2 illustra alcune delle proprietà e delle applicazioni di diverse nanoparticelle SPIO già presenti in commercio ed utilizzate in clinica.

**Tabella 2. Caratteristiche di agenti SPIO e USPIO commerciali**

Nome	Compagnia	applicazioni	coating	Diametro idrodinamico (nm)
Ferumoxides	Guerbert	Imaging epatico labeling cellulare	destrano	120-180
Endorem	Guerbert	Imaging linfonodi	destrano	15-30
Ferumoxytol	Advanced Magnetics	Imaging magrofagi	carbossimetil destrano	30
Resovist	Schering	Labeling cellulare	carbossi destrano	21
Abdoscan	GE-Healthcare	Imaging orale	stirene solfonato	3500

### **Meccanismo di rilassamento generato dalle SPIO**

Le particelle SPIO, come descritto in precedenza, sono comunemente utilizzate per abbreviare il tempo di rilassamento  $T_2$ , fenomeno che causa una riduzione dell'intensità del segnale e come conseguenza porta ad un'incurimento dell'immagine. Per questo motivo le nanoparticelle di ossido di ferro sono spesso definite come agenti di contrasto negativi. Esistono diverse teorie che tentano di spiegare il complesso fenomeno dell'aumento di rilassività causato dalle particelle SPIO. Inizialmente sono state utilizzate le equazioni di Solomon – Bloembergen – Morgan (già impiegate per gli agenti  $T_1$ ), modificate e adattate per le particelle SPIO da Bulte e Brooks [28]. In seguito molte altre teorie più specifiche sono state sviluppate, in particolare per le particelle USPIO è stato ipotizzato un approccio teorico (che assume una distribuzione uniforme dei cristalli magnetici nel solvente) piuttosto realistico che permette il calcolo della velocità di rilassamento magnetico. Questo approccio però non è più valido per le SPIO, che contengono diversi cristalli di magnetite per particella. Infatti nel loro caso è importante tenere in considerazione il fenomeno dell'aggregazione e la forte dipendenza della velocità di rilassamento dal raggio delle particelle. In via teorica il cluster stesso (o aggregato) può essere considerato come un'unica grande sfera magnetizzata, il cui momento magnetico totale aumenta in accordo alla legge di Langevin. La magnetizzazione globale

dell'agglomerato è sempre allineata con il campo magnetico esterno. Il suo effetto sul rilassamento è caratterizzato da un lungo tempo di correlazione, dovuto alle grandi dimensioni, che influenza in particolar modo la velocità trasversale di rilassamento  $r_2$  ( $1/T_2$ ). Questo contributo è descritto dalla teoria della diffusione dell'outer sphere ed espresso dalla seguente equazione :

$$1/T_2 = 16 f_a \Delta\omega \tau_D / 45$$

dove  $f_a$  è la frazione di volume occupata dal cluster,  $\Delta\omega$  è la differenza in frequenza angolare fra il campo locale sperimentato da un protone localizzato sulla linea equatoriale della superficie del cluster e uno situato nell'acqua bulk, e  $\tau_D$  è il tempo di traslazione diffusionale intorno al cluster ( $\tau_D = R_a / D$ , dove  $R_a$  è il raggio del cluster e  $D$  il coefficiente di diffusione dell'acqua). Come sottolineato in precedenza questo fenomeno è molto complesso e vario, pertanto questa equazione principale va adattata alle particelle che differiscono per dimensione, aggregazione e concentrazione, e anche alle diverse condizioni in cui possono venire a trovarsi (differenti forze di campi applicati, differenti regimi di movimento molecolare) [29].

### **IMAGING MOLECOLARE E CELLULARE**

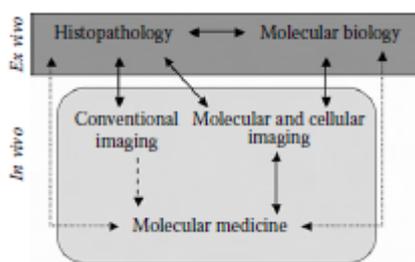
L'applicazione dell'istologia e della biologia molecolare negli uomini è molto ristretta, poiché nessuna delle due tecniche fornisce una visualizzazione delle molecole e delle cellule negli organismi viventi che sia soddisfacente e non invasiva per i tessuti. Lo sviluppo dell'imaging molecolare e cellulare si pone come obiettivo quello di colmare questo gap e fornire perciò delle metodiche adeguate per il rilevamento delle molecole e per la visualizzazione della loro interazione con gli organismi viventi nel tempo.

L'imaging molecolare e cellulare possono essere definiti, rispettivamente, come :

- la visualizzazione di molecole specifiche in un animale intatto
- la visualizzazione di cellule specifiche in un animale intatto

Tuttavia la definizione più generale ed universalmente accettata, descrive l'imaging molecolare come la caratterizzazione e la misurazione in vivo di processi biologici a

livello cellulare e molecolare [30]. La visualizzazione di cellule e molecole in animali intatti distingue pertanto queste due metodologie dall'istologia e dalla biologia molecolare che tipicamente richiedono la disintegrazione dei tessuti. Negli ultimi anni è stato evidenziato un pressante bisogno di tecniche di imaging sempre più specifiche per potenziare lo studio in vivo di molecole di fondamentale importanza per lo sviluppo della medicina molecolare [31, 32]. Dal momento che l'obiettivo principale della medicina molecolare è quello di trattare le aberrazioni molecolari il prima possibile, sarebbe importante utilizzare l'imaging molecolare come strumento diagnostico per permettere, in ambito clinico, la visualizzazione delle malattie nei soggetti viventi ad uno stato precoce (Figura 14) [33].



**Figura 14. Medicina molecolare.**

Ulteriori applicazioni dell'imaging molecolare si trovano nel processo di validazione e scoperta di nuovi farmaci, così come nel predire e monitorare le risposte a vari tipi di terapia. Il maggior numero di esperimenti di imaging molecolare viene effettuato introducendo probes molecolari negli organismi viventi. Dal momento che questi probes sono molto spesso simili a molecole farmaceutiche o interagiscono con gli stessi target, esistono molti aspetti in comune tra imaging molecolare e farmacologia. Le tecnologie di imaging permettono di monitorare un'animale nella sua interezza, rendendo così possibile la determinazione degli effetti in vivo dei farmaci sui diversi organi [34]. Grazie a questo aspetto in futuro potrebbe essere possibile, ad esempio, sviluppare farmaci specifici per determinate regioni cerebrali caratterizzate dalla presenza di squilibri neurochimici dovuti a malattie psichiatriche.

Come sottolineato in precedenza la tecnica MRI è una delle metodiche di imaging più avanzate ed utilizzate sia in campo clinico che sperimentale, e pertanto ricopre un ruolo importante nella sfida futura volta ad aumentare la sensibilità e la specificità

dell'imaging molecolare e cellulare. Il rilevamento di eventi cellulari o molecolari deve essere necessariamente specifico per particolari sistemi biologici. Questa specificità inevitabilmente si basa sulla capacità di discriminare tra una particolare cellula e il rumore di fondo strumentale, e tra la molecola di interesse e altre molecole. Per ottenere questo livello di specificità si può per esempio coniugare un agente di contrasto magnetico con un sistema specifico anticorpo-antigene in grado di legarsi con una cellula/molecola di interesse e visualizzare così, tramite MRI, il target di interesse stesso in maniera selettiva [35]. Le proprietà dell'agente di contrasto MRI determineranno le caratteristiche di legame con la molecola, la penetrazione nei tessuti e l'uptake cellulare [36]. La funzionalizzazione specifica per determinati target (selettività per le placche amiloidi, capacità di superare la barriera ematoencefalica, ecc.) degli agenti di contrasto MRI accresce notevolmente la loro utilità per l'imaging molecolare e cellulare. Grandi passi in avanti sono stati fatti in questa direzione per entrambe le metodologie di imaging. Agenti di contrasto possono infatti essere utilizzati per il labeling di diversi tipi di linee cellulari sia in vitro che in vivo, e possono essere impiegati per tracciare tramite MRI il percorso di queste linee cellulari all'interno dell'organismo [37].

### **APPLICAZIONI MRI IN CAMPO BIOMEDICO E FARMACEUTICO**

Le applicazioni della tecnica MRI ai sistemi farmaceutici sono limitate se paragonate ai sistemi clinici. Tuttavia la tecnologia MRI è stata utilizzata per studiare i meccanismi interni di rilascio del farmaco in vitro in varie forme di dosaggio, per monitorare eventi connessi con i processi farmaceutici e per studiare in vivo il comportamento dei sistemi di drug delivery nel corpo. Esistono diversi lavori basati sullo studio del rilascio modificato per via orale, in particolare per sistemi con una matrice idrofila [38]. La tecnica MRI è stata anche impiegata per chiarire la struttura interna e il comportamento di altre forme farmaceutiche di dosaggio, per esempio devices per il rilascio immediato, e per seguire il decorso temporale di processi farmaceutici come miscelazione ed estrusione. L'uso della metodica MRI nello studio del comportamento in vivo delle forme di dosaggio sta suscitando un crescente interesse, sebbene i lavori eseguiti siano pochi. Studi dei sistemi di drug delivery in animali e uomini hanno illustrato il grande potenziale di questa tecnica nel monitorare il trasporto, il comportamento e la risposta fisiologica ai sistemi di

rilascio, in un range che parte dai devices per la via orale e parenterale, fino ai carriers colloidali per il drug targeting [39].

I modelli animali sono coinvolti in diverse fasi del processo di sviluppo di un farmaco. Animali transgenici o Knock out sono spesso utilizzati per selezionare e validare potenziali target farmaceutici. Gli animali sono anche impiegati per valutare i meccanismi, gli aspetti farmacodinamici e farmacocinetici, ed il profilo di sicurezza di un potenziale candidato farmaco. La tecnica MRI possiede una grande risoluzione spaziale ( pixel delle dimensioni di 100  $\mu\text{m}$ ), che permette di ottenere dettagliate informazioni morfologiche dai modelli animali impiegati. L'uso dell'MRI per la caratterizzazione di questi modelli animali offre diversi vantaggi. Fra tutti uno dei principali sta nel fatto che, essendo una tecnica assolutamente non invasiva, permette misure ripetute sullo stesso animale. Ciò risulta essere molto rilevante negli studi longitudinali , poiché viene eliminata la variabilità inter- individuo, e di conseguenza il numero di animali richiesti per raggiungere un significato statistico è molto minore [40]. Ovviamente come tutte le tecniche analitiche, anche la Risonanza Magnetica per Immagini presenta degli svantaggi : l'intrinseca bassa sensibilità e la necessità di anestetizzare gli animali per evitare la presenza di artefatti di mobilità nelle immagini, dovuti al movimento dell'intero corpo o di singoli organi [39].

## SCOPO DEL LAVORO

Gli obiettivi di questo lavoro di ricerca erano : 1) sintetizzare e sviluppare nanoparticelle SPIO come agenti di contrasto MRI per applicazioni biomediche e farmaceutiche; e 2) modificare la superficie delle particelle con rivestimenti (coatings) biocompatibili e non citotossici per rendere possibili esperimenti di labeling cellulare e analisi in vivo. Inoltre un altro scopo prefissato di questo studio era quello di mettere a punto metodiche e sequenze MRI per l'ottimizzazione del contrasto (positivo e negativo). In alcuni casi, infatti, è preferibile ottenere un contrasto positivo che sia chiaro e visibile, generato ad esempio da complessi di Gadolinio. Tuttavia la bassa sensibilità di questi agenti di contrasto positivi comporta l'uso di dosi elevate che inevitabilmente porta ad un aumento del rischio nel causare effetti collaterali indesiderati. In altre situazioni invece, si rende necessario l'utilizzo di agenti negativi, come le particelle SPIO, per la loro grande sensibilità (possono essere somministrati nell'ordine delle  $\mu\text{moli}$ ) e per la specificità per alcuni organi e tessuti (fegato, milza e linfonodi). La localizzazione e l'accumulo delle SPIO possono essere però confusi con altre fonti di segnale negativo come l'interfaccia tra tessuti diversi o la presenza di artefatti dovuti al movimento. Sarebbe molto importante pertanto essere in grado di modulare il contrasto all'interno delle immagini a seconda delle esigenze e delle applicazioni. Per questo motivo l'ultima parte di questo progetto di ricerca è stata dedicata al raggiungimento di questo importante obiettivo.

## CAPITOLO I

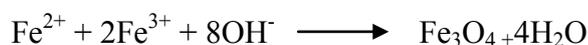
### SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI NANOPARTICELLE SPIO.

In questo capitolo sono illustrate la sintesi e le caratterizzazioni chimico-fisiche (XRD, FTIR, DLS, MRI, ecc.) di nanoparticelle SPIO. In particolare è descritta la sintesi di particelle con un core di magnetite e un coating organico di acido citrico, su cui sono state effettuate in seguito reazioni di funzionalizzazione per l'introduzione di gruppi funzionali e lo sviluppo di ulteriori tipi di coating superficiali [3-amminopropiltrirossisilano (APTES), dendrimeri (PAMAM)]. Tra i vari tipi di particelle sintetizzate sono state completamente caratterizzate soltanto quelle con coating di acido citrico (indicate nel testo come MC2, vedi sotto), essendo le uniche utilizzate in applicazioni biologiche (vedi capitolo II e capitolo III).

## INTRODUZIONE

### Sintesi di nanoparticelle di ossido di ferro

Esistono numerosi metodi chimici che possono essere utilizzati per sintetizzare nanoparticelle magnetiche (NP) per applicazioni MRI : microemulsioni, sol-gel sintesi, reazioni di idrolisi e termolisi di precursori [41,42,43]. Tuttavia il metodo chimico più comune ed efficiente per la produzione di nanoparticelle di magnetite è la tecnica della coprecitazione di sali di ferro [44]. Secondo questo metodo le particelle di ossido di ferro (sia magnetite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , che maghemite  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) vengono preparate facendo reagire in maniera stechiometrica, miscele di sali ferrici e ferrosi in ambiente acquoso secondo la seguente reazione chimica:



In accordo con la termodinamica di questa reazione, la completa precipitazione di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  avviene : in un range di pH compreso tra 8 e 14, in presenza di un rapporto stechiometrico 2:1 ( $\text{Fe}^{3+}$ :  $\text{Fe}^{2+}$ ) e in un ambiente di reazione privo di ossigeno [45]. Il principale vantaggio del processo di coprecipitazione è l'elevata resa della reazione. Tuttavia il controllo della distribuzione dimensionale delle particelle è limitato ed influenzato da vari parametri: pH, forza ionica, temperatura, natura dei sali (perclorati, cloruri, solfati e nitrati), concentrazione dello ione ferro [23]. Elevati valori di pH, aumento della temperatura di reazione e una concentrazione ottimale di ferro compresa tra 39 e 80 mM (alcuni autori consigliano l'utilizzo di concentrazioni più elevate [46]), garantiscono la formazione di particelle di dimensioni nell'ordine dei 4 – 20 nm [47]. Far gorgogliare azoto gassoso nella miscela di reazione non solo fornisce protezione contro l'ossidazione della magnetite, ma riduce anche il particle size delle particelle [48].

## MATERIALI E METODI

### Sintesi core magnetite

Due differenti metodiche sono state prese in considerazione per la sintesi del core di magnetite. Nella prima, cloruro ferroso ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) e cloruro ferrico ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich, Italia) sono stati miscelati in soluzione acquosa in rapporto molare 1:2. Nello specifico 0,86 g di  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (108 mM) e 2,35 g di  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (216 mM) sono stati sciolti in 40 ml di acqua e, sotto agitazione magnetica, la miscela è

stata scaldata a 80°C per 1 h sotto flusso di azoto gassoso [46]. In seguito sono stati aggiunti circa 5 ml di idrossido d'ammonio NH<sub>4</sub>OH (30 %) (Sigma-Aldrich, Italia) fino ad ottenere un pH uguale a 11. La miscela di reazione è stata scaldata per altri 30 minuti, con formazione di una dispersione colloidale di magnetite dal caratteristico colore nero. Le nanoparticelle formatesi (M1) sono state separate magneticamente dalla miscela di reazione e lavate prima con H<sub>2</sub>O (4 lavaggi), successivamente con etanolo ( 2 lavaggi) ed infine essiccate in stufa a 70°C per 1h. Seguendo una seconda metodica 0,318 g di FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (40 mM) sono stati fatti reagire con 0,865 g di FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (80 mM), sempre in 40 ml di H<sub>2</sub>O e con rapporto molare 1:2 [49]. Anche in questo caso la miscela è stata scaldata ad 80°C per 1h e sono stati aggiunti alcuni ml di NH<sub>4</sub>OH (30 %, pH= 11). La reazione è proseguita per ulteriori 30 minuti, ed infine le nanoparticelle formatesi (M2) sono state separate, lavate ed essiccate.

### **Coating con acido citrico**

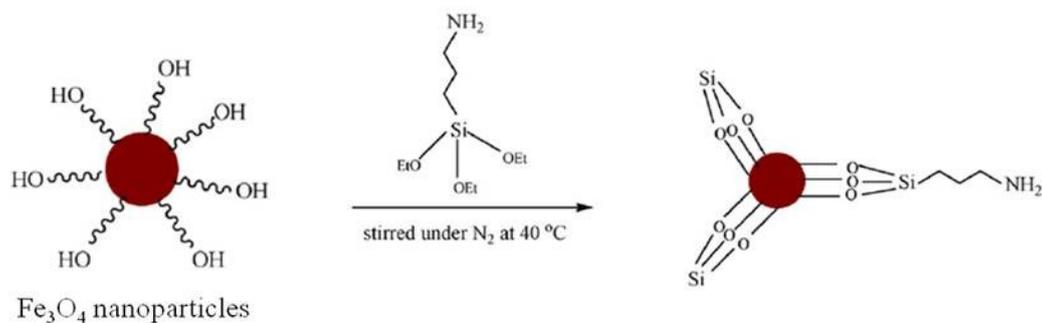
Le nanoparticelle di magnetite possiedono un grande valore di rapporto superficie su volume e di conseguenza grandi energie superficiali, pertanto mostrano la tendenza ad aggregarsi in maniera tale da minimizzare questa energia superficiale. In più le particelle sperimentano anche forze di attrazione dovute ad interazioni dipolari interparticellari e a forze di Van der Waals che accentuano il fenomeno di aggregazione [50]. Risulta pertanto necessario, per prevenire questo fenomeno, stabilizzare le nanoparticelle con coating polimerici o con tensioattivi. La modificazione superficiale delle particelle deve garantire contemporaneamente la loro stabilità e la biocompatibilità con i fluidi biologici [51]. In questo lavoro l'acido citrico è stato scelto ed utilizzato come coating organico per la sua capacità di prevenire l'aggregazione delle particelle per mezzo di forze di repulsione elettrostatiche; mentre come approccio di sintesi è stato impiegato un metodo one – pot. Dopo la formazione delle particelle di magnetite, ottenute mediante l'impiego di entrambe le metodiche descritte precedentemente, alla miscela di reazione sono stati aggiunti 2 ml (metodica 1) o 0,74 ml (metodica 2) di una soluzione acquosa di acido citrico (2,379 M) (Sigma-Aldrich, Italia). A questo punto la miscela di reazione è stata portata alla temperatura di 90°C, e mantenuta sotto agitazione magnetica e flusso di azoto per 1h. Al termine le nanoparticelle di magnetite con coating di acido

citrico sono state separate magneticamente, lavate con etanolo per eliminare l'acido citrico in eccesso ed essiccate in stufa a 70°C. Le NP sintetizzate con la metodica 1 vengono identificate come MC1, mentre quelle preparate con la seconda metodica sono nominate MC2.

### **Coating con 3-amminopropiltrirossisilano (APTES).**

Una delle principali applicazioni delle nanoparticelle magnetiche in campo biomedico è quella di fungere da supporti per l'immobilizzazione di molecole biologiche come proteine ed enzimi o per la purificazione di DNA o RNA [52]. In particolare la funzionalizzazione con anticorpi e proteine può rendere le nanoparticelle sito e target specifiche. Esistono due metodi differenti per l'immobilizzazione delle proteine su supporti: adsorbimento fisico e formazione di legami covalenti. Senza dubbio l'immobilizzazione covalente riduce significativamente il danneggiamento delle proteine grazie ad una maggiore forza di legame, e contemporaneamente aumenta la stabilità ed il controllo della disponibilità della proteina stessa nel sito di binding [53]. Per rendere le particelle magnetiche degli ottimi supporti risulta necessario modificare la loro superficie con coating organici. Tra questi il 3-amminopropiltrirossisilano, APTES, è considerato uno dei migliori candidati per la sua biocompatibilità, così come per la grande densità di gruppi funzionali amminici. In questo studio le particelle con coating di acido citrico (MC1, MC2) precedentemente sintetizzate, sono state ulteriormente rivestite con uno shell di APTES attraverso due differenti metodiche (al fine di verificare quale fosse la più efficiente). La prima è basata sul metodo Stöber con alcune modifiche [54]: 10 mg di MC1 sono stati dispersi in una miscela etanolo - acqua (4:1) in un bagno ad ultrasuoni per 30 minuti. In seguito sono stati aggiunti 1 ml di NH<sub>4</sub>OH (30%), e 0,2 ml di APTES (Sigma-Aldrich, Italia) (rapporto APTES : MC1 10:1) sotto agitazione magnetica e flusso di azoto in un bagno riscaldante alla temperatura di 40°C. Dopo 12 h le NP ottenute (MAPTES1) sono state lavate diverse volte con acqua ed etanolo, separate magneticamente ed essiccate in stufa a 70°C per 1h. Seguendo una seconda metodica [54,55], 219 mg di MC2 sono stati dispersi (vedi sopra) in una miscela etanolo – acqua (1:1) per 30 minuti. Successivamente, sotto agitazione magnetica e flusso di N<sub>2</sub>, sono stati aggiunti 0,9 ml di APTES (rapporto APTES : MC2 4:1) e fatti

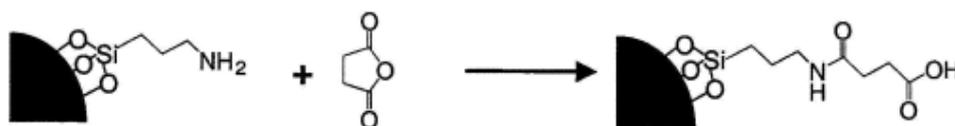
reagire per 3 h a 40°C (Figura 1). Al termine le particelle MAPTES2 sono state separate magneticamente, lavate con acqua ed etanolo ed essiccate in stufa a 70°C.



**Figura 1. Schema generale per la reazione di funzionalizzazione delle NP magnetiche con APTES [55].**

### **Funzionalizzazione con Anidride Succinica**

Le nanoparticelle con una superficie di silice chimicamente modificata hanno recentemente ricevuto notevoli attenzioni per applicazioni biotecnologiche e biomediche [56]. Per facilitare l'immobilizzazione di molecole organiche come proteine, anticorpi, enzimi, è necessario funzionalizzare le particelle con dei linker chimici che favoriscano la formazione di legami covalenti. Per questo motivo la superficie delle nanoparticelle MAPTES2 (ottenute con tempi di reazione più brevi rispetto alle MAPTES1) è stata modificata per mezzo di una reazione con anidride succinica (SA) (Sigma-Aldrich, Italia) [57]. Quantità esattamente pesate di MAPTES2 sono state disperse in tetraidrofurano (THF) in un bagno ad ultrasuoni (Sigma-Aldrich, Italia), e miscelate con differenti volumi di una soluzione di anidride succinica in THF (10 mg/ml) in maniera da avere tre diversi rapporti NP : SA (5:1; 3:1; 1:1). La reazione è proseguita a temperatura ambiente per 16 h sotto agitazione magnetica. Al termine le SA1, SA3, SA5 (così denominate in base al rapporto NP : SA) sono state separate magneticamente, lavate con THF e acqua ed essiccate in stufa a 70°C per 1h.



**Figura 2. Schema della reazione di funzionalizzazione organica chimica della superficie delle particelle. Reazione tra il gruppo funzionale amminico con l'anidride succinica, e successiva apertura dell'anello con elongazione del linker [57].**

### **Coupling con Bovine Serum Albumin (BSA)**

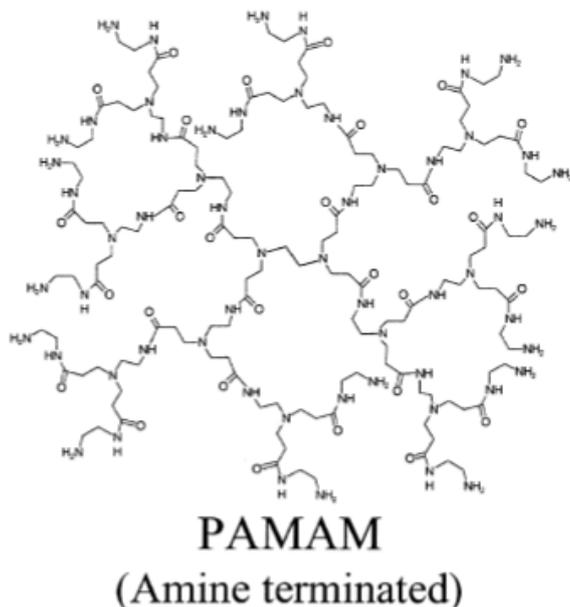
Le nanoparticelle funzionalizzate con anidride succinica sono state utilizzate per l'immobilizzazione della BSA, una delle più abbondanti proteine presenti nel plasma dove ricopre un ruolo fondamentale nel trasporto di ligandi esogeni ed endogeni [58]. La BSA viene spesso impiegata come proteina modello per valutare le capacità di loading di particelle.

La reazione di immobilizzazione covalente è stata eseguita disperdendo 50 mg di SA1, SA2 o SA3 in 5 ml di tampone acido 2-[N-morfolin]-etansolfonico (MES) 0,1 M (pH = 5) (Sigma-Aldrich, Italia) e facendoli reagire con 20  $\mu$ l di una soluzione 1 M di N-etil-N-(3-dimetilamminopropil)-carbodiimide (EDC) (Sigma-Aldrich, Italia) per venti minuti. In seguito sono stati aggiunti a ciascuna dispersione 5 ml di una soluzione di BSA (Sigma-Aldrich, Italia) in tampone MES, in maniera da avere una concentrazione finale di particelle e proteina pari a 5 mg/ml e 150  $\mu$ g/ml rispettivamente. Dopo 3h di agitazione meccanica a temperatura ambiente, le nanoparticelle sono state separate magneticamente, e il surnatante è stato conservato per l'elettroforesi SDS – PAGE.

### **Modificazione della superficie con dendrimeri PAMAM.**

Come sottolineato in precedenza le particelle di ossido di ferro richiedono l'impiego di coating (polimerici, polisaccaridici, silice, ecc.) che le rendano biocompatibili e ulteriormente funzionalizzabili in maniera tale da poter raggiungere determinati target specifici. Per questa finalità grande interesse stanno suscitando i dendrimeri, una classe di polimeri monodispersi e ramificati in maniera altamente ordinata. Grazie alla molteplicità di gruppi funzionali (amminici o carbossilici) presenti sulla loro superficie molecolare questi polimeri possono essere efficientemente coniugati con peptidi, anticorpi e chemical spacers [59]. I dendrimeri sembrano essere dei buoni candidati per il coating di nuovi probes MRI grazie alla loro biocompatibilità e bassa citotossicità [60, 61]. La loro struttura chimica a base poliamminoamidica PAMAM (Figura 3) è costituita da un core di etilendiammina su cui si fanno crescere, attraverso una serie di reazioni chimiche ripetute, le ramificazioni che determinano le cosiddette generazioni. In questo studio le generazioni sono state sintetizzate a partire dal core magnetico di ossido di ferro delle NP stabilizzate con acido citrico, passando per la generazione G0 ottenuta per reazione con

aminopropiltriectossisilano (APTES), fino ad arrivare alla generazione G4. Nello specifico le NP MAPTES, costituenti la generazione G0, sono state disperse in una soluzione metanolica con un eccesso di metilacrilato di metile (Sigma-Aldrich, Italia). La sospensione è stata mantenuta in un bagno ad ultrasuoni a temperatura ambiente per 7 h. Le particelle ottenute, definite generazione G0,5 per l'introduzione di un gruppo estereo terminale, sono state separate magneticamente e lavate con metanolo. Dopo trattamento termico per 1 h a 100°C, le NP sono state disperse nuovamente in metanolo e fatte reagire con un eccesso di etilendiammina (EDA) (Sigma-Aldrich, Italia) in un bagno ad ultrasuoni a temperatura ambiente per 3 h. E' stata così ottenuta (dopo lavaggio in metanolo ed essiccazione) la generazione G1 con gruppi funzionali amminici terminali (Figura 4). I dendrimeri sono stati poi fatti crescere attraverso la ripetizione di reazioni stepwise con metilacrilato di metile ed etilendiammina fino al raggiungimento della generazione G4 (sintesi divergente). Le nanoparticelle sintetizzate vengono indicate come Gn MNP PAMAM x, dove n rappresenta la generazione ed x il lotto.



**Figura 3. Struttura dendritica del PAMAM**

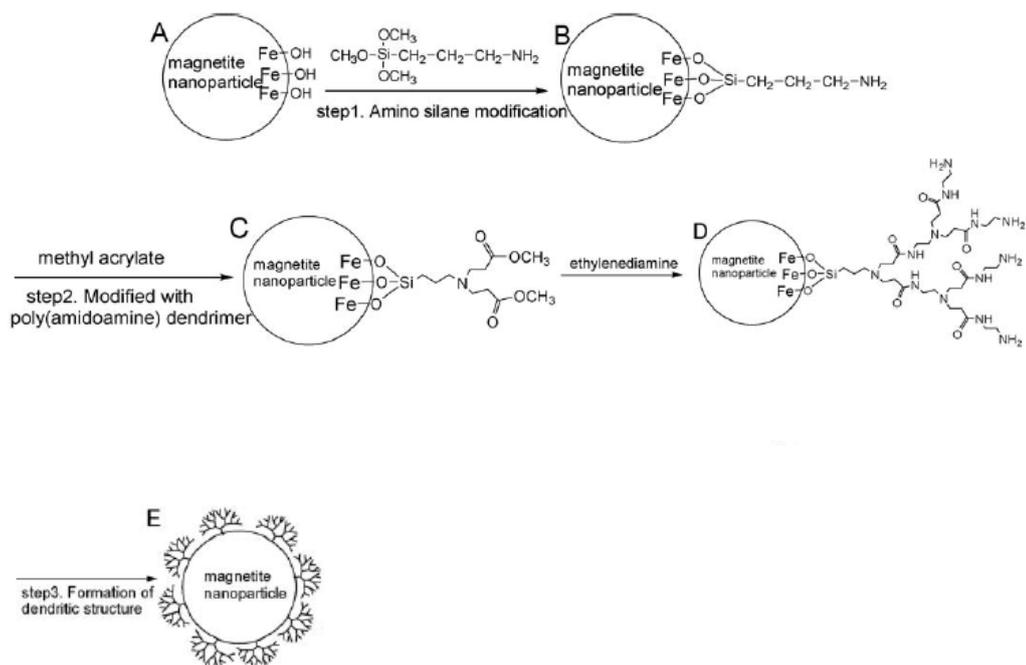


Figura 4. Nanoparticelle di magnetite modificate con dendrimeri PAMAM [52].

## **Caratterizzazioni**

Le proprietà magnetiche delle nanoparticelle dipendono dalla loro struttura fisica, dalle dimensioni, dalla forma e dalla fase chimica nella quale sono presenti. Il comportamento biologico delle particelle magnetiche dipende fortemente dal livello di polidispersione e dalla natura del coating. Un discorso particolare merita il concetto di dimensioni, esso infatti può essere riferito a differenti parti delle nanoparticelle: la parte cristallina del core, il coating e lo strato di idratazione. In molti casi inoltre le nanoparticelle sono polidisperse, pertanto questa eterogeneità può dare origine a valori differenti di dimensioni a seconda del fatto che la tecnica utilizzata per la caratterizzazione dia informazioni sul numero, volume o intensità delle dimensioni medie [49]. Le particelle sintetizzate sono state caratterizzate attraverso l'impiego di diverse tecniche chimico – fisiche : Analisi ai raggi X (XRD), Spettroscopia infrarossa in Trasformata di Fourier (FTIR), analisi al microscopio elettronico a trasmissione (TEM), analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM), Dynamic Light Scattering (DLS), calcolo della rilassività, profili NMRD, quantificazione del ferro.

### **Analisi ai raggi X (XRD)**

L'analisi XRD può essere utilizzata per ottenere la struttura cristallina delle particelle. Quest'ultima è definita come la distribuzione tridimensionale regolare (cubica, romboedrica, ecc.) di atomi nello spazio. Questi si dispongono in maniera da formare una serie di piani paralleli separati uno dall'altro da una distanza  $d$ , che varia in base alla natura del materiale. Per ogni cristallo i piani esistono in un numero di differenti orientazioni, ciascuno con il suo specifico  $d$ -spacing. Se una corrente monocromatica di raggi X con lunghezza d'onda  $\lambda$  è proiettata in un materiale cristallino ad un angolo  $\varphi$ , la diffrazione avviene solo quando la distanza percorsa dai raggi riflessi da piani successivi differisce di un numero completo  $n$  di lunghezze d'onda. Variando l'angolo  $\varphi$  le condizioni della legge di Bragg sono soddisfatte da differenti  $d$ -spacing nei materiali policristallini. Mettendo in relazione le posizioni angolari e le intensità dei risultanti picchi di diffrazione della radiazione si produce un pattern caratteristico di ciascun campione. In presenza di una miscela di fasi

differenti, il risultante diffrattogramma viene formato dalla somma dei pattern individuali [62].

In un pattern di diffrazione, l'intensità dei picchi sperimentali può essere impiegata per identificare in maniera qualitativa e quantitativa la proporzione di ossidi di ferro formatasi in una miscela attraverso il confronto con i picchi di riferimento presenti in letteratura. Le analisi XRD sono state effettuate utilizzando un diffrattometro Bruker D8 Discovery con un generatore di raggi X alla potenza di 40 kV e 40 mA. La radiazione  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1.5418 \text{ \AA}$ ) è stata utilizzata per eseguire  $2\theta/\omega$  scans in un range angolare da 20 a 100° con uno step size di 0.02° e 15 secondi di esposizione per step.

### **Spettroscopia infrarossa in Trasformata di Fourier (FTIR)**

La spettroscopia infrarossa in Trasformata di Fourier (FTIR) è una tecnica di spettroscopia di assorbimento adatta alla determinazione qualitativa e semiquantitativa di composti organici e inorganici in campioni liquidi o solidi. La tecnica FTIR si basa sull'interazione tra la radiazione elettromagnetica (alla lunghezza d'onda dell'infrarosso) e la materia. Questa interazione provoca un assorbimento di energia da parte delle molecole presenti nella materia e quindi un passaggio dai livelli energetici vibrazionali fondamentali a quelli eccitati.

Le analisi sono state effettuate su pastiglie di KBR preparate con l'1% di campione, utilizzando un interferometro a Trasformata di Fourier (FTIR) Bruker Vertex 70v (Bruker Optik, Ettlingen, Germania). Ogni spettro è stato ottenuto mediando 256 interferogrammi con una risoluzione di  $4 \text{ cm}^{-1}$ , nel range  $400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$ , adoperando una sorgente infrarossa global e beam splitter di KBr. Sono state sottoposte ad analisi le nanoparticelle MC1, MC2, MAPTES1,MAPTES2 e MNP PAMAM.

### **Analisi al Microscopio elettronico a trasmissione (TEM)**

Le dimensioni del core di magnetite delle particelle possono essere determinate per mezzo del microscopio elettronico a trasmissione TEM. Questa tecnica oltre a dare informazioni sulla struttura del core (cristallina o amorfa) fornisce indicazioni sulla distribuzione dimensionale e sulla forma delle particelle. Le immagini TEM sono state acquisite utilizzando uno strumento HRTEM (Jeol) con un voltaggio di accelerazione di 300 Kvolt, facendo essiccare una goccia di campione (particelle MC2) disperso in acqua su una sottile griglia di carbonio.

### **Analisi al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM)**

Il microscopio elettronico a scansione SEM è un microscopio che non sfrutta la luce come sorgente di radiazioni, ma un fascio di elettroni che colpisce il campione sottoposto ad analisi. Dal campione vengono emessi degli elettroni secondari, rilevati in seguito da un rivelatore e convertiti in impulsi elettrici. L'analisi SEM fornisce informazioni utili per valutare le dimensioni totali (comprendenti il coating) delle particelle. Gli esperimenti sono stati condotti impiegando un microscopio Dual Beam Nova NanoLab 600 (FEI), con potenziale di accelerazione pari a 11.5 kV. I campioni (particelle MC2) sono stati dispersi in acqua e depositati su TEM grids (griglie di carbonio). Dopo completa evaporazione della fase liquida, i campioni sono stati ricoperti da sottile strato d'oro.

### **Dynamic Light Scattering (DLS)**

Il Dynamic Light Scattering DLS è una tecnica non invasiva utilizzata per misurare le dimensioni di molecole e particelle nella regione sub micron. Particelle, emulsioni e molecole in sospensione vanno incontro a moti browniani. Se illuminate con un laser, l'intensità della luce dispersa (scattering) fluttua ad una velocità dipendente dalle dimensioni delle particelle. L'analisi di queste fluttuazioni delle intensità fornisce la velocità dei moti browniani e di conseguenza le dimensioni particellari attraverso la relazione di Stokes-Einstein. Il diametro misurato al DLS, definito idrodinamico, fornisce indicazioni su come le particelle diffondono in un fluido. Il diametro così ottenuto rappresenta quello di una sfera con lo stesso coefficiente di diffusione traslazionale delle particelle. Questo coefficiente dipende non solo dalle dimensioni del core ma da qualsiasi struttura presente sulla superficie particellare. Le analisi DLS sono state effettuate utilizzando un strumento Zetasizer nano series (Malvern instruments, UK). I campioni per l'analisi sono stati preparati aggiungendo 10 µl di una dispersione di nanoparticelle MC2 ad 1 ml di tampone acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico (HEPES, pH =7,4), filtrato con un filtro da 0,2 µm. Le misure sono state eseguite alla temperatura di 25°C e i risultati riportati come media di tre ripetizioni.

### **Elettroforesi SDS – PAGE**

L'elettroforesi è una tecnica che permette di separare, mediante l'applicazione di un opportuno campo elettrico, molecole (amminoacidi, peptidi, proteine, nucleotidi e acidi nucleici) presenti in soluzione sotto forma di specie elettricamente cariche. La separazione si basa sulla differente velocità di migrazione di queste specie cariche. L'elettroforesi SDS – PAGE viene eseguita su gel di poliacrilammide (PAGE), che funge da setaccio molecolare, ed utilizzando il sodio dodecil solfato (SDS), un detergente fortemente ionico, per conferire una carica elettrica negativa in media ogni 2 residui di amminoacido. L'SDS permette di eliminare l'effetto dovuto alle differenze di carica e alla diversa forma delle proteine, separando queste ultime solamente in base al loro differente peso molecolare. Nell'SDS-PAGE si utilizza un gel discontinuo composto da:

- Stacking gel o gel di impaccamento, il cui scopo è quello di concentrare i campioni e uniformarne la partenza all'inizio della corsa.
- Running gel o gel di separazione, che è la matrice in grado di separare le singole proteine.

La tecnica SDS – PAGE è stata utilizzata per valutare in maniera qualitativa e semiquantitativa la percentuale di proteina BSA legata alle nanoparticelle.

Prima di effettuare la corsa elettroforetica gli standard di BSA e i surnatanti residui dalla reazione di coupling tra le SA1, SA2, SA3 (definiti unbound) e la proteina sono stati miscelati con il tampone di caricamento Laemmli (Sigma-Aldrich, Italia) e riscaldati a 95°C per 5 minuti. In seguito i pozzetti presenti sullo stacking gel sono stati caricati con uguali volumi di campione (25 µl, tabella 1), fatti correre inizialmente per 20 minuti a 50V e successivamente per 1 h a 150V. Al termine della corsa il gel è stato ripetutamente lavato e colorato con il blu di comassie (Sigma-Aldrich, Italia) per mettere in evidenza le bande relative alla proteina. Dopo incubazione e lavaggi finali il gel è stato analizzato al computer tramite scanner.

**Tabella 1. Caricamento dei pozzetti dello stacking gel con gli standard di BSA e gli unbound**

<b>Pozzetto</b>	<b>Campione</b>	<b>Quantità caricata µg</b>	<b>Volume caricato µl</b>
1	BSA	1.5	25
2	BSA	0.75	25
3	BSA	0.375	25
4	Unbound SA1	-	25
5	Unbound SA3	-	25
6	Unbound SA5	-	25
7	BSA	2.25	25
8	Unbound SA1	-	25
9	Unbound SA3	-	25
10	Unbound SA5	-	25

## **ANALISI MRI**

### **Analisi di Phantoms MRI**

I phantoms MRI sono dei dispositivi impiegati allo scopo di testare sia le performance dello strumento che l'efficienza di nuovi agenti di contrasto nell'aumentare la rilassività. Nel secondo caso essi devono simulare nel miglior modo possibile le condizioni in cui il nuovo agente di contrasto troverà applicazione (cellule, vasi sanguigni, tessuti vari, ecc.). Per questo scopo sono spesso utilizzati gel puri di gelatina, soluzioni gelificate a differenti concentrazioni di agar o di agarosio, alcool polivinilico, silicone, poliacrilamide, gelatina organica simulata, gel paramagnetici simulati e soluzioni di micelle invertite [9]. Ovviamente nessun phantom è in grado di riprodurre alla perfezione le condizioni richieste, tuttavia le indicazioni sui tempi di rilassamento e sulla rilassività ottenute da questi esperimenti sono molto utili ed informative. In letteratura in qualsiasi lavoro riguardante lo sviluppo di nuovi probes per MRI sono spesso riportati i risultati ottenuti mediante prove su phantoms.

Dal momento che uno dei target di applicazione delle nanoparticelle SPIO sintetizzate in questo progetto è rappresentato dalla valutazione del labeling e dell'uptake cellulare, si sono scelte soluzioni di gel di agarosio (Sigma-Aldrich, Italia) per la preparazione di phantoms adeguati allo scopo. Le analisi sono state effettuate utilizzando uno strumento MRI wide bore 300 MHz Bruker Avance, equipaggiato con un probe provvisto di una birdcage di 30 mm di diametro. Le dimensioni del probe (il dispositivo dove viene posizionato il campione durante l'analisi) permettono di ospitare i campioni posti all'interno di Falcon da 50 ml. Due diverse metodiche di preparazione dei phantoms sono state impiegate: nella prima sono state preparate a caldo soluzioni di agarosio (Sigma-Aldrich, Italia) a differenti concentrazioni (8%, 6%, 4%, 3%) e sono state versate all'interno delle Falcon. In seguito, a gelificazione terminata, sono stati inseriti capillari di vetro contenenti soluzioni acquose di agarosio (4%) con differenti concentrazioni di nanoparticelle SPIO (MC2) da testare. Nella seconda metodica invece, 5 tubi NMR da 5 mm di diametro sono stati introdotti in ciascuna Falcon immediatamente dopo aver versato le soluzioni di agarosio ancora calde (8%, 6%, 4%, 3%, 2%). Dopo il raffreddamento e la conseguente gelificazione delle soluzioni (circa 4 h) i tubi NMR sono stati rimossi con cura, in maniera da ottenere dei supporti di gel di agarosio con 5 pozzetti per Falcon. Questi ultimi sono stati poi utilizzati per accogliere le soluzioni di nanoparticelle in gel di agarosio (4%, 1%).

Un aspetto importante da sottolineare è il fatto che entrambe le soluzioni di agarosio devono essere perfettamente gelificate prima di eseguire l'analisi MRI, onde evitare artefatti nell'immagine dovuti al movimento.

### **Analisi MRI MC2**

Le NP con coating di acido citrico denominate MC2 sono state caratterizzate mediante l'impiego di una sequenza Multi Slice Multi Echo (MSME). Questa sequenza permette sia di effettuare diverse slices (sezioni) sul campione, che di acquisire il segnale dopo numerosi "treni" di echo (ripetizioni ad intervalli definiti dell'intensità massima di segnale o echo). In questo modo si possono ottenere una serie di immagini definite  $T_2$  weighted (pesate in  $T_2$ ), dalle quali è possibile

discriminare i campioni in base al loro  $T_2$ . Le immagini MSME sono state acquisite con i seguenti parametri:

- FOV = 4 x 4 cm
- Matrix = 256 x 256 pixels
- TR = 10 s
- TE = 9.554 ms
- Echoes = 32
- Slice thickness = 3mm

### **Analisi MRI MNP PAMAM**

Dei diversi lotti completi di NP con coating dendrimerico sintetizzati, come campione rappresentativo viene qui descritta la caratterizzazione effettuata mediante analisi MRI per il lotto definito MNP PAMAM – 2. Le misure sono state eseguite sia sulle NP non funzionalizzate (particelle con core di magnetite e coating di acido citrico) che su tutte le generazioni (G0 – G4) in modo tale da stimare quanto e come la funzionalizzazione con dendrimeri influenzi la rilassività delle particelle stesse. In questo senso era necessario che tutti i campioni venissero analizzati nelle medesime condizioni (sequenza, TR, TE, numero di echo ecc.). Le misure sono state effettuate utilizzando la sequenza MRI MSME\_8e\_bas modificata con il seguente protocollo di analisi:

<b>Parametri sequenza MRI</b>	<b>Conc. Sol. MNP – PAMAM (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
FOV = 4 x 4 cm	A = 40
Matrix = 128 x 128 pixels	B = 20
TR = 3 s	C = 10
TE = 7.907 ms	D = 2.5
Echoes = 32	E = H <sub>2</sub> O
Slice thickness = 2 mm	

### Calcolo della relassività

Come descritto in precedenza la relassività viene espressa come la capacità di un agente di contrasto nel cambiare la velocità di rilassamento  $R_1$  ( $1/T_1$ ) e  $R_2$  ( $1/T_2$ ) dei nuclei protonici. In termini più specifici la relassività  $r_i$  ( $i = 1$  o  $2$ , a seconda che ci si riferisca ad  $R_1$  o  $R_2$ ) è definita come la variazione della velocità di rilassamento dei protoni di un campione/tessuto dopo l'introduzione dell'agente di contrasto, normalizzata per la concentrazione dello ione metallico o dell'agente stesso. La relassività  $r_2$  può essere espressa e calcolata a partire dalla seguente equazione:

$$R_{2f} = R_2 + r_2[CA]$$

Dove:

$R_2$  = velocità di rilassamento del campione senza agente di contrasto

$R_{2f}$  = velocità di rilassamento del campione in presenza di agente di contrasto

$r_2$  = relassività espressa in  $ml\ s^{-1}\ \mu g^{-1}$  o  $mM^{-1}\ s^{-1}$

[CA] = concentrazione agente di contrasto o ione metallico

Conoscendo  $R_{2f}$ ,  $R_2$  e [CA] è possibile determinare la relassività  $r_2$  di un determinato agente di contrasto.

### Relassività e profili NMRD

E' possibile misurare la velocità di rilassamento ( e di conseguenza la relassività) di un agente di contrasto in funzione del campo magnetico grazie ad una tecnica definita rilassometria. Un profilo rilassometrico è un grafico dove la velocità di rilassamento magnetico nucleare, usualmente  $R_1$ , è riportata in funzione della frequenza di Larmor (proporzionale al campo magnetico applicato) su scala logaritmica. Questo profilo è anche chiamato Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion NMRD profile [63]. Il tempo di rilassamento longitudinale  $T_1$  e i profili NMRD  $R_1$  delle particelle MC2 sono stati eseguiti utilizzando un rilassometro fast field cycling FFC 2000 STELAR (Meda, Italia) operante a frequenze di Larmor comprese tra 0.01 e 20 MHz alla temperatura di 37°C. Il tempo di rilassamento trasversale  $T_2$  e i valori di  $T_1$  oltre i 20 MHz sono stati misurati attraverso l'impiego di uno spettrometro Spinmaster STELAR (Meda, Italia) operante a campo variabile (30, 40, 50, 60, 70 MHz). Il tempo di rilassamento  $T_1$  è stato determinato con una sequenza inversion recovery. Le misure  $T_2$ , invece, sono state eseguite utilizzando la

sequenza Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), inserendo un valore di tempo di ripetizione TR cinque volte maggiore del  $T_1$  del campione. Per l'analisi NMRD le particelle MC2 sono state disperse in acqua ad una concentrazione di 100  $\mu\text{g/ml}$ .

### Quantificazione del Ferro

L'esatta concentrazione del ferro presente nelle particelle MC2 è stata determinata per via rilassometrica (SPINMASTER FFC2000 1T C/DC, Stelar, Italia) dopo mineralizzazione del campione. 100  $\mu\text{l}$  di una soluzione 100  $\mu\text{g/ml}$  di particelle MC2 sono stati miscelati con 100  $\mu\text{l}$  di  $\text{HNO}_3$  concentrato (Sigma-Aldrich, Italia). La miscela è stata agitata (vortex), centrifugata (1 minuto 2000 rpm) e lasciata per 18 h a  $120^\circ\text{C}$  in stufa all'interno di una vial sigillata. In seguito è stata misurata la velocità di rilassamento  $R_1$  della miscela e la concentrazione di ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) presente è stata calcolata in base a questa equazione ( $R^2=0,999$ ):

$$R_{1 \text{ Obs}} = 0.55 + 13,49 [\text{Fe}]_{\text{tot}}$$

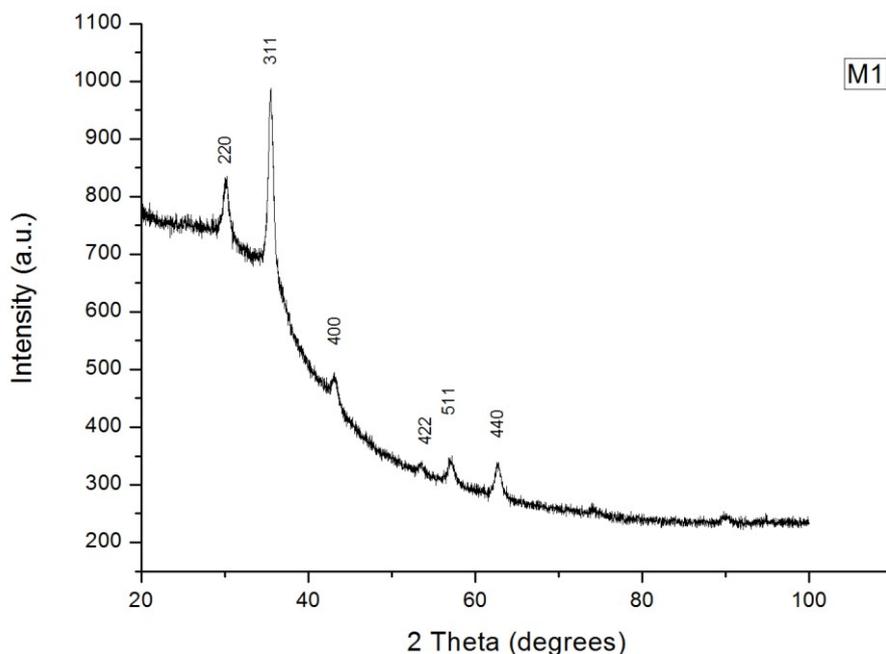
Dove  $R_{1 \text{ Obs}}$  rappresenta la velocità di rilassamento longitudinale osservata per la miscela. Questa equazione è stata creata grazie ad una curva di calibrazione costruita a partire dall'analisi di soluzioni standard di ferro (0-1,2 mM) (Sigma-Aldrich).

Per quanto riguarda le particelle con coating dendrimerico PAMAM invece, la concentrazione di ferro ( $\text{Fe}^{++}$ ) è stata calcolata mediante il saggio U.V. della o-fenantrolina (Sigma-Aldrich, Italia). La procedura generale di questa metodica classica per la determinazione del ferro è stata adattata per le misure sulle particelle. In breve, le soluzioni di MNP PAMAM 2 sono state trattate con HCl (37%) per portare in soluzione tutto il ferro presente nelle particelle. In seguito è stata aggiunta una soluzione al 10% di idrossilammina ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) (Sigma-Aldrich, Italia) per ottenere la riduzione completa a  $\text{Fe}^{++}$ . Una volta terminata la reazione di riduzione (90 minuti), è stata addizionata una soluzione di o-fenantrolina. Il  $\text{Fe}^{++}$  forma un complesso con la o-fenantrolina che assorbe a circa 510 nm in ambiente tamponato a  $\text{pH} = 3,5$  con tampone acetato preparato di fresco (Sigma-Aldrich, Italia). La concentrazione di ferro è stata poi calcolata basandosi su una retta di calibrazione ( $y=25.515 x - 0.00242$  con un  $R^2=0,9995$ ) ottenuta con soluzioni standard di ferro precedentemente preparate.

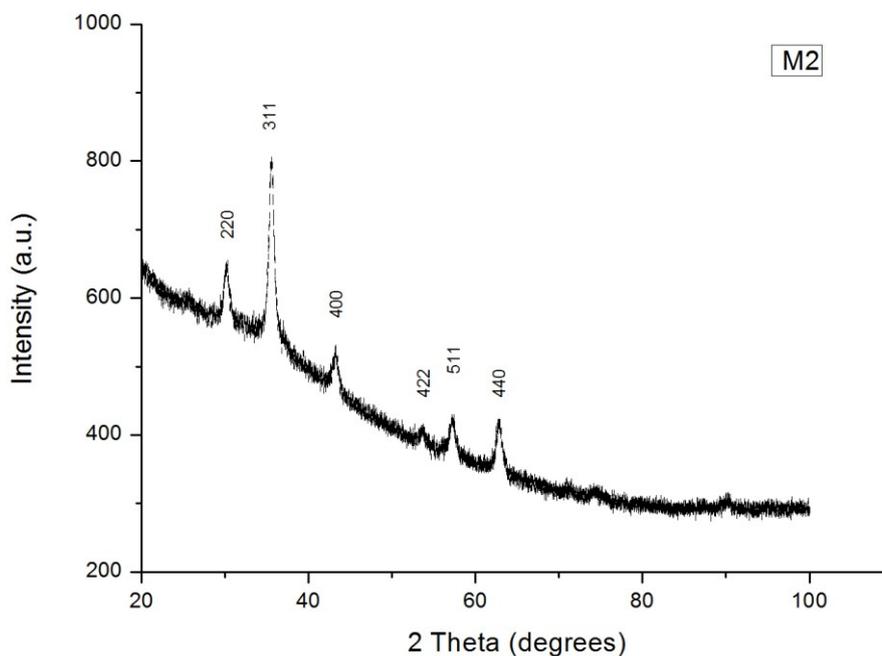
## RISULTATI E DISCUSSIONE

### Analisi ai raggi X (XRD)

Le analisi XRD sono state effettuate sia sulle nanoparticelle di magnetite M1 (sintetizzate con la metodica 1) che su quelle M2 (sintetizzate con la metodica 2), per valutare quale protocollo di sintesi portasse a risultati migliori. In Figura 5 e 6 sono riportati i diffrattogrammi XRD risultanti relativi rispettivamente alle particelle M1 ed M2. I pattern XRD di entrambi mostrano la presenza dei picchi di diffrazione (220), (311), (400), (422), (511), (440), caratteristici del cristallo di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Dai grafici XRD non è possibile distinguere nettamente il rapporto tra la presenza della fase di magnetite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e maghemite  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ , tuttavia i pattern mostrati confermano la buona riuscita della sintesi del core per ambedue le metodiche utilizzate.



**Figura 5. Pattern XRD delle nanoparticelle M1.**



**Figura 6. Pattern XRD delle nanoparticelle M2.**

### **FTIR delle nanoparticelle MC1 ed MC2**

In Figura 7 sono illustrati gli spettri FTIR relativi all'acido citrico tale e quale e alle nanoparticelle MC1 ed MC2. La buona riuscita della reazione di coating delle particelle di magnetite con acido citrico è confermata dalla presenza delle tipiche bande di assorbimento assegnabili alla vibrazione di stretching simmetrico e asimmetrico del carbonile presente nel gruppo COOH (bande a circa  $1625\text{ cm}^{-1}$  e  $1400\text{ cm}^{-1}$ , rispettivamente). La banda di assorbimento a circa  $585\text{ cm}^{-1}$ , presente soltanto negli spettri delle particelle MC1 ed MC2, è dovuta alla vibrazione del legame Fe-O della magnetite.

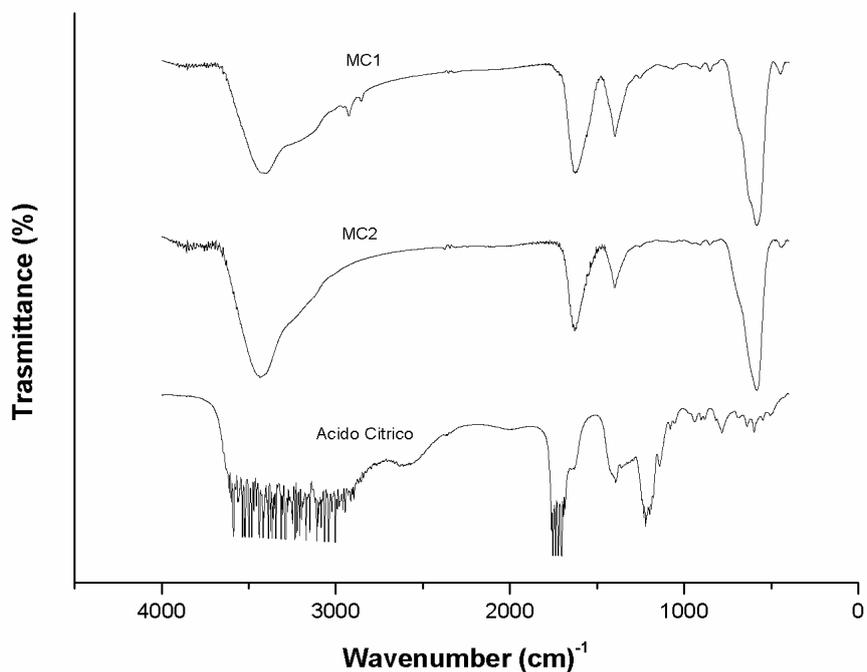
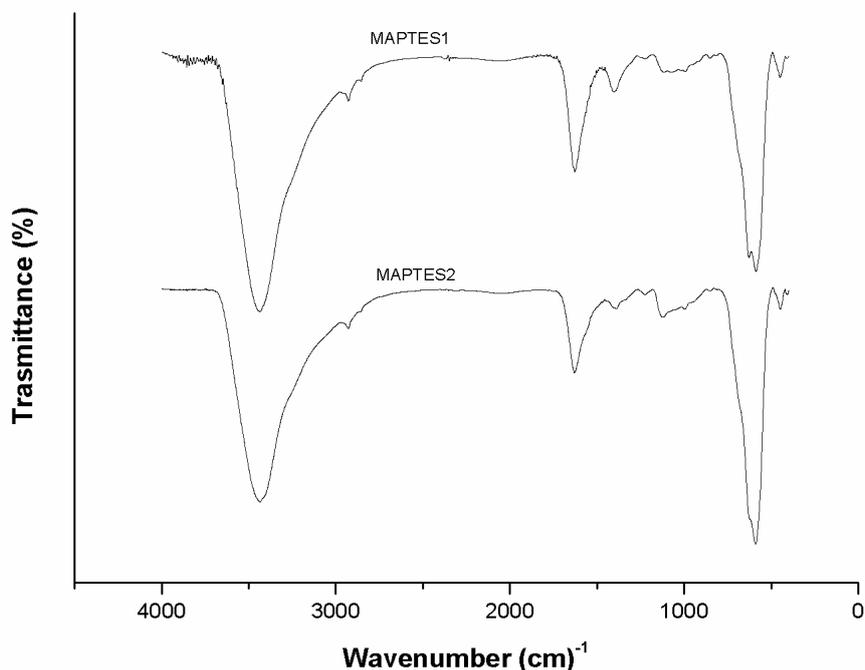


Figura 7. Spettri FTIR dell'acido citrico, delle particelle MC1 ed MC2

### FTIR delle nanoparticelle MAPTES1 E MAPTES2

Gli spettri delle particelle di magnetite con coating di APTES sono riportati in Figura 8. In questo caso la conferma dell'esito positivo della reazione di funzionalizzazione è data dalla presenza delle bande caratteristiche dell'APTES a circa  $1115\text{ cm}^{-1}$ ,  $1040\text{ cm}^{-1}$  e  $990\text{ cm}^{-1}$  dovute ai legami C – N, Si – O e SiO – H rispettivamente. Le piccole bande visibili a circa  $2930$  e  $2860\text{ cm}^{-1}$  sono attribuibili allo stretching vibrazionale del legame C – H presente nei gruppi propilici dell'APTES. Ovviamente è presente la banda tipica di assorbimento del legame Fe-O della magnetite.



**Figura 8. Spettri FTIR delle particelle MAPTES1 e MAPTES2.**

### **FTIR delle nanoparticelle MNP PAMAM**

La crescita della struttura dendrimerica sulla superficie delle nanoparticelle può essere qualitativamente studiata confrontando gli spettri FTIR relativi alle NP di magnetite e alle varie generazioni MNP PAMAM G0 – G4. In Figura 9 è riportata un'espansione degli spettri FTIR (espressi in Assorbanza) nella zona tra 1450 e 1750  $\text{cm}^{-1}$  (le varie generazioni sono indicate come  $\text{Fe}_3\text{O}_4 \text{ Gn}$ ). Le bande di assorbimento presenti a 1636 e 1621  $\text{cm}^{-1}$  sono dovute allo stretching del legame N-H dei gruppi amminici presenti sulla superficie delle particelle. Il segnale a 1550  $\text{cm}^{-1}$  è da assegnare allo stretching del legame C-N, presente all'interno della struttura dendritica. La diminuzione del segnale a 1750  $\text{cm}^{-1}$  (assegnabile alla funzione esterea presente nelle generazioni intermedie) indica ragionevolmente che la reazione di ammidazione avviene con esito positivo. La presenza dell'APTES sulla superficie delle particelle della generazione G0 è confermata dalle bande di assorbimento tra 1095 e 985  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 10), relative ai legami C – N, Si – O e SiO – H. Tutte queste bande vibrazionali IR suggeriscono la formazione del legame covalente tra i gruppi amminici terminali presenti sulla superficie della generazione G0 con i gruppi

funzionali delle generazioni successive; confermando in tal modo l'esistenza della struttura dendrimerica PAMAM.

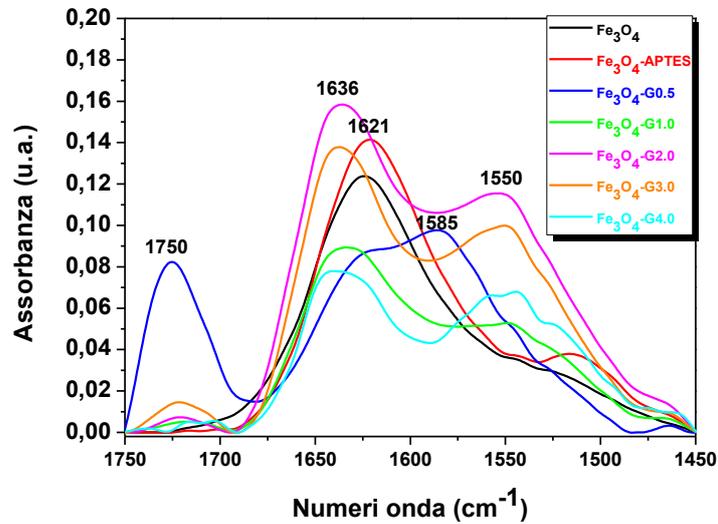


Figura 9. Espansione degli spettri FTIR relativi alle diverse generazioni di dendrimeri PAMAM (1750 – 1450cm<sup>-1</sup>).

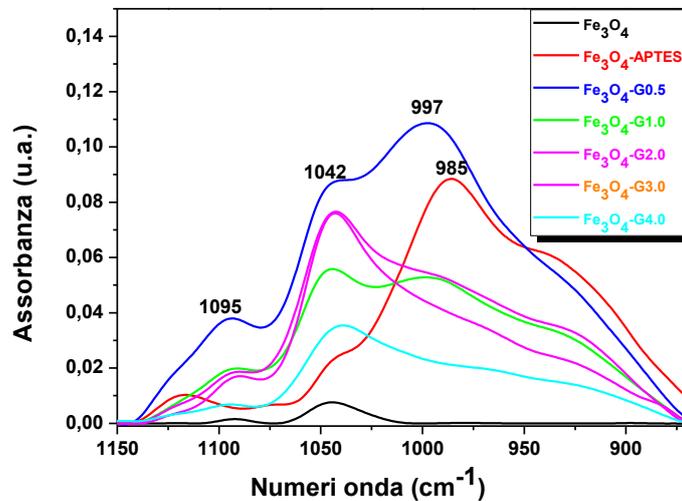
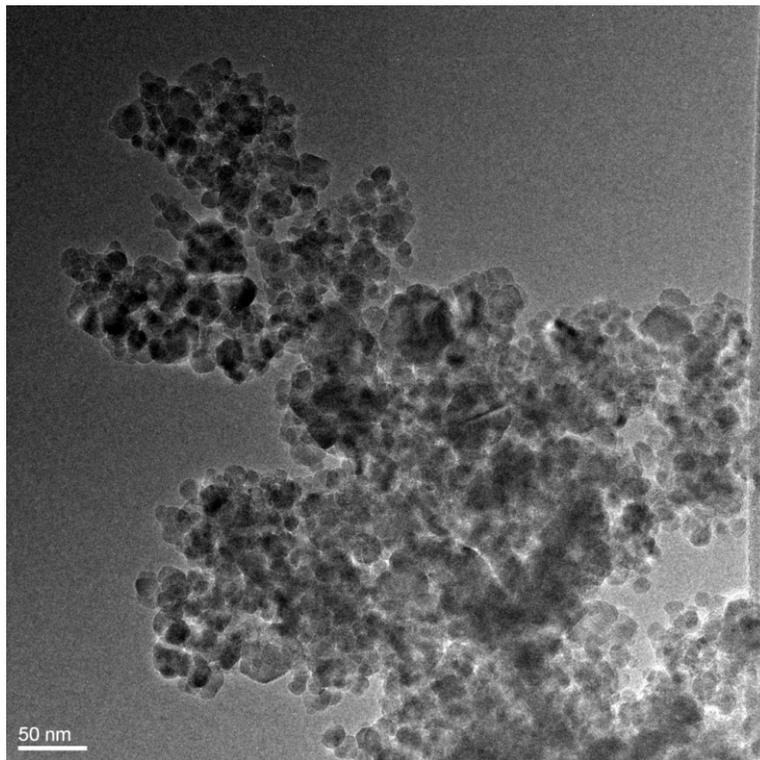


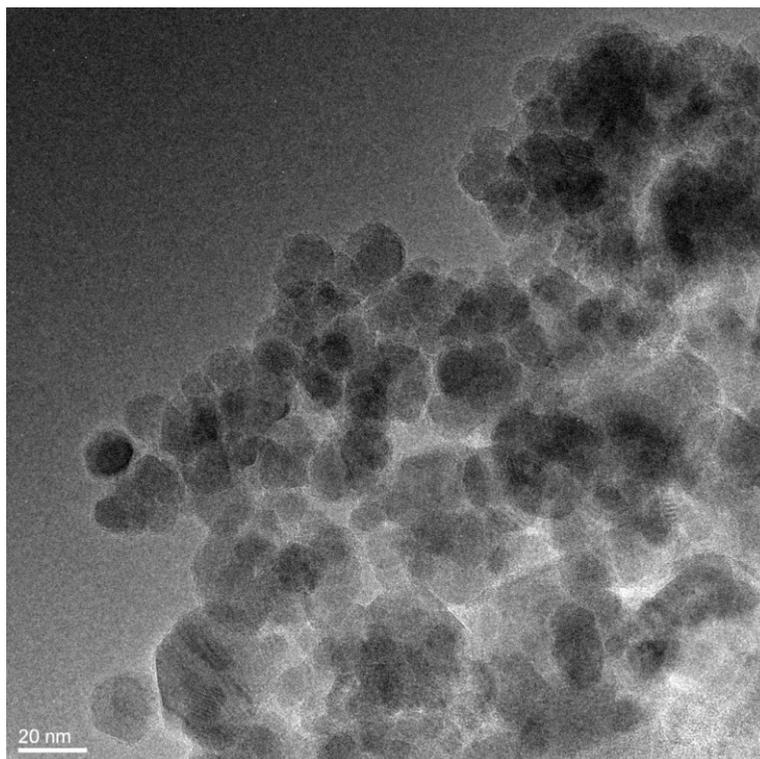
Figura 10. Espansione degli spettri FTIR relativi alle diverse generazioni di dendrimeri PAMAM (1150 – 800 cm<sup>-1</sup>).

### **Analisi al Microscopio elettronico a trasmissione (TEM)**

Delle diverse nanoparticelle sintetizzate sono state sottoposte ad analisi TEM soltanto le MC2, poiché sono le uniche particelle su cui in seguito sono state effettuate applicazioni nel biologico (capitolo II). Nelle Figure 11 a e 11 b, sono illustrate le immagini acquisite con due differenti ingrandimenti 40.000 e 100.000 x, rispettivamente. Si può notare come le particelle abbiano una distribuzione dimensionale monodispersa del core di magnetite intorno ai 10-15 nanometri. La forma risulta essere sferica e uniforme. Dalle immagini si può notare una certa tendenza all'aggregazione delle particelle, tendenza prevalentemente dovuta alla metodica di preparazione del campione per l'analisi. Infatti come ampiamente riportato in letteratura [64, 65], la deposizione su una griglia di una goccia di campione di magnetite disperso in acqua e la sua successiva essiccazione porta ad un certo livello di aggregazione.



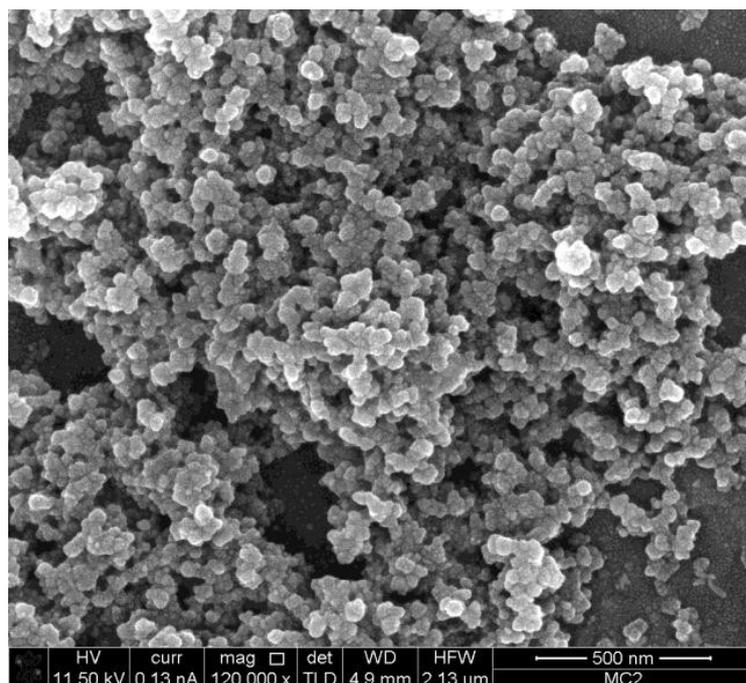
**Figura 11 a. Immagine TEM delle nanoparticelle di magnetite con coating di acido citrico MC2**



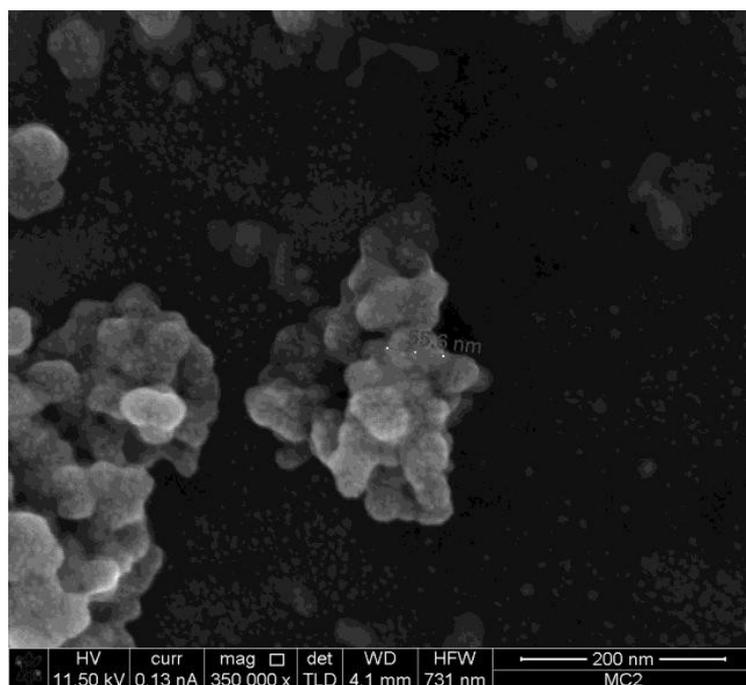
**Figura 11 b. Immagine TEM delle nanoparticelle di magnetite con coating di acido citrico MC2**

#### **Analisi al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM)**

Le immagini ottenute dall'analisi SEM mostrano come le nanoparticelle MC2 presentino una forma sferica ed una distribuzione omogenea delle dimensioni (Figura 12 a). Nell'immagine acquisita con ingrandimento 350.000 x (Figura 12 b) si può notare come gli aggregati di particelle esibiscano una distribuzione dimensionale inferiore ai 100 nm.



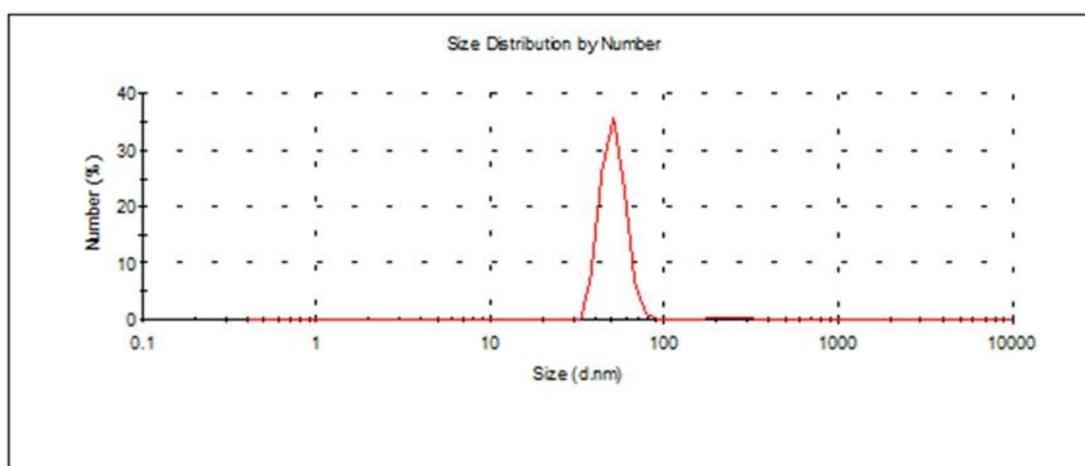
**Figura 12 a. Immagine SEM delle nanoparticelle di magnetite con coating di acido citrico MC2**



**Figura 12 b. Immagine SEM delle nanoparticelle di magnetite con coating di acido citrico MC2**

### Dynamic Light Scattering (DLS)

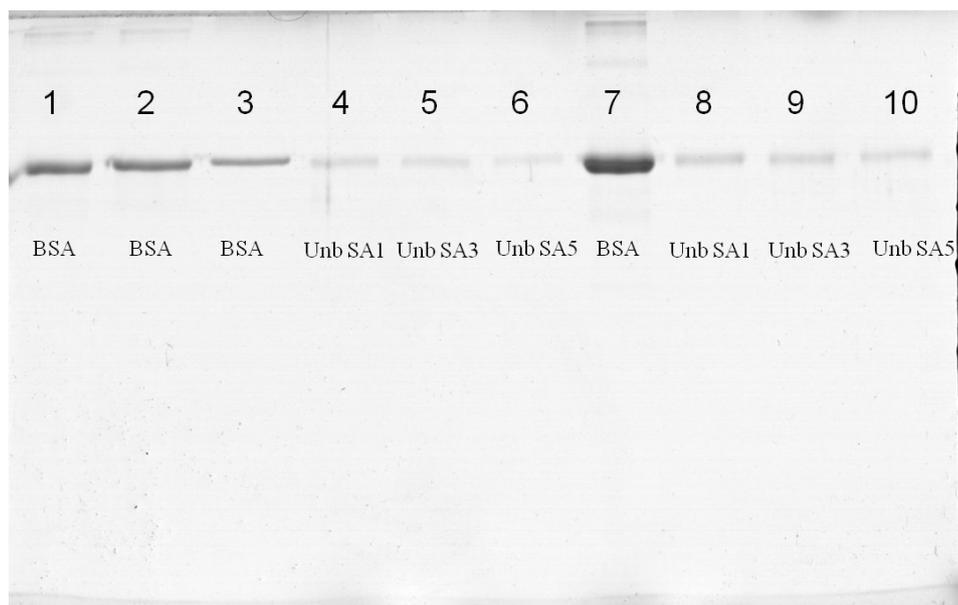
Le misure effettuate al DLS mostrano un diametro idrodinamico medio delle particelle MC2 di  $55 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$ . L'indice di polidispersione, definito come la misura dell'omogeneità dimensionale delle nanoparticelle sospese in un liquido, risulta essere pari a 0,2. Questo valore ben al di sotto della soglia di 0,4, necessaria per definire una dispersione omogenea e monodispersa, conferma ulteriormente l'omogeneità dimensionale riscontrata in precedenza con le analisi TEM e SEM. Nell'insieme le analisi TEM e DLS rilevano come le dimensioni del core e delle particelle in toto, considerando il coating e la formazione di aggregati, siano 10-15 nm e 55 nm rispettivamente. Questa è la distribuzione dimensionale tipica e caratteristica delle particelle SPIO, necessaria per fare in modo che esse esprimano un comportamento superparamagnetico [49]. In Figura 13 è riportato il grafico della distribuzione dimensionale per numero delle particelle MC2.



**Figura 13. Distribuzione dimensionale per numero delle particelle MC2**

### Elettroforesi SDS – PAGE

Nell'immagine della corsa elettroforetica ottenuta dallo scanner (Figura 14) sono evidenti le bande caratteristiche della BSA a 66KDa relative alle diverse quantità di proteina impiegata come standard (pozzetti 1, 2, 3, 7). Le bande riguardanti gli unbound SA1, SA3, SA5 (4, 5, 6 caricati con volumi di campione uguali allo standard dei pozzetti 1, 2, 3; e 8, 9, 10, con volumi uguali al pozzetto 7) risultano essere progressivamente meno intense.



**Figura 14. SDS PAGE degli standard di BSA e degli unbound.**

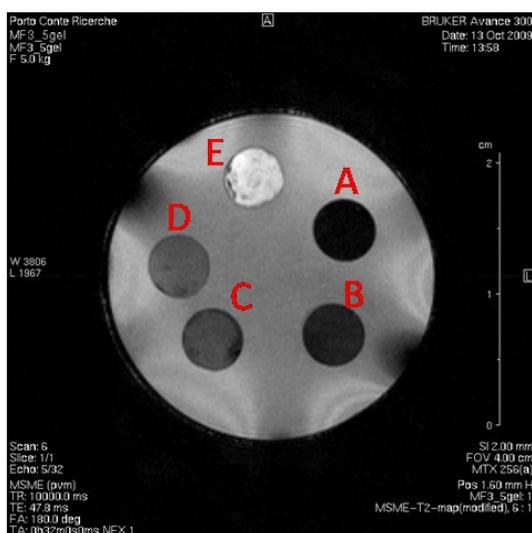
Dal momento che la concentrazione di BSA utilizzata come standard per la corsa elettroforetica è uguale a quella impiegata per la reazione di coupling, il fatto che l'intensità delle bande degli unbound siano meno intense conferma l'uptake della proteina da parte delle nanoparticelle SA1, SA3, SA5. Come detto in precedenza l' SDS PAGE è una tecnica qualitativa e semiquantitativa, tuttavia attraverso l'analisi dell'intensità delle bande e la costruzione di una curva di taratura (ottenuta inserendo i valori degli standard di BSA nel computer) è stato possibile calcolare la percentuale di BSA caricata dalle nanoparticelle. I dati risultanti sono i seguenti : SA1 = BSA legata 66% circa, SA3 = BSA legata 71% circa, SA 5 = BSA legata 76% circa. E' importante sottolineare che la BSA determinata sperimentalmente rappresenta la frazione non legata, perciò le percentuali riportate sono ottenute per differenza dal teorico usato.

### **Analisi MRI MC2**

In Figura 15 è riportata l'immagine T<sub>2</sub> weighted (relativa all'echo 5 di 32), acquisita con i parametri riportati in precedenza (TR = 10 s, TE = 9.554 ms, ecc.). L'immagine rappresenta una sezione assiale della Falcon dove le cinque circonferenze, designate dalle lettere alfabetiche (A – E), corrispondono ai pozzetti riempiti con le soluzioni a differente concentrazione di MC2 in gel di agarosio :

## Concentrazione nanoparticelle MC2

- A = 39.9  $\mu\text{g/ml}$
- B = 26.6  $\mu\text{g/ml}$
- C = 13.3  $\mu\text{g/ml}$
- D = 6.66  $\mu\text{g/ml}$
- E =  $\text{H}_2\text{O}$



**Figura 15.** Immagine  $T_2$  weighted del phantom preparato con le particelle MC2

Si può notare come il segnale all'interno delle circonferenze diventi più chiaro passando dalla soluzione a concentrazione maggiore (A) per arrivare alla soluzione contenente solo acqua (E). La presenza di contrasto negativo conferma che le particelle sintetizzate svolgono in maniera adeguata la funzione di agenti di contrasto  $T_2$ . Nella Figura 16 invece, è mostrata la mappa  $T_2$  generata utilizzando il software MATLAB 2008a (The MathWorks, Inc, Torino). Questo programma permette di processare le immagini  $T_2$  weighted ottenute dallo strumento MRI, e di rielaborarle in delle mappe nelle quali a ciascun pixel corrisponde il relativo valore di  $T_2$  raffigurato in base ad una scala di colori di riferimento. Inoltre rende possibile il calcolo del  $T_2$  o  $R_2$  di un singolo pixel oppure di una particolare regione selezionata dell'immagine, definita Regione di interesse (ROI), attraverso la risoluzione della seguente equazione:

$$SI_t = SI_0 e^{-t/T_2}$$

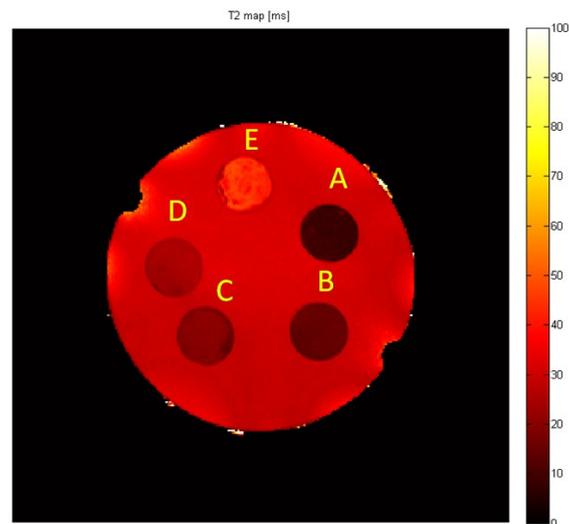
Dove:

$SI_t$  = Intensità del segnale al tempo  $t$

$SI_0$  = Intensità del segnale al tempo  $t = 0$

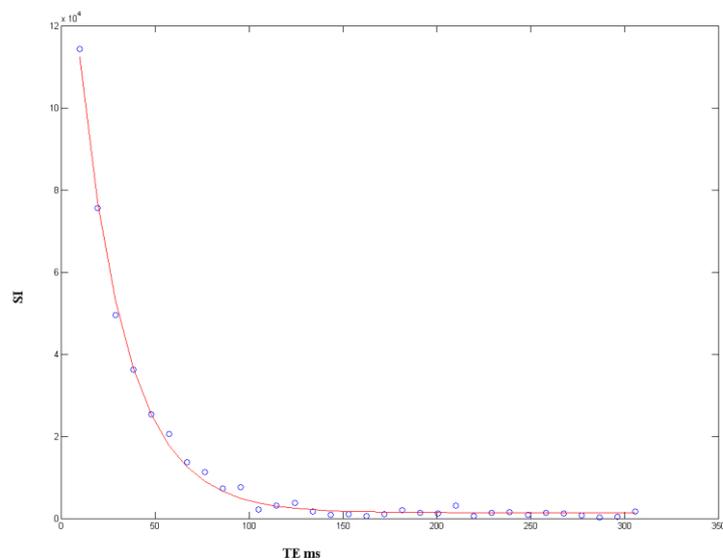
$t$  = Echo time

$T_2$  = Tempo di rilassamento spin – spin o trasversale



**Figura 16. Mappa  $T_2$  del phantom preparato con le particelle MC2**

Come si vede in Figura 17, l'equazione descrive un decadimento esponenziale dell'intensità del segnale ( $SI$ , asse delle ordinate) in funzione del tempo (echo time  $TE$ ). In questa equazione il tempo di rilassamento  $T_2$  rappresenta la costante di tempo. In base alle rielaborazioni eseguite dal software è stato possibile calcolare i valori di  $T_2$  e  $R_2$  corrispondenti a ciascuna soluzione di MC2, come mostrato nella Tabella 2. Dai dati numerici si evidenzia come al diminuire della concentrazione di particelle aumenti il valore del tempo di rilassamento trasversale  $T_2$ , e di conseguenza diminuisca la corrispondente velocità di rilassamento  $R_2$ .



**Figura 17. Esempio di curva di decadimento  $T_2$**

**Tabella 2. Valori di  $T_2$  e  $R_2$  in funzione della concentrazione di MC2**

<b>SOLUZIONI</b>	<b>Conc.MC2 (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b><math>T_2</math> (ms)</b>	<b><math>R_2</math> (<math>\text{s}^{-1}</math>)</b>
<b>A</b>	39.9	7.182	139.2
<b>B</b>	26.6	14.84	67.38
<b>C</b>	13.3	20.94	47.75
<b>D</b>	6.66	24.94	40.09
<b>E</b>	-	43.26	23.12

## Analisi MRI MNP PAMAM

Delle numerose analisi MRI eseguite sui phantoms preparati con le particelle con coating dendrimerico , a titolo di esempio vengono riportati i risultati riguardanti le MNP PAMAM – 2 Generazione 1 (G1), sotto forma di immagine T<sub>2</sub> weighted (Figura 18 a) e Mappa T<sub>2</sub> (Figura 18 b).

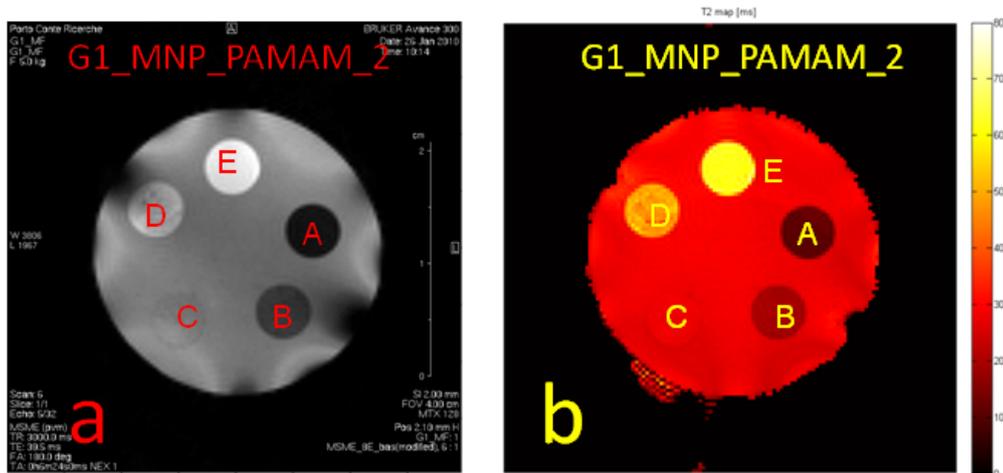


Figura 18. Analisi MRI G1\_MNP\_PAMAM\_2. (a) Immagine T<sub>2</sub> weighted, (b) Mappa T<sub>2</sub>.

Le immagini mostrano una buona qualità, a conferma dell'appropriata scelta della sequenza e della sua relativa ottimizzazione. La visualizzazione del contrasto risulta chiara perfino tra la soluzione più diluita di particelle D (2.5 µg/ml ) e la soluzione E contenente solo acqua. Risultati confrontabili sono stati ottenuti per le analisi relative a tutte le altre MNP PAMAM 2 a prescindere dalla generazione (Figura 19). Si può affermare, quindi, che la funzionalizzazione con dendrimeri garantisce la salvaguardia della capacità di generare contrasto da parte delle NP. Per indagare in maniera più profonda sulle differenze tra le varie generazioni è necessario effettuare misure sulla relaxività.

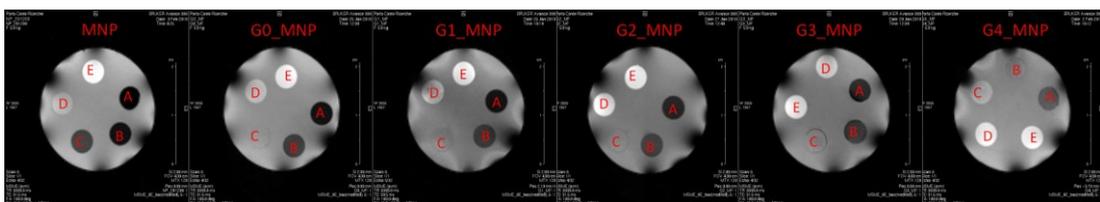


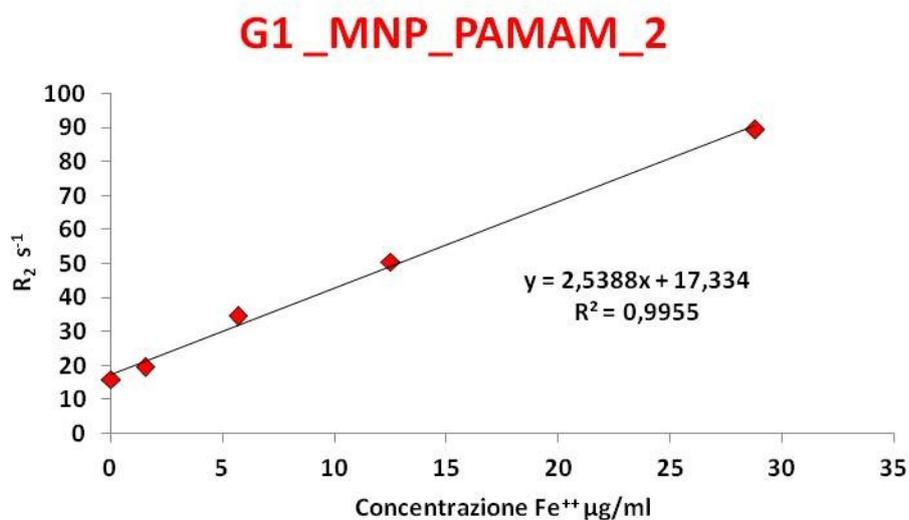
Figura 19 . Immagini T<sub>2</sub> Weighted delle diverse generazioni PAMAM.

Pertanto per poter misurare il valore di  $r_2$  delle MNP PAMAM ottenuto mediante analisi MRI, è necessario conoscere la concentrazione di ferro presente in ciascuna delle soluzioni di MNP PAMAM 2 (vedi materiali e metodi). Nella Tabella 3 sono riportati i dati riassuntivi della quantificazione del ferro ottenuti per le soluzioni di MNP PAMAM – 2 .

**Tabella 3. Quantificazione del  $Fe^{++}$  per soluzione di MNP PAMAM – 2**

Nanoparticelle	Concentrazione di $Fe^{++}$ per soluzione di MNP PAMAM – 2 ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	A (40 $\mu\text{g/mL}$ )	B (20 $\mu\text{g/mL}$ )	C (10 $\mu\text{g/mL}$ )	D (2.5 $\mu\text{g/mL}$ )
MNP ( $Fe_3O_4$ )	27.15	13.36	5.954	0.9748
G0	27.59	12.78	6.272	1.011
G1	28.82	12.52	5.687	1.545
G2	27.11	13.74	6.542	1.517
G3	25.16	11.49	5.577	1.069
G4	21.02	10.23	4.799	0.9923

I valori della quantificazione del  $Fe^{++}$  per ciascuna soluzione sono stati interpolati con i corrispondenti valori di  $R_2$  ottenuti dall'analisi MRI. In questo modo per tutte le analisi eseguite sono stati creati dei grafici contenenti le rette di regressione lineare. In Figura 20 è riportato l'esempio riguardante le G1\_MNP\_PAMAM\_2. Come si vede in ascissa è riportata la concentrazione del  $Fe^{++}$  mentre in ordinata il corrispondente valore di velocità di rilassamento. Dal valore del coefficiente di determinazione lineare ( $R^2= 0.995$ ) si evince la presenza di un'ottima correlazione lineare e di conseguenza la conferma della bontà nell'esecuzione delle analisi. Il coefficiente angolare dell'equazione della retta rappresenta il valore di rilassività, in questo caso  $2.538 \text{ ml s}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  o  $141.7 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .



**Figura 20. Retta di regressione lineare Conc. Fe<sup>++</sup>/R<sub>2</sub> per G1\_MNP\_PAMAM\_2**

### Confronto relassività tra MNP PAMAM

Una volta eseguite le misurazioni e i calcoli di relassività per tutte le MNP PAMAM 2 è stato possibile valutare l'influenza della funzionalizzazione con dendrimeri sulle proprietà magnetiche delle nanoparticelle. La Figura 21 mostra un grafico riassuntivo dei risultati relativi alle MNP PAMAM – 2 . Il grafico riporta sull'asse delle ascisse le diverse generazioni di dendrimeri a partire dalle NP non funzionalizzate (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> con coating di acido citrico), su quello delle ordinate il corrispondente valore di relassività  $r_2$  espresso in ml/ µg s. Si può notare come la relassività decresca in maniera proporzionale all'aumentare della generazione. Questo trend suggerirebbe il fatto che la formazione e la crescita dei dendrimeri abbia un'influenza sulla capacità di aumentare la velocità di rilassamento delle nanoparticelle SPIO. In particolare lo sviluppo delle ramificazioni sembrerebbe schermare il core di ossido di ferro delle NP portando ad una conseguente riduzione della relassività. Ulteriori studi e caratterizzazioni andrebbero eseguiti per ottimizzare lo sviluppo di questo tipo di coating in termini di riproducibilità di sintesi.

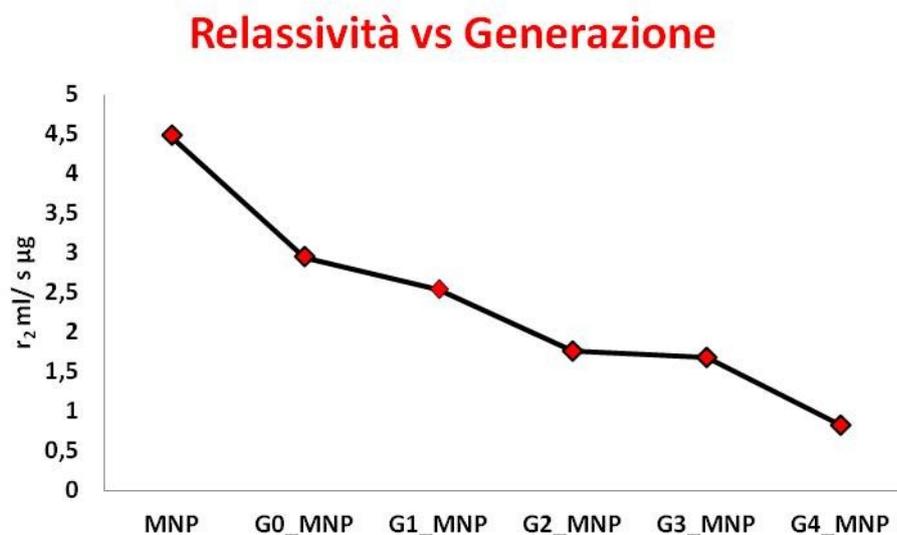


Figura 21. Relassività vs Generazione di dendrimeri per le MNP PAMAM – 2.

### Relassività e profili NMRD

Come precedentemente descritto, per poter calcolare la relassività delle particelle è indispensabile conoscere la concentrazione del ferro presente. Dalle misure rilassometriche (materiali e metodi) è risultato che 100  $\mu\text{g/ml}$  di particelle MC2 contengono 70  $\mu\text{g/ml}$  di Fe (70 %). La curva sperimentale  $R_1$ -NMRD delle particelle MC2 è mostrata in Figura 22, dove in ascissa sono riportati i valori delle frequenze di Larmor mentre in ordinata i corrispondenti valori di relassività ( velocità di rilassamento normalizzata per la concentrazione di ferro). I valori di relassività longitudinale aumentano al diminuire del campo magnetico (frequenze tra 0,01 e 0,1 MHz), mentre diminuiscono bruscamente verso lo zero all'aumentare del campo magnetico applicato (frequenze oltre i 30 MHz). Questo comportamento è tipico delle particelle SPIO che presentano la tendenza a formare piccoli aggregati delle dimensioni intorno ai 50 – 70 nm [66].

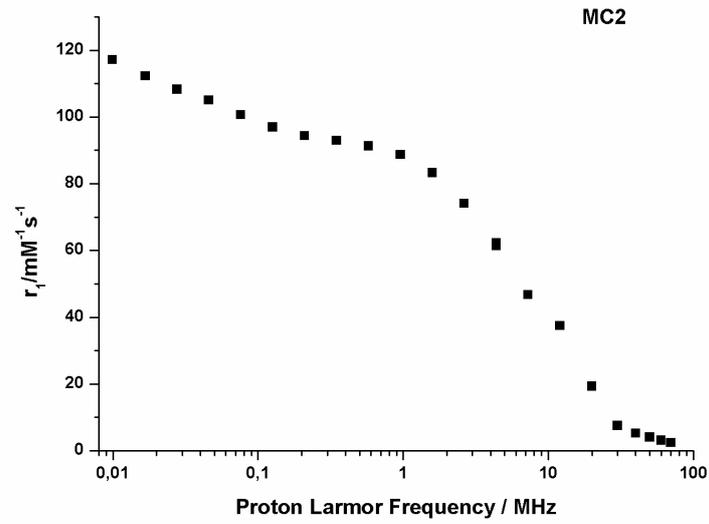


Figura 22. Profilo  $R_1$ -NMRD delle sospensioni di particelle MC2 in acqua.

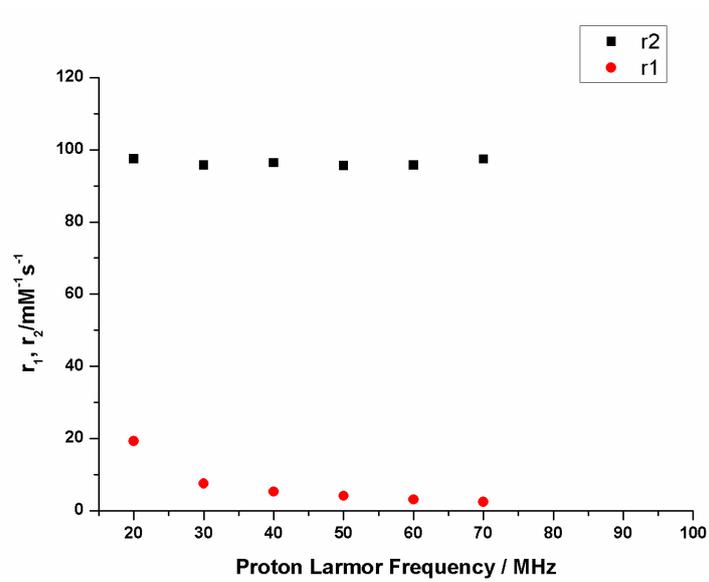


Figura 23. Profilo  $R_2$ -NMRD a campi alti delle sospensioni di particelle MC2 in acqua. Sono inclusi anche i valori  $r_1$  come confronto.

La rilassività trasversale  $r_2$  misurata tra 20 e 70 MHz è invece riportata in Figura 23; nel grafico sono inclusi come confronto anche i corrispondenti valori di  $r_1$ . Si nota come la rilassività  $r_2$  mantenga un valore costante intorno a  $98 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , come del resto ampiamente previsto dalla teoria del rilassamento superparamagnetico [29]. E' risaputo che il rapporto di rilassività  $r_2/r_1$  è un importante parametro per stimare l'efficienza di un agente di contrasto  $T_2$ . Dal grafico in Figura 23 si possono calcolare valori di  $r_2/r_1$  per le particelle MC2 pari a 5,044 e 30,74 a 20 e 60 MHz rispettivamente. Questi dati risultano essere molto validi se paragonati alle particelle commerciali ENDOREM che presentano valori di  $r_2/r_1$  pari a 4,46 e 11,9 a 20 e 60 MHz rispettivamente.

## CONCLUSIONI

Diversi procedimenti di sintesi di nanoparticelle SPIO sono stati applicati e messi a punto. Tutte le metodiche utilizzate hanno portato alla formazione di particelle adeguate a fungere da agenti di contrasto  $T_2$  MRI, come dimostrato dalle varie caratterizzazioni chimico-fisiche eseguite. Particolare attenzione è stata riposta nello sviluppo delle particelle di magnetite con coating di acido citrico MC2, che possono essere considerate come base di partenza per lo sviluppo di probes MRI più complessi (con diversi tipi di coating) e specifici per determinati target. E' stata decritta ad esempio la possibilità di funzionalizzare le particelle MC2 con linker chimici (anidride succinica) e polimeri (APTES, dendrimeri) adatti per la formazione di legami covalenti con substrati biologici come proteine, enzimi ed anticorpi. Particolarmente interessante a livello applicativo risulta essere il coating dendrimerico per la molteplicità di gruppi funzionali presenti. Tuttavia la caratterizzazione di questa struttura organica è risultata difficoltosa, infatti non è stato possibile utilizzare la spettroscopia NMR, una delle metodiche normalmente utilizzate a questo scopo, per la presenza del core superparamagnetico che creava un forte disturbo all'omogeneità del campo magnetico. Pertanto il protocollo di sintesi richiede ulteriori studi e sono altresì necessarie altre caratterizzazioni, come ad esempio l'analisi termogravimetrica. La caratterizzazione MRI ha comunque mostrato risultati incoraggianti per quanto riguarda la modulazione del contrasto attraverso lo sviluppo delle generazioni.

## **CAPITOLO II**

### **APPLICAZIONI BIOLOGICHE DELLE NANOPARTICELLE SPIO MC2 CON COATING DI ACIDO CITRICO**

In questo capitolo sono descritte alcune applicazioni in campo biologico delle nanoparticelle MC2 con coating di acido citrico sintetizzate attraverso il metodo della coprecipitazione. Nello specifico sono stati effettuati esperimenti di cell labeling con cellule staminali mesenchimali e con macrofagi murini. Infine sono state eseguite delle analisi preliminari in vivo somministrando le particelle MC2 ad un topo sano.

## INTRODUZIONE

### Cell Labeling con SPIO

Negli ultimi anni diversi gruppi di ricerca hanno studiato l'interazione delle cellule con sistemi nanoparticellari. Questi studi si sono dimostrati molto interessanti dal momento che la terapia cellulare è in continua evoluzione nell'offrire opportunità per la medicina rigenerativa, specialmente nella riparazione delle funzioni tissutali dopo il danneggiamento dell'organo [67]. Il successo di molte terapie cellulari e della immunoterapia dipende da un accurato rilascio, dosaggio e trafficking delle cellule impiegate allo scopo [68]. In biologia e medicina le SPIO sono state ampiamente utilizzate per la selezione cellulare oltre che per il loro normale uso come agenti di contrasto MRI [69]. La tecnica MRI, infatti, ha una lunga storia di applicazioni nel campo della diagnostica clinica e si sta rapidamente sviluppando come strumento non invasivo per l'imaging cellulare nello studio di malattie in modelli animali. Al fine di aumentare la visualizzazione del contrasto all'interno delle immagini si rende necessario l'impiego di agenti di contrasto specifici per il labeling cellulare che permettano una maggiore distinzione tra le cellule labellate ed il background tissutale. Un agente di contrasto ideale dovrebbe possedere le seguenti caratteristiche : biocompatibilità, un profilo non citotossico, grande sensibilità e garantire un cell tracking a lungo termine. In questo senso la popolarità delle SPIO è cresciuta negli ultimi anni grazie alle seguenti proprietà : (1) grande diminuzione dell'intensità del segnale MRI per unità di metallo; (2) biodegradabilità del ferro in esse contenuto e possibilità di riutilizzo da parte delle cellule attraverso le normali vie biochimiche del metabolismo del ferro; (3) presenza di coating superficiali, che permettono la formazione di legami chimici con gruppi funzionali e ligandi; (4) facile visualizzazione per mezzo della microscopia ottica ed elettronica; e, infine (5) possibilità di essere manipolate magneticamente [70]. L'imaging cellulare con l'impiego delle nanoparticelle SPIO è stato introdotto per la prima volta per analisi a livello epatico [71]. Dopo la somministrazione intravenosa le particelle SPIO sono rapidamente fagocitate dalle cellule Kupffer del fegato, una classe di macrofagi specializzati. Questo uptake cellulare rende l'organo ipointenso (e quindi più scuro) nelle immagini MRI. Nelle aree dove la normale architettura del fegato è disturbata (mancanza di cellule Kupffer), come accade in presenza di tumori epatici, l'intensità

del segnale rimane invece inalterata e quindi messa in evidenza rispetto al restante tessuto epatico sano. Le particelle di ossido di ferro hanno trovato ulteriori applicazioni di imaging cellulare per altre patologie. In particolare le USPIO, grazie alle loro dimensioni (inferiori ai 40 nm), vengono fagocitate dai macrofagi circolanti nel sangue e di conseguenza possono : permettere la visualizzazione dell' attività macrofagica in diverse malattie (patologie renali, disfunzioni della barriera emato-encefalica) [72] ed evidenziare la loro localizzazione in focolai infiammatori (placche ateromatose) o in distretti del sistema immunitario (linfonodi) [73]. Senza dubbio però l'applicazione più importante delle particelle SPIO è quella di monitorare tramite MRI la migrazione di cellule labellate ex vivo nelle nuove terapie basate sull'utilizzo delle cellule staminali [74].

### **Cellule Staminali**

Le cellule staminali (SC) sono cellule non specializzate capaci di autorigenerarsi attraverso la divisione cellulare o di differenziarsi in cellule specializzate di diverse e determinate linee di tessuto. Esse sono capaci di proliferare indefinitamente mantenendosi in uno stato indifferenziato: possono dunque affrontare numerose duplicazioni senza dare segno di invecchiamento o differenziamento. Questa proprietà prende il nome di self-renewal (o autorinnovamento) e viene altrimenti definita come la capacità di generare cellule con le medesime caratteristiche della cellula madre ad ogni duplicazione cellulare [75].

Inoltre, le cellule staminali presentano una grande plasticità differenziativa, ovvero sono in grado di dare luogo a numerosi tipi cellulari diversi qualora vengano indotte a differenziarsi [76].

Un meccanismo correlato al fenomeno della plasticità è la transdifferenziazione cioè la capacità delle cellule già programmate di cambiare il proprio profilo di espressione genetica in quello di un tipo cellulare completamente diverso. Quindi le cellule staminali adulte o cellule progenitrici, quando vengono rimosse dal loro microambiente e introdotte in uno differente, sono attivate alla riprogrammazione genica per assumere l'aspetto del nuovo tipo cellulare [77]. Le cellule staminali si suddividono in cellule staminali embrionali, cellule staminali adulte e cellule precursori/progenitrici [78]. I tessuti adulti fornitori di cellule staminali sono:

- Midollo osseo
- Sangue
- Sistema nervoso
- Muscolo
- Fegato
- Cute

Le cellule staminali adulte del midollo osseo si dividono in due popolazioni con distinta progenie: cellule staminali emopoietiche (HSCs) e cellule staminali mesenchimali (MSCs). Le MSCs sono cellule pluripotenti e rappresentano una piccola frazione, circa 0,001-0,01% della popolazione di cellule nucleate del midollo osseo [79]. Le MSCs sono cellule adese che assumono una forma fusata, simile a quella dei fibroblasti ed esprimono una specifica combinazione di molecole di adesione quali CD29, CD44, CD105, CD166, ed altri. Non esprimono invece marker fenotipici propri delle cellule emopoietiche come il CD34.

### **Macrofagi**

I macrofagi costituiscono una popolazione di cellule fagocitiche mononucleate che originano nel midollo osseo da un precursore mieloide che dà origine ai monociti del sangue. Questi, dal sangue migrano nei tessuti e maturando si differenziano in macrofagi. I macrofagi sono estremamente mobili e dotati di elevata attività fagocitica. Essi sono inoltre caratterizzati da un grosso nucleo di forma variabile, che spesso presenta una profonda indentatura che si accentua con la progressiva maturazione della cellula, al punto tale da assumere un aspetto a “ferro di cavallo” o addirittura bilobato [80].

I macrofagi sono i componenti chiave dell'immunità innata: rappresentano infatti la prima linea di difesa dell'ospite nei confronti di numerosi microrganismi invasori e molto spesso sono sufficienti a controllare e debellare l'infezione e ad evitare quindi l'insorgenza di un'eventuale malattia.

Grazie alla loro elevata attività fagocitica e al notevole contenuto di enzimi idrolitici, i macrofagi sono in grado di esplicare funzioni citotossiche: inglobano e distruggono detriti derivanti dai tessuti e materiale esogeno, che possono essere presenti durante

l'infiammazione e la riparazione dei tessuti.

Durante la fagocitosi, i macrofagi emettono lunghi prolungamenti citoplasmatici (pseudopodi) per circondare e inglobare il materiale particolato. Queste cellule rimuovono dalla circolazione il materiale particolato estraneo all'organismo, le cellule morte e i detriti cellulari [81, 82].

## **MATERIALI E METODI**

### **Isolamento delle MSCs e coltura nel terreno specifico**

Le MSCs, derivanti dal midollo osseo umano, sono state separate in FICOLL (GE Healthcare, Vienna, Austria) e seminate (quantità  $10^7$ /ml) in un terreno di coltura selettivo per le cellule staminali mesenchimali:  $\alpha$ -MEM (Minum Essential Medium) + 10% FBS (siero bovino fetale) + 10  $\mu$ g/ml FGF (Fibroblast growth factor), contenente penicillina e streptomina (Invitrogen, life technologies, Monza, Italia). Le cellule sono arrivate a confluenza dopo circa 15 giorni di coltura. In seguito sono state trasferite in un incubatore a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> e analizzate al citofluorimetro (Canto II, BD Franklin Lakes, USA) dopo 3, 5, 10 giorni in modo da valutare le differenze di espressione nel tempo. Per verificare il fenotipo è stata saggiata la positività dei marcatori fenotipici CD29, CD44, peculiari delle cellule mesenchimali, utilizzando il citofluorimetro.



**Figura 1. Cellule staminali mesenchimali in coltura.**

### **Esperimenti di cell labeling MSCs con MC2**

Le MSCs sono state seminate (250.000 cellule per ml) in un terreno di coltura  $\alpha$ -MEM con 10% FBS (siero bovino fetale), 10  $\mu$ g/ml FGF (Fibroblast growth factor), penicillina, streptomina. Al terreno sono state poi aggiunte le MC2 a differenti concentrazioni di Fe per ml di terreno (50  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, e 0 come controllo). Le cellule quindi sono state incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> a diversi intervalli di tempo (2h, 6h, 24h). Al termine di ogni incubazione le cellule sono state

lavate tre volte con tampone fosfato salino (PBS), tripsinizzate e preparate per la conta cellulare.

### **Conta cellulare e test di vitalità cellulare**

La vitalità delle cellule è stata determinata attraverso il test di esclusione del trypan blue (Invitrogen, life technologies, Monza, Italia), un colorante in grado di colorare selettivamente le cellule morte. Le cellule vitali invece, avendo una membrana cellulare intatta, non consentono al colorante di penetrare nel citoplasma. Le cellule esposte a 0, 50, 100  $\mu\text{g Fe/ml}$  di MC2 sono state raccolte con PBS immediatamente dopo l'incubazione, miscelate in rapporto 1:1 con trypan blue e contate al microscopio ottico (Olympus BH-2, New York Microscope Company, Inc. USA).

### **Adipogenesi**

Le cellule staminali mesenchimali, in seguito al processo di labeling con le MC2 (100  $\mu\text{g Fe/ml}$ ), sono state seminate (250.000 cellule/ml in fiasche T25) in un terreno specifico per l'induzione adipogenica:  $\alpha$ -MEM + 10% FBS, contenente i seguenti additivi 0,5 mM di 3-isobutil-1-metilxantina, 1  $\mu\text{M}$  di desametasone, 0,2mM di indometacina e 10  $\mu\text{g/ml}$  di insulina umana ricombinante (Invitrogen, Life Technologies, Monza, Italia). Le cellule sono state incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> per 10 giorni effettuando tre cambi di terreno.

### **Quantificazione del ferro intracellulare**

Dopo l'esperimento di labeling cellulare (24 h di incubazione), le MSCs sono state lavate tre volte con PBS per rimuovere le particelle SPIO non internalizzate. In seguito le cellule ( $5 \times 10^5$ ) sono state poste in provette e sono state centrifugate a 3000 rpm per 5 minuti (ALC PK121R, Severn Sales, Bristol, UK). Il surnatante è stato quindi eliminato e si sono aggiunti 0,5 ml di HCl (5M) (Sigma-Aldrich, Italia). Dopo aver lasciato i campioni a temperatura ambiente per un'ora, i tubi da micro centrifuga sono stati centrifugati nuovamente a 3000 rpm per 5 minuti e i surnatanti raccolti in microcuvette da 1,5 ml. Successivamente, sono stati aggiunti 0,5 ml di una soluzione di ferrocianuro di potassio al 5% (Sigma-Aldrich, Italia) preparata al momento dell'uso, e prima dell'analisi UV è stata effettuata un'incubazione di 30

minuti al buio. Le letture allo spettrofotometro UV (U-2800, AS instruments Torino) sono state eseguite utilizzando una lunghezza d'onda di 700 nm. La concentrazione di ferro è stata determinata normalizzando l'assorbanza ottenuta con una curva di calibrazione precedentemente preparata con degli standard di ferro ( $y = 0.21252x + 0.02034$ ,  $R^2 = 0.99761$  [83]).

### **Analisi MRI su cellule staminali**

Una parte delle cellule staminali incubate per 24 h in terreno contenente le MC2 (100  $\mu\text{g Fe/ml}$ ), sono state utilizzate per effettuare delle analisi MRI. Nello specifico è stato preparato un phantom riempiendo cinque pozzetti con soluzioni contenenti un numero decrescente di cellule labellate in gel di agarosio al 4 % (Sigma-Aldrich, Italia). Le immagini sono state acquisite attraverso l'utilizzo di una sequenza MSME\_T<sub>2</sub>\_map con i seguenti parametri :

#### **Parametri sequenza MRI**

FOV = 4 x 4 cm

Matrice = 256 x 256 pixels

TR = 3.263 s

TE = 10 ms

Echoes = 64

#### **Numero di cellule**

A = 2 x 10<sup>6</sup>

B = 1 x 10<sup>6</sup>

C = 5 x 10<sup>5</sup>

D = 5 x 10<sup>4</sup>

E = 1 x 10<sup>4</sup>

### **Labeling Macrofagi con SPIO MC2**

I macrofagi J774.A1 (ATCC, Manassas, USA) sono stati seminati (800.000, in una piastra da 6 cm di diametro) in un terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium ) addizionato con 10% di FBS, penicillina , streptomicina e 2 mM glutammina (Invitrogen, life technologies, Monza, Italia). Al terreno sono state aggiunte le MC2 a differenti concentrazioni di ferro nel terreno : 0, 10, 50, 100, 500  $\mu\text{g Fe/ml}$ . I macrofagi sono stati incubati a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> per 1 h, 6 h e 18 h rispettivamente. Al termine di ciascun tempo di incubazione le cellule sono state accuratamente lavate con PBS, staccate dalla piastra di coltura e preparate per i successivi esperimenti (capitolo successivo).

### **Colorazione con Prussian Blue**

La colorazione con Prussian blue (o blu di Prussia) è una metodica largamente utilizzata per dimostrare la presenza di ioni ferro nei tessuti e per valutare l'efficienza del labeling cellulare. Il principio dell'esperimento si basa sulla reazione di combinazione tra gli ioni  $Fe^{3+}$  e il ferrocianuro di potassio che porta alla formazione di un pigmento blu chiamato appunto Prussian blue. L'esperimento è stato condotto nella seguente maniera : i macrofagi sono stati incubati per 1h in terreno contenente 0 (controllo), 50 e 100  $\mu g$  Fe/ml di MC2. In seguito le cellule sono state lavate con PBS, fissate su dei vetrini con paraformaldeide al 4% e incubate per 30 minuti con una miscela 1:1 di ferrocianuro di potassio al 5% e di HCl al 5% (Sigma-Aldrich, Italia). Successivamente i vetrini sono stati accuratamente lavati e contro-colorati con Nuclear fast red (Sigma-Aldrich, Italia), un colorante specifico per il nucleo, per 5 minuti. Infine, dopo gli ultimi lavaggi, l'efficienza del labeling è stata valutata al microscopio ottico

### **Studi di citotossicità : test con resazurina**

Il test con resazurina (AlamarBlue, Invitrogen, Life Technologies, Monza, Italia) è un metodo fluorimetrico per stimare la vitalità cellulare. Questo procedimento si basa sull'utilizzo della resazurina come indicatore della capacità metabolica cellulare: infatti le cellule vitali mantengono l'abilità di ridurre la resazurina a resorufina (composto altamente fluorescente,  $560_{EX}$  nm/ $580-590_{EM}$  nm). Quelle non vitali invece, perdono velocemente questa capacità metabolica, e non sono quindi in grado di generare un segnale fluorescente. Per effettuare il test di citotossicità i macrofagi sono stati seminati in una piastra composta da 24 pozzetti, ognuno dei quali contenente lo stesso terreno di coltura utilizzato per gli esperimenti di cell labeling (vedi sopra), con gli stessi tempi di esposizione (1h, 6 h, 18 h) alle MC2 a differente concentrazione di Fe nel terreno (0, 10, 50, 100, 500  $\mu g$  Fe/ml). Al termine di ciascuna incubazione, dopo vari lavaggi con PBS, il terreno presente nei pozzetti è stato sostituito con del terreno fresco contenente la resazurina al 10%. A questo punto le cellule sono state incubate con l'indicatore per 12h a 37°C in atmosfera al 5% di  $CO_2$ . Infine i surnatanti di tutti i pozzetti sono stati analizzati al fluorimetro (Fluoromax 4, Horiba, USA) (eccitazione 560 nm, emissione. 583 nm).

### **Analisi MRI in vivo**

Le particelle MC2, disperse in PBS, sono state somministrate ad un topo sano (C57B/6, Charles River Laboratories, Calco, Italia) per via intravenosa ad una dose di 0,5 mmol Fe/Kg di peso corporeo. Il topo è stato anestetizzato con il Rompun (Bayer, Leverkusen, Germania) e il Zoletil (Virbac, Milano, Italia). Le immagini sono state acquisite con l'impiego di una sequenza RARE con i seguenti parametri : TR = 5000 ms, echo time = 3.4 ms, RARE factor = 32, numero di medie = 6, matrice = 128×128, FOV = 3 cm × 3 cm, slice thickness (spessore della sezione) = 0,5mm. L'intensità del segnale (SI) è stata calcolata nelle cosiddette regioni di interesse o ROIs, disegnate manualmente con l'utilizzo del software ParaVision 4.0 (Bruker Biospin, Milano, Italia) sul fegato e sulla milza del topo. Inoltre ROIs sono state disegnate anche in regioni dell'immagine esterne all'animale per calcolare la deviazione standard del rumore (noise SD). L'aumento dell'intensità del segnale (SI enhancement  $\Delta$ SNR%) è stato calcolato in accordo con la seguente equazione :

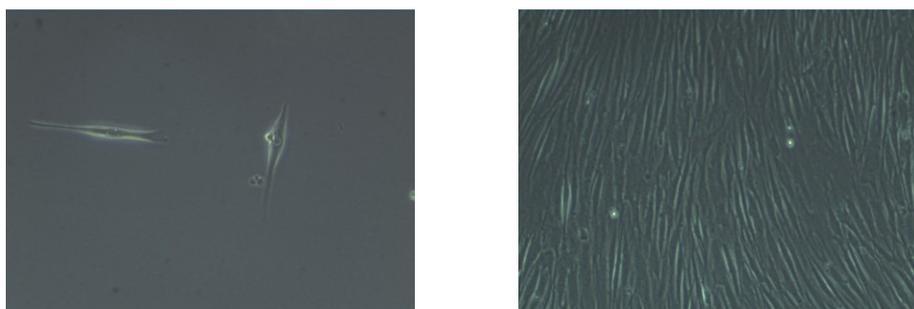
$$\Delta\text{SNR}\% = \frac{(\text{SI}_{\text{post}} / \text{Noise SD}) - (\text{SI}_{\text{pre}} / \text{Noise SD})}{(\text{SI}_{\text{pre}} / \text{Noise SD})} \times 100$$

Dove  $\text{SI}_{\text{post}}$  rappresenta l'intensità del segnale dopo la somministrazione dell'agente di contrasto e  $\text{SI}_{\text{pre}}$  l'intensità del contrasto prima della somministrazione.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### Crescita e sviluppo delle cellule MSCs

Le cellule staminali mesenchimali seminate in terreno specifico per 15 giorni hanno sviluppato il caratteristico aspetto fibroblastico ed hanno raggiunto una confluenza del 90%. Nella Figura 2 sono riportate le immagini ottenute al microscopio ottico delle cellule a 24 h dalla semina (a sinistra) e dopo 5 giorni in coltura (a destra).

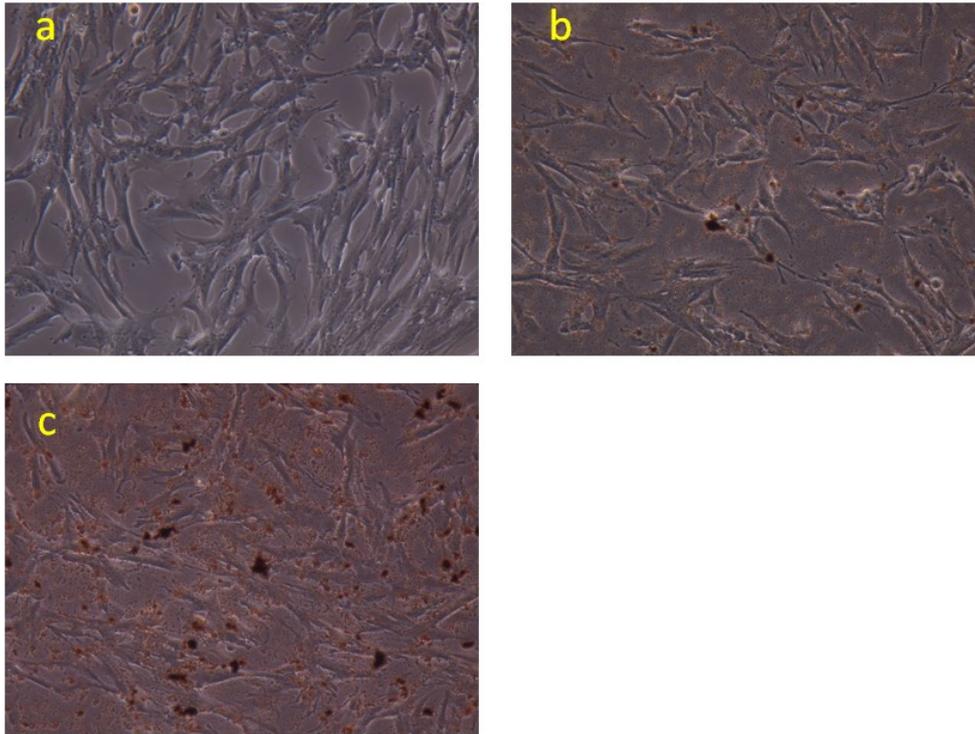


**Figura 2. Cellule MSC a 24 h dalla semina (sinistra), cellule MSC dopo 5 giorni in coltura (destra).**

L'analisi al citofluorimetro ha confermato la presenza dei marcatori fenotipici caratteristici delle cellule mesenchimali come il CD29 ed il CD44 e l'assenza del marker CD34, peculiare delle cellule ematopoietiche.

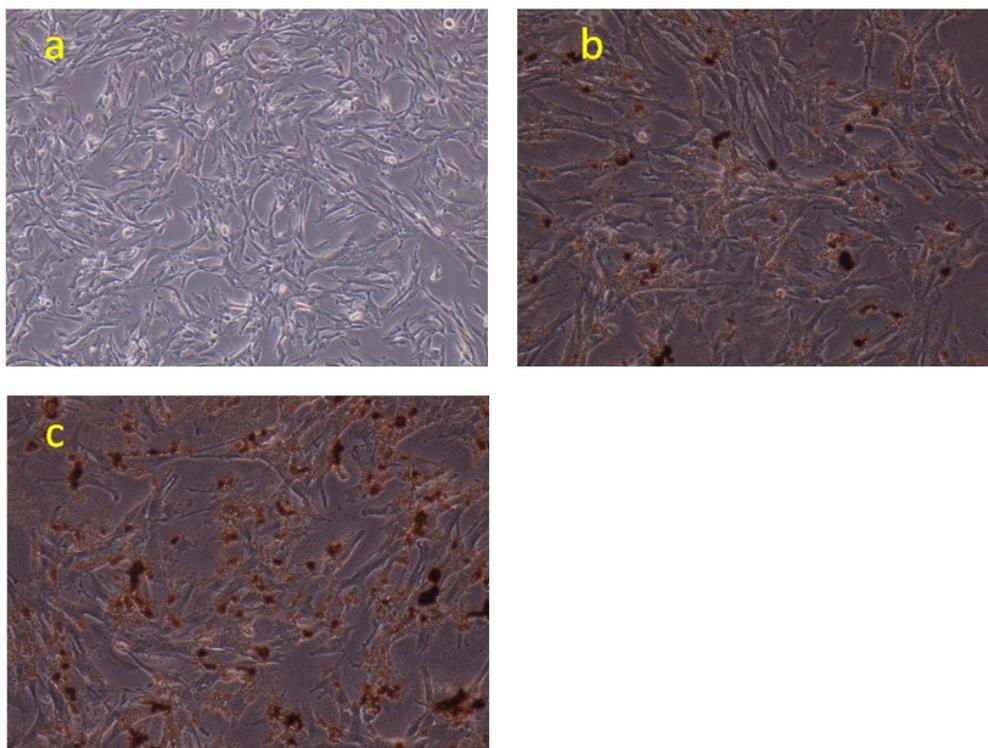
### Esperimenti di cell Labeling MSCs con SPIO MC2

Le MSCs hanno efficacemente internalizzato le nanoparticelle MC2 al termine del processo di labeling. L'uptake cellulare è risultato essere proporzionale alla concentrazione di nanoparticelle SPIO (50-100  $\mu\text{g Fe/ml}$ ) e al periodo di incubazione (2h, 6h, 24h) come ci si aspettava e come risulta evidente dalle immagini ottenute al microscopio ottico. In Figura 3 sono riportate le immagini relative alle cellule incubate per 2h con 0 (controllo), 50 e 100  $\mu\text{g Fe/ml}$  (Figura 3 a, 3b e 3c rispettivamente). Si nota la differenza tra il controllo e le cellule labellate con le SPIO, nelle quali l'uptake è evidenziato dalla presenza di piccoli grumi marroni all'interno delle cellule.

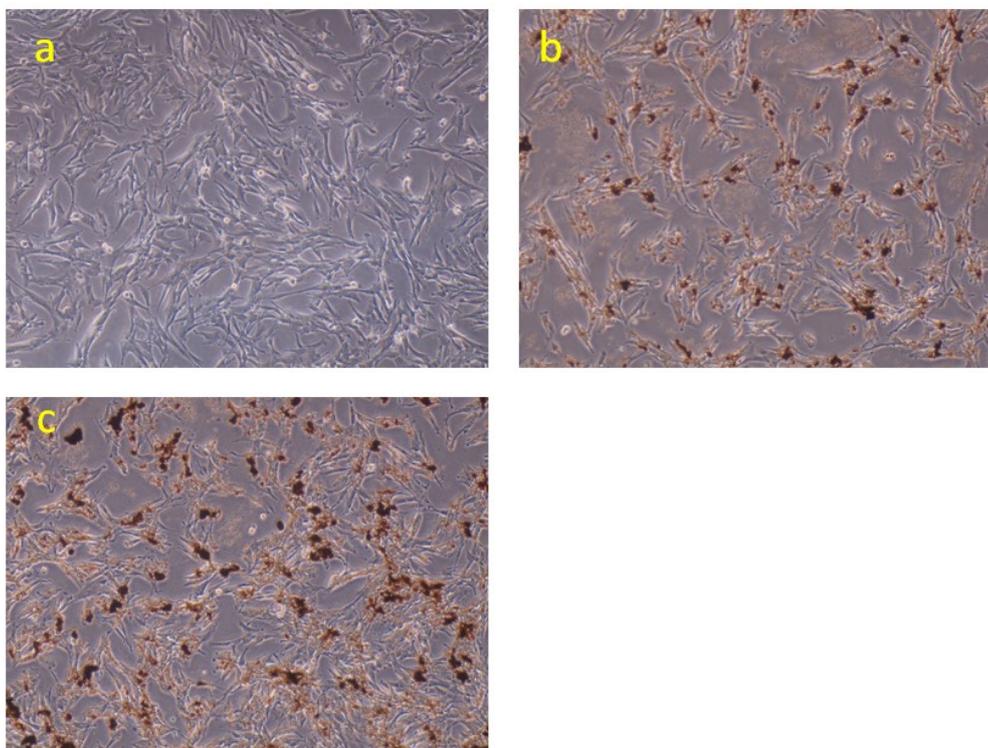


**Figura 3. Immagini ottenute al microscopio ottico delle cellule incubate per 2h con le MC2. a) Controllo, b) 50 µg Fe/ml e c) 100µg Fe/ml (ingrandimento 1000x).**

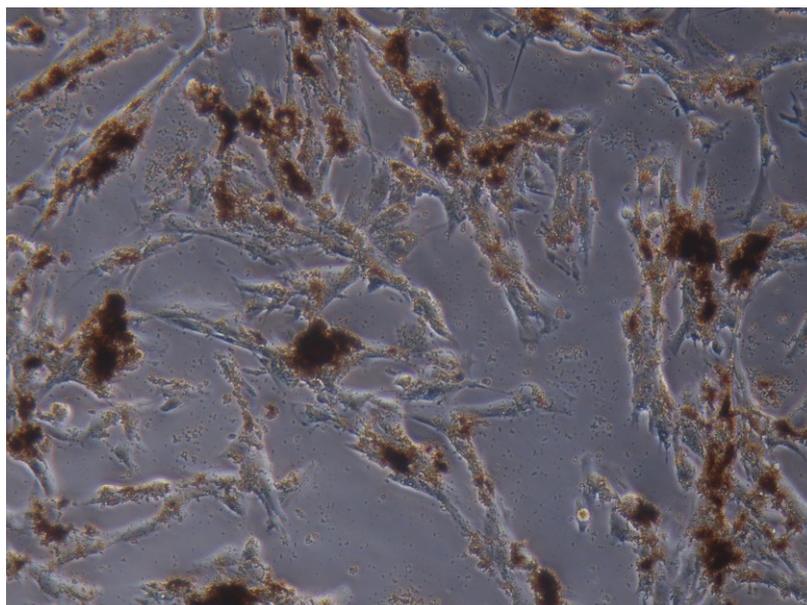
L'analisi delle immagini relative ai tempi di incubazione di 6h e 24h (Figure 4 e 5) conferma il maggior accumulo di NP SPIO per le cellule sottoposte a concentrazioni di particelle maggiori per tempi di incubazione più lunghi. Infine in Figura 6 è riportata un'immagine, relativa alle cellule incubate per 24 h con 100 µg Fe/ml, ottenuta con un ingrandimento maggiore (2000x), che evidenzia in modo migliore l'efficienza dell'uptake.



**Figura 4. Immagini ottenute al microscopio ottico delle cellule incubate per 6h con le MC2. a) Controllo, b) 50 µg Fe/ml e c) 100µg Fe/ml (ingrandimento 1000x).**



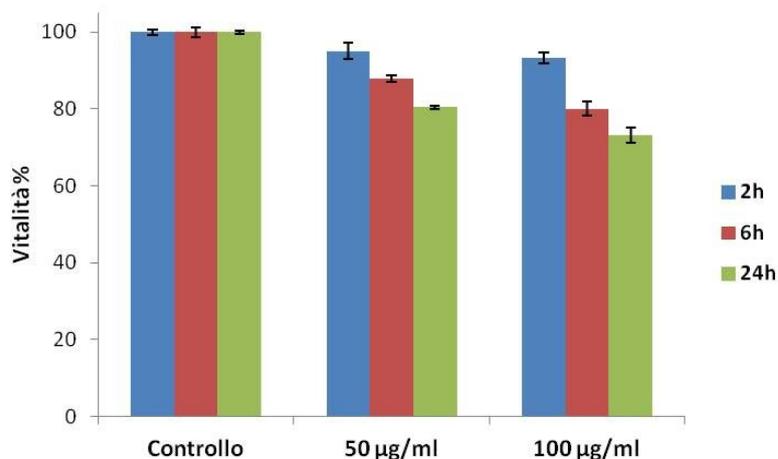
**Figura 5. Immagini ottenute al microscopio ottico delle cellule incubate per 24h con le MC2. a) Controllo, b) 50 µg Fe/ml e c) 100µg Fe/ml (ingrandimento 1000x).**



**Figura 6. Immagine ottenute al microscopio ottico delle cellule incubate per 24h con le NP MC2 alla concentrazione 100µg Fe/ml (ingrandimento 2000x).**

### **Conta cellulare e test di vitalità cellulare**

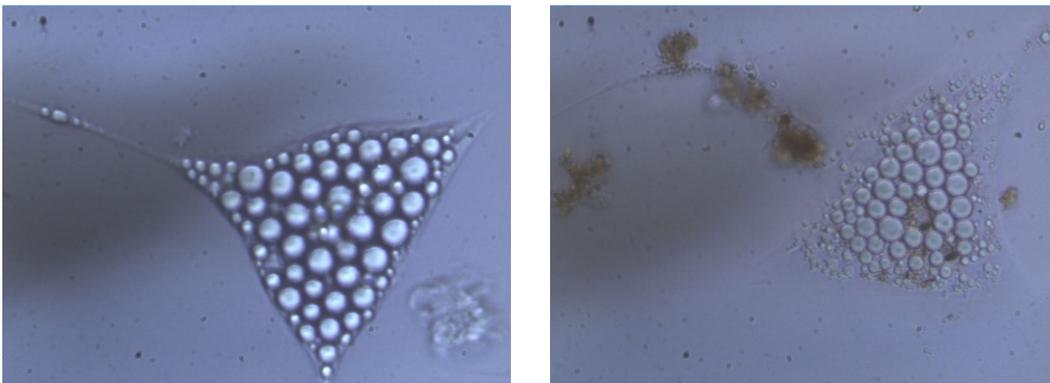
L'incubazione delle nanoparticelle MC2 con le cellule staminali mesenchimali si è rivelata non citotossica. Come si può vedere nel grafico riportato in Figura 7 la percentuale di vitalità risulta essere molto alta per le due differenti concentrazioni di MC2 utilizzate (95 e 93% rispettivamente) dopo due ore di incubazione. Le percentuali si mantengono su buoni lavori anche per i tempi di incubazione più lunghi : 88 % e 80 % dopo 6 h e 24 h per 50 µg Fe/ml; 80% (6h) e 73% (24 h) per la concentrazione 100 µg Fe/ml rispettivamente.



**Figura 7. Grafico rappresentante il test di vitalità per due differenti concentrazioni di MC2**

## Adipogenesi

Il labeling con le particelle MC2 non ha influenzato in maniera negativa la capacità di differenziamento delle cellule staminali. Le MSCs labellate infatti, si sono differenziate in adipociti una volta seminate nel terreno specifico per l'induzione adipogenica (vedi materiali e metodi). In Figura 8 è riportata a sinistra l'immagine di una cellula staminale completamente differenziata in adipocita (controllo), con la presenza delle caratteristiche gocce lipidiche. A destra, invece, è mostrato un adipocita derivante da una cellula staminale labellata con le particelle MC2 (si nota la presenza di grumi marroni di particelle all'interno del corpo cellulare).

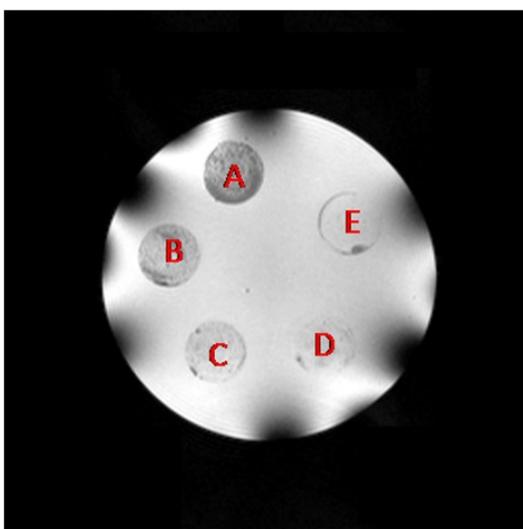


**Figura 8. Adipocita maturo di controllo (a sinistra), adipocita maturo con particelle MC2 internalizzate (a destra).**

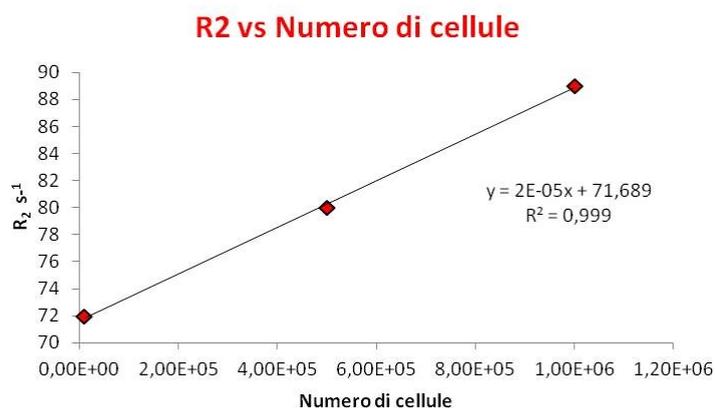
Le particelle MC2, pertanto, non solo si sono dimostrate non citotossiche ma allo stesso tempo hanno garantito la salvaguardia delle normali funzioni fisiologiche cellulari. In dei lavori già presenti in letteratura [84, 85, 86] è stato provato come il labeling con particelle SPIO non influenzi negativamente la capacità di differenziazione delle cellule staminali. Tuttavia in questi studi sono state sempre utilizzate particelle SPIO già presenti in commercio e approvate clinicamente. Per nostra conoscenza questo studio risulta essere fra i primi nel mostrare la differenziazione cellulare dopo il labeling con particelle sintetizzate ex novo e rivestite con acido citrico. Questo aspetto risulta essere di notevole importanza per possibili applicazioni future: ad esempio si potrebbero eseguire esperimenti di cell trafficking tramite MRI, su cellule labellate ex vivo e successivamente somministrate in vivo.

### **Analisi MRI su cellule staminali e quantificazione del ferro**

La Figura 9 riporta l'immagine  $T_2$  weighted (pesata in  $T_2$ ) acquisita sul phantom preparato con le cellule staminali labellate con MC2. Nonostante la qualità dell'immagine non sia ottima, a causa di una non perfetta omogeneizzazione delle soluzioni contenenti le cellule, è possibile notare la presenza di contrasto (in particolare per i pozzetti A e B contenenti un numero maggiore di cellule). Il grafico in Figura 10, con il numero di cellule per soluzione riportato in ascissa e il corrispondente valore di velocità di rilassamento  $R_2$  in ordinata, mostra un coefficiente di determinazione lineare  $R^2$  pari a 0,999 per tre punti della retta. Queste analisi preliminari su colture cellulari labellate con le SPIO MC2, pur necessitanti di ottimizzazioni varie, hanno dimostrato la possibilità di effettuare un uptake cellulare efficiente, di visualizzare tramite tecnologia MRI la presenza di contrasto dovuto alle particelle internalizzate ed infine di trovare una buona correlazione tra la velocità di rilassamento  $R_2$  e la quantità di cellule effettivamente labellate. La quantità di ferro per cellula dopo 24 h di incubazione misurata per via spettrofotometrica, varia in un range compreso tra 10 e 20 pg in accordo con diversi dati riportati in letteratura [83].



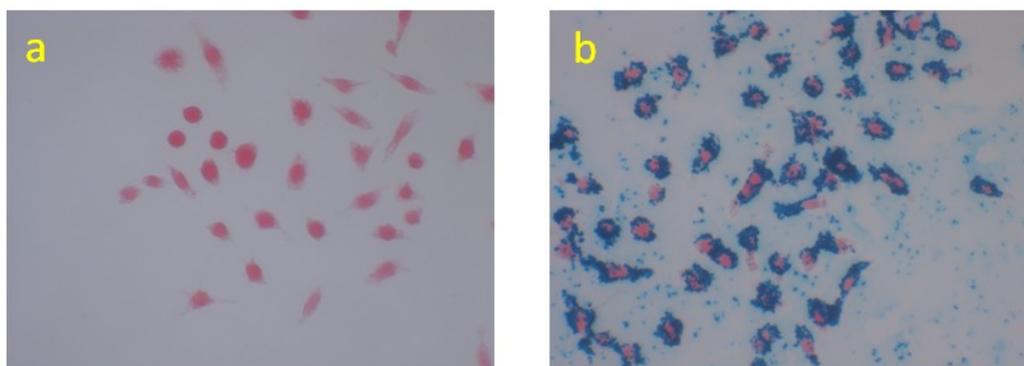
**Figura 9. Immagine  $T_2$  weighted phantom con cellule staminali**



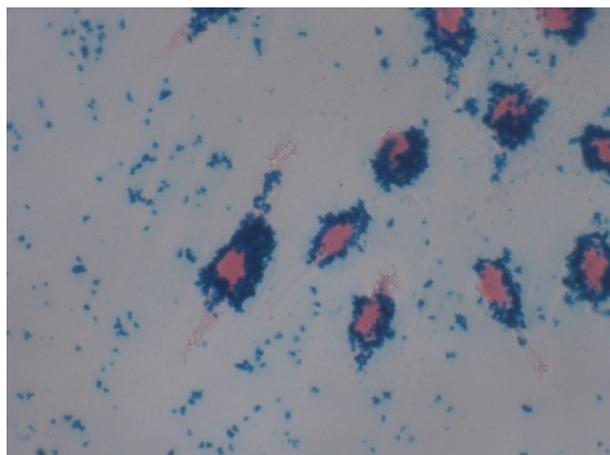
**Figura 10. Retta di regressione lineare n° di cellule vs R<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>.**

### Colorazione con Prussian Blue

I macrofagi J774.A1 hanno internalizzato efficacemente le nanoparticelle MC2 dopo un 1h di incubazione. Per questo tipo di linea cellulare non sono necessari tempi di incubazione più lunghi vista la grande capacità di fagocitosi. L'efficienza del processo di labeling è messa in evidenza nelle immagini ottenute al microscopio dopo l'esecuzione della colorazione con il Prussian Blue. A titolo di esempio in Figura 11a è riportata l'immagine relativa ai macrofagi non labellati, dove si nota una colorazione rosastra più intensa delle cellule a livello nucleare. In Figura 11b sono mostrati i macrofagi incubati per 1h con le particelle MC2 alla concentrazione di 50 µg Fe/ml. Risulta evidente la presenza del ferro (colorato in blu) a livello citoplasmatico, in contrapposizione con il colore rosastro del nucleo (Figura 12, ingrandimento 4000 x).



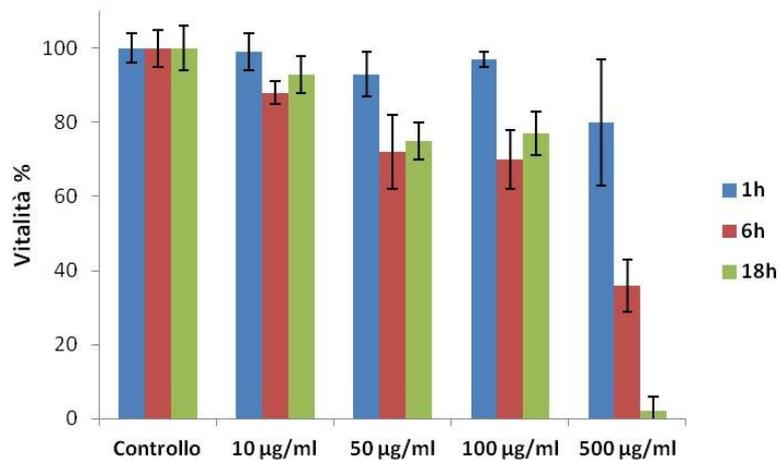
**Figura 11. Microfotografie di macrofagi dopo colorazione Prussian blue. a) macrofagi non labellati, b) macrofagi labellati con MC2 50 µg Fe/ml.**



**Figura 12. Macrofagi labellati con MC2  $\mu\text{g Fe/ml}$  (ingrandimento 4000 x).**

### **Studi di citotossicità : test con resazurina**

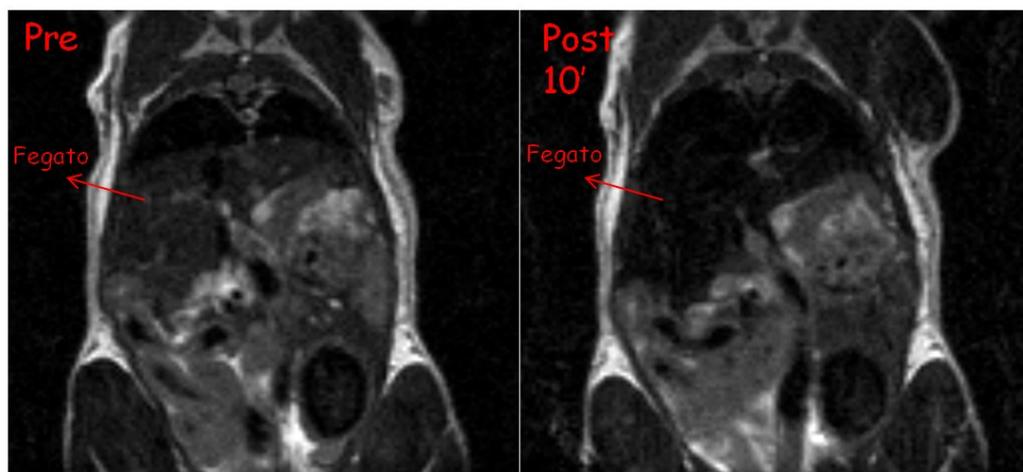
Le particelle MC2 si sono rivelate non citotossiche nei confronti dei macrofagi in un range di concentrazione tra 10-100  $\mu\text{g Fe/ml}$  per diversi tempi di incubazione (Figura 13). Soltanto l'esposizione alla concentrazione di 500  $\mu\text{g Fe/ml}$  di MC2 ha presentato dei livelli di citotossicità nei macrofagi in particolare dopo 6h e 18h di incubazione. Si può notare anche come le deviazioni standard riguardanti questa concentrazione siano relativamente alte. Questo dato suggerisce ulteriormente la presenza di un'influenza negativa sulla vitalità cellulare dopo l'esposizione a 500  $\mu\text{g Fe/ml}$  di MC2, pur tenendo presente che in ambito biologico ed in particolare a livello cellulare la variabilità degli esperimenti è sempre molto elevata. Come sottolineato in precedenza la capacità fagocitaria dei macrofagi è talmente alta, che sono sufficienti brevi tempi di incubazione con bassi valori di concentrazione di particelle per ottenere un labeling efficiente. Si è inoltre dimostrato che un eventuale prolungamento dei tempi e un aumento della concentrazione non comportano in nessun caso un'ottimizzazione del protocollo, dal momento che i macrofagi risultano essere in un certo senso "saturati" già dopo un'ora di incubazione. Forzare la mano su questi parametri porta al contrario ad un aumento degli effetti negativi.



**Figura 13.** Grafico rappresentante il test di vitalità con resazurina per le particelle MC2.

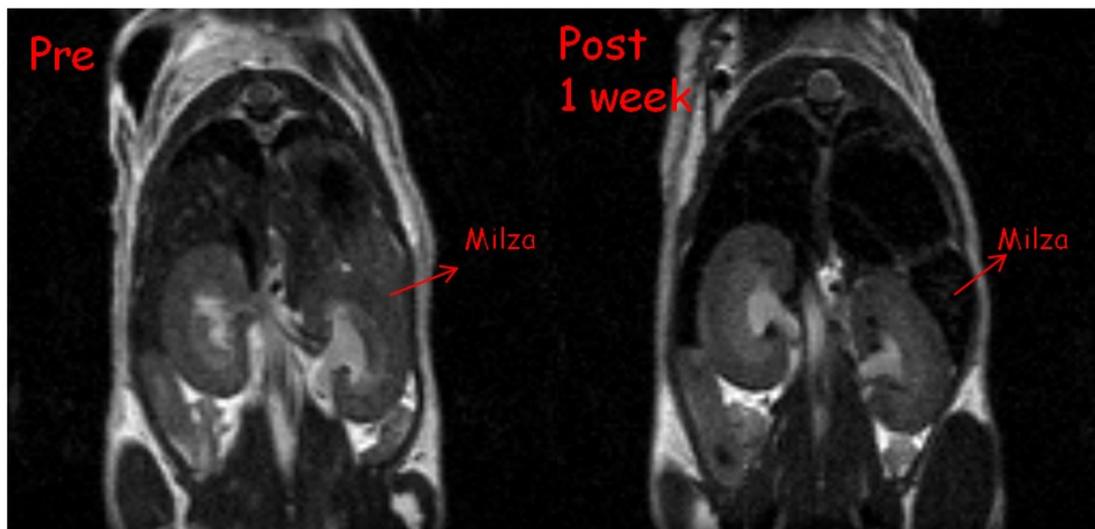
### Analisi MRI in vivo

Analisi preliminari in vivo sono state eseguite su un topo sano, al quale sono state somministrate le particelle MC2 per via intravenosa attraverso la coda. Le particelle trasportate dal torrente circolatorio si sono accumulate prevalentemente nel fegato e nella milza, come del resto ci si aspettava essendo questi organi dei siti preferenziali di accumulo delle SPIO [87]. In particolare nel fegato è possibile notare una diminuzione dell'intensità di segnale, e di conseguenza un'incurimento dell'organo, dopo solo dieci minuti dalla somministrazione delle MC2. Questo fenomeno è



**Figura 14.** Immagini coronali del topo acquisite prima (a sinistra) e dopo dieci minuti dalla somministrazione delle particelle MC2 (a destra).

mostrato in Figura 14, dove sono riportate le immagini rappresentanti delle sezioni coronali del corpo del topo, acquisite prima (Pre) e dopo la somministrazione (Post) delle nanoparticelle. Con il passare del tempo le particelle si sono localizzate anche in altri organi come reni e linfonodi. Tra le diverse immagini acquisite, in Figura 15 è riportato, a titolo di esempio, il confronto tra l'immagine pre-somministrazione e l'immagine acquisita una settimana dopo l'iniezione delle particelle MC2. In quest'ultima è evidente la presenza di contrasto negativo, in particolar modo a livello della milza, che risulta essere anche ingrossata per il probabile accumulo di macrofagi. Per confermare numericamente la presenza di contrasto negativo dovuto alla particelle MC2, è stato calcolato ( vedi materiali e metodi) il  $\Delta\text{SNR}\%$  ( signal intensity enhancement) ai diversi tempi. Essendo le particelle SPIO degli agenti di contrasto negativi il  $\Delta\text{SNR}\%$  risulta essere ovviamente negativo, a differenza degli agenti positivi che portano ad un aumento percentuale dell'intensità di segnale. Nella tabella 1 sono riportati i valori di  $\Delta\text{SNR}\%$  relativi al fegato e alla milza. Si può notare come, a livello epatico, l'intensità del segnale si riduca del 56% dopo dieci minuti dalla somministrazione, e come questo valore aumenti gradualmente nel tempo fino a raggiungere un livello costante intorno al 65-70%. La milza mostra un trend del tutto simile, con un graduale aumento della percentuale negativa nel tempo.



**Figura 15. Immagini coronali del topo acquisite prima (a sinistra) e dopo una settimana dalla somministrazione delle particelle MC2 (a destra).**

Di conseguenza si può constatare come le particelle MC2 esplicano la loro azione di agenti di contrasto negativi MRI anche in vivo. Esse risultano essere non tossiche per l'animale, come confermato dalla possibilità di effettuare diverse analisi nel tempo (a distanza di oltre due settimane) e dal fatto che il topo ha continuato a svolgere normalmente le sue funzioni vitali.

**Tabella 1. Valori di  $\Delta$ SNR% relativi al fegato e alla milza.**

<b>Organo</b>	<b>Tempo post somministrazione</b>	<b><math>\Delta</math>SNR%</b>
fegato	10 min.	-56,3
	4 h	-64,5
	24 h	-69
	1 settimana	-71,5
milza	10 min.	-33
	4 h	-63,3
	24 h	-64,15
	1 settimana	-71

## CONCLUSIONI

Per concludere si può affermare che le nanoparticelle MC2 si sono dimostrate valide ed efficienti nelle varie applicazioni biologiche a cui sono state sottoposte. In particolare negli esperimenti di cell labeling sono risultate essere non citotossiche per due tipi differenti di cellule : macrofagi e cellule staminali. L'uptake cellulare è stato ottimale per entrambe le linee cellulari, pur considerando le differenti caratteristiche funzionali e fisiologiche (capacità fagocitaria, differenziamento, ecc.). In particolare le cellule staminali hanno conservato la capacità di differenziarsi in adipociti dopo l'esposizione alle particelle MC2. Questo lavoro risulta essere uno dei primi (per nostra conoscenza) dove questo fenomeno è stato dimostrato con l'impiego di particelle SPIO con un coating di acido citrico sintetizzate ex novo. Le analisi eseguite in vitro su phantoms hanno evidenziato la possibilità di visualizzare tramite

MRI le cellule labellate. Infine gli esperimenti preliminari effettuati dopo la somministrazione delle particelle MC2 ad un topo sano, hanno dimostrato la loro efficacia come agenti di contrasto negativi in vivo.

**CAPITOLO III**  
**OTTIMIZZAZIONE DEL CONTRASTO MRI: SPIO E LIPOSOMI**  
**PARAMAGNETICI**

In questo capitolo vengono descritti lo studio e l'ottimizzazione di una nuova sequenza MRI per ottenere contrasto positivo a partire dalle nanoparticelle SPIO. E' presentata inoltre la possibilità di estendere questo approccio ai liposomi caricati con complessi di metalli paramagnetici. Infine è riportata l'applicazione di questa metodica a macrofagi labellati con le nanoparticelle SPIO.

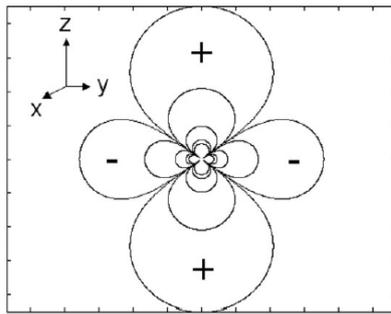
## INTRODUZIONE

### Contrasto positivo con le particelle SPIO

Le nanoparticelle SPIO sono state ampiamente utilizzate come agenti di contrasto per MRI. Esse vengono definite agenti negativi poiché il loro effetto sul  $T_2$  e il  $T_2^*$  dei protoni delle molecole d'acqua causa una riduzione dell'intensità del segnale MRI e come conseguenza porta ad un'inscurimento delle immagini nelle zone dove esse sono localizzate. I principali vantaggi delle particelle SPIO sono: la buona sensibilità, infatti possono essere utilizzate con concentrazioni pari a  $\mu\text{moli}$  di Fe per Kg di paziente; e la loro specificità per diversi organi (fegato, milza, linfonodi). Il loro principale svantaggio invece, risulta essere la difficoltà nel discriminare tra la diminuzione dell'intensità di segnale nelle immagini indotta dalle SPIO, con altre sorgenti di segnale ipointenso. Tra quest'ultime si possono citare : l'interfaccia tra tessuti differenti, la presenza di bolle d'aria, calcificazioni e di artefatti dovuti al movimento [88]. Per questo motivo negli ultimi anni si sono sviluppate nuove tecniche e nuove sequenze MRI in maniera da ottenere un contrasto positivo dalle particelle SPIO [89]. Una delle più importanti tra queste è senza dubbio la sequenza MRI chiamata Inversion recovery with on resonant water suppression (IRON) [90]. Questa sequenza si basa sulla capacità delle particelle SPIO di generare un disturbo esterno al campo magnetico applicato (Figura 1) e di creare allo stesso tempo un gradiente di suscettibilità magnetica. Questo gradiente, che può essere definito  $\Delta K$ , a sua volta genera uno shift delle frequenze dei protoni direttamente proporzionale al disturbo esterno del campo magnetico, come descritto nella seguente equazione :

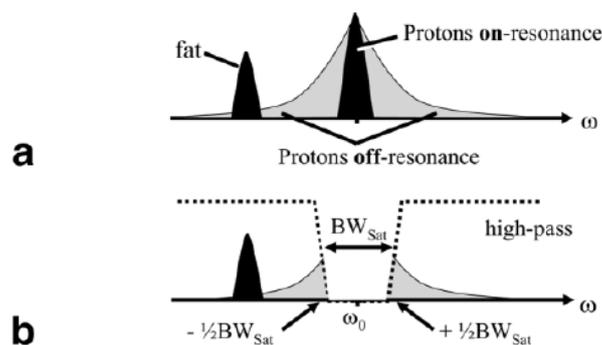
$$\Delta \omega_{\text{esterno}} = \gamma \Delta B_{\text{esterno}}$$

dove  $\Delta \omega_{\text{esterno}}$  rappresenta lo shift delle frequenze,  $\gamma$  la costante del rapporto giromagnetico dei protoni e  $\Delta B_{\text{esterno}}$  il disturbo esterno del campo magnetico. L'idea alla base della sequenza IRON è quella di applicare un pulso RF di saturazione (con una larghezza di banda limitata  $BW_{\text{sat}}$ ) selettivo per l'acqua in risonanza prima della normale parte di imaging della sequenza. In questa maniera il segnale derivante dai protoni dell'acqua in risonanza viene soppresso. Questo pulso di saturazione, tuttavia, non influisce sui protoni che si trovano nelle vicinanze delle particelle SPIO e che per effetto del gradiente di suscettibilità vengono definiti off resonant.



**Figura 1. Grafico che illustra il disturbo al campo magnetico generato dalle particelle SPIO [89].**

Pertanto il loro segnale non viene modificato e di conseguenza un contrasto positivo viene generato in prossimità delle particelle SPIO. In Figura 2 è riportato uno schema che mostra il segnale di un'ipotetica immagine MRI nel dominio delle frequenze. Nella parte a) della Figura sono mostrate le frequenze dei protoni in risonanza, del grasso (fat, eventualmente presente) e dei protoni off resonant. In b) invece è messa in evidenza la situazione dopo l'applicazione del pulso di saturazione, che sopprime il segnale dei protoni in risonanza e lascia inalterato quello dei protoni off resonant e del grasso. Ovviamente per eliminare anche il segnale derivante dal grasso è necessario implementare la sequenza con un'operazione chiamata fat suppression, presente in tutti gli strumenti MRI presenti in commercio.



**Figura 2. Schema rappresentativo dei segnali di un immagine MRI nel dominio delle frequenze. a) Segnali dei protoni in risonanza, dei protoni off resonant e del grasso. b) Situazione dopo l'applicazione del pulso di saturazione con  $BW_{sat}$  limitata [90].**

### Liposomi e complessi paramagnetici

I liposomi sono dei sistemi nanovesicolari costituiti da un doppio strato fosfolipidico che racchiude al suo interno una cavità idrofila (Figura 3) [91]. I liposomi sono conosciuti e studiati da tempo in campo scientifico in particolar modo nel settore farmaceutico, dove vengono utilizzati come sistemi carrier per il drug delivery [92]. Il loro successo è dovuto all'ottima biocompatibilità e alla capacità di interagire e fondersi con le membrane biologiche. Inoltre i liposomi rendono possibile il trasporto sia di farmaci di natura idrofobica (all'interno del doppio strato fosfolipidico) che di natura idrofila (all'interno della loro cavità).

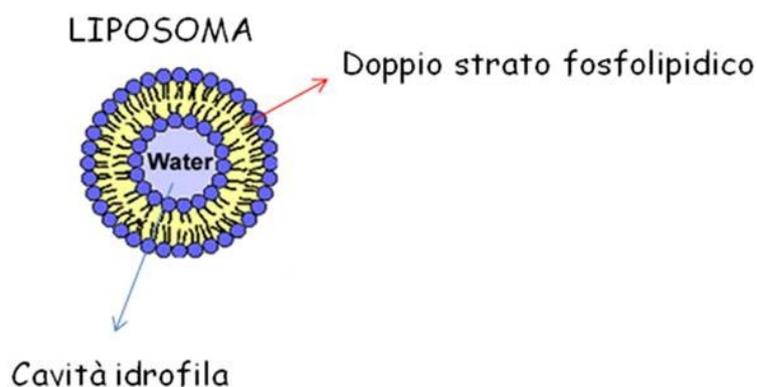


Figura 3. Rappresentazione grafica di un liposoma.

Recentemente i liposomi sono stati presi in considerazione come carrier per agenti di contrasto MRI. In particolare sono stati studiati ed utilizzati per questo scopo complessi di ioni metallici appartenenti alla famiglia dei lantanidi (Gadolinio, Disprosio, Europio ecc.) [17]. Questi infatti, a seconda della loro natura, possono essere facilmente incorporati nel doppio strato fosfolipidico (complessi anfifilici) oppure essere incapsulati nella cavità idrofila (complessi idrofilici), come riportato in Figura 4.

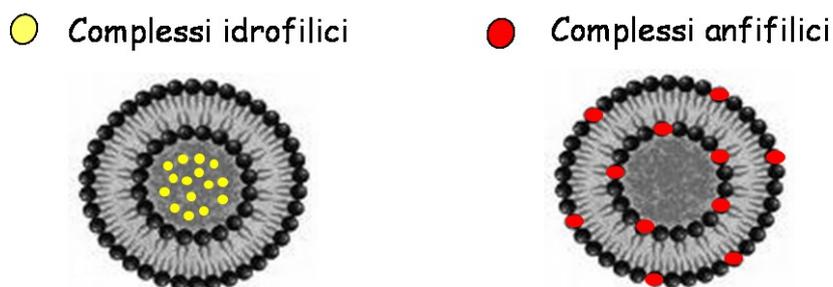


Figura 4. Complessi idrofilici incapsulati (a sinistra) e complessi anfifilici incorporati nel doppio strato (a destra).

Come conseguenza i liposomi caricati con composti paramagnetici possono comportarsi da agenti  $T_1$  o  $T_2$  a seconda delle proprietà magnetiche del composto utilizzato.

## **MATERIALI E METODI**

### **Ottimizzazione della Sequenza IRON modificata**

La sequenza IRON è stata modificata ed adattata allo strumento utilizzato, un Bruker Avance 300 MHz equipaggiato con un Micro probe 2.5. Nello specifico è stata messa a punto una sequenza costituita da una parte preparatoria comprendente un pulso di Magnetization Transfer con frequenza di irradiazione = 0Hz, necessario per saturare l'acqua in risonanza. Questo pulso è stato applicato prima dell'impiego di una sequenza RARE (una normale sequenza MRI) con i seguenti parametri: TR = 5 s, echo time = 3.7 ms, RARE factor = 8. Per ottimizzare la sequenza tre differenti forme del pulso di saturazione sono state esaminate (block, sinc3, gauss), mentre venivano variati altri parametri come la potenza (12-0,7  $\mu$ T), la durata (1000-2000ms), la larghezza di banda BW (1,3-99,4 Hz) e il numero di impulsi (1-4-32). Le analisi sono state effettuate utilizzando phantoms di agar preparati miscelando soluzioni gradualmente diluite di nanoparticelle MC2 (0,35-2,1  $\mu$ g Fe/ $\mu$ l) disperse in volumi differenti (5-50  $\mu$ l). Il tempo di rilassamento  $T_2$  dei campioni è stato misurato attraverso l'impiego di una sequenza m\_msme (multislice-multiecho).

### **Preparazione liposomi con complesso di Disprosio incapsulato**

I liposomi sono stati preparati con il metodo della reidratazione/estrazione del film. In breve, il film è stato preparato sciogliendo in cloroformio (Sigma-Aldrich, Italia) 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicerolo-3-fosfatidilcolina (POPC), colesterolo e 1,2 di-stearoil-sn-glicerolo-fosfoetanolamina-N-[metossi(polietilenglicole) 2000] sale ammonico (DSPE-PEG-2000) (Avanti Polar Lipids, Alabama, USA) con la seguente percentuale molare: 55% POPC, 40% colesterolo e 5% DSPE-PEG-2000. Il solvente è stato rimosso all'evaporatore rotante (Stuart RE300, Bibby Scientific Italia S.r.l., Italia) ed il film è stato reidratato con una soluzione del complesso Disprosio HPDO3A (LIMA, Bioindustry Park, Ivrea) 200mM e 300mOsm in tampone HEPES (Sigma-Aldrich, Italia) a pH fisiologico. In seguito il liposoma è stato estruso a 55 °C con l'impiego di un estrusore Lipex (Northern Lipids Inc., Canada). Infine il

liposoma risultante è stato lasciato in dialisi per 24 h e le sue dimensioni analizzate al DLS (Malvern instruments, UK). La concentrazione di disprosio all'interno del liposoma è stata calcolata tramite NMR (Bruker AVANCE 600 MHz) con il metodo Evans, una tecnica specifica per la determinazione della concentrazione di composti paramagnetici in soluzione [93]. In breve la concentrazione del campione, posto in un tubo NMR coassiale in una miscela di acqua deuterata e 2-metil-2-propanolo (Sigma-Aldrich, Italia), viene calcolata in base allo shift del segnale del 2-metil-2-propanolo dovuto alla suscettibilità magnetica bulk (BMS). Due phantoms per l'analisi MRI sono stati preparati miscelando gel di agar (1%) con i liposomi caricati con il complesso paramagnetico in un caso e con il complesso libero nel secondo.

### **Sequenza IRON e cell labeling**

La sequenza IRON modificata è stata impiegata per analizzare in vitro phantoms preparati con macrofagi labellati con le particelle MC2 in gel di agar (1%). I macrofagi J774.A1 sono stati seminati in un terreno DMEM addizionato con 10% di FBS, penicillina, streptomina e 2 mM glutammina (vedi materiali e metodi capitolo II). Al terreno sono state aggiunte le MC2 con una concentrazione di ferro nel terreno pari a 100 µg/ml. Dopo 1h di incubazione a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>, le cellule sono state staccate, lavate accuratamente con PBS, contate al microscopio ottico e miscelate con il gel di agar per l'analisi MRI.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

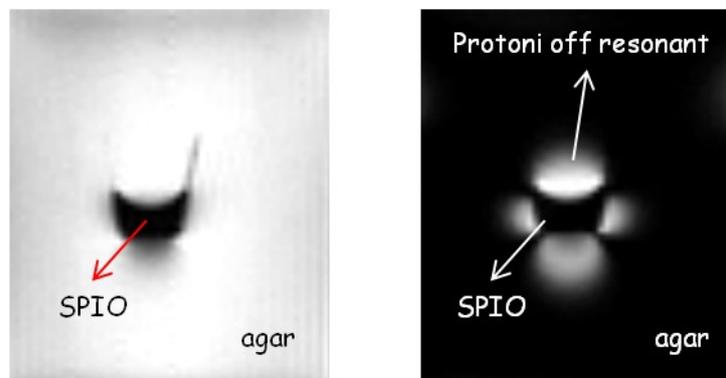
### **Ottimizzazione della Sequenza IRON modificata**

Numerose analisi sono state effettuate per cercare di ottimizzare la sequenza IRON. Nella tabella è riportato un sommario del miglior fitting possibile tra tutti i parametri, strettamente correlati fra loro, del pulso di saturazione: forma, potenza, larghezza di banda BW, durata, numero di pulsii e durata totale. Questi valori sono necessari per ottenere buoni risultati in termini di contrasto positivo e saturazione o soppressione del segnale.

**Tabella1. Valori ottimali per i parametri del pulso di saturazione.**

Forma	Potenza $\mu\text{T}$	BW Hz	durata ms	Numero di puls	Durata totale ms
block	1,5-3	1.3	1000	1	1000
sinc3	1,5-3	99.4	62.5	32	2000
gauss	1,5-3	2.75	1000	1	1000

La Figura 5 mostra l'efficacia della sequenza messa a punto. A sinistra è riportata l'immagine MRI acquisita con la normale sequenza RARE (senza pulso di saturazione), che evidenzia la presenza del normale contrasto negativo causato dalle particelle SPIO MC2. A destra invece, è mostrata l'immagine ottenuta con la sequenza IRON modificata, che mette in evidenza la presenza di contrasto positivo intorno alle particelle (aree di segnale iperintenso), dovuto ai protoni off resonant. Si può notare come la forma dell'area di segnale positivo rispecchi la forma del disturbo esterno al campo magnetico generato dalle particelle SPIO (Figura 1).

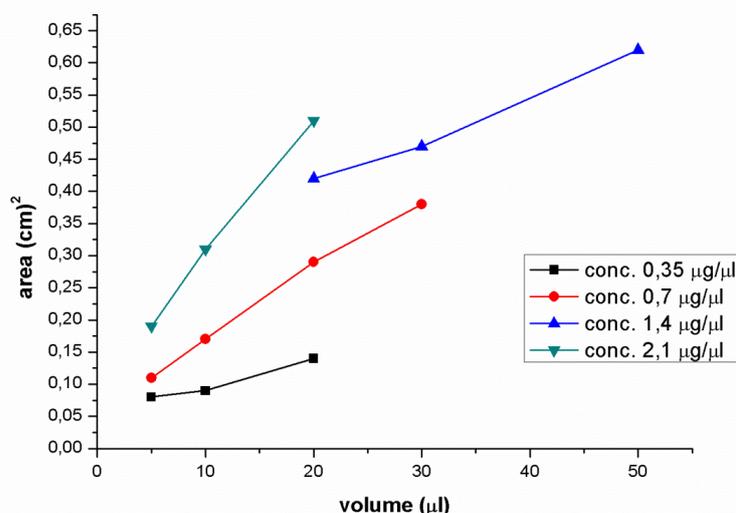


**Figura 5. Immagini relative al phantom preparato con le particelle MC2, acquisite con una sequenza RARE (a sinistra) e la sequenza IRON (a destra).**

Il pulso con la forma block è stato quello che ha dato i migliori risultati in termini di soppressione del segnale rispetto alla forma sinc3 e gauss. Infatti applicato con una potenza di  $3\mu\text{T}$  è stato in grado di saturare una BW di 280 Hz contro i 160 e 140 Hz dei puls sinc3 e gauss rispettivamente.

### Sequenza IRON, concentrazione ferro e volume di dispersione.

Gli esperimenti MRI eseguiti sui phantoms preparati con soluzioni a differente concentrazione di ferro (0,35-2,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) e volume di dispersione (5-50  $\mu\text{l}$ ), hanno evidenziato come l'area con segnale positivo (espressa in  $\text{cm}^2$  e calcolata sulle ROIs disegnate manualmente con il software ParaVision) è direttamente proporzionale sia alla concentrazione che al volume delle soluzioni, come del resto ci si aspettava ( Figura 6 ).

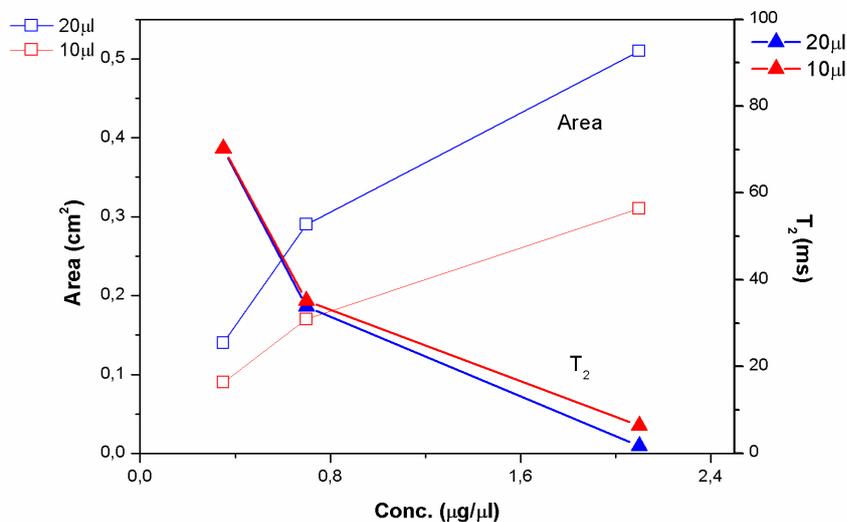


**Figura 6. Grafico con volume di dispersione in ascissa versus area di segnale positivo in ordinata per soluzioni a differente concentrazione di Fe ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )**

### Area, concentrazione e $T_2$

Nell'analisi dei dati si è voluto investigare su come il tempo di rilassamento  $T_2$  influenzi il contrasto positivo. Nel grafico mostrato in Figura 7 sono riportati insieme : area di segnale positivo, concentrazione del ferro nelle soluzioni e corrispondente valore di  $T_2$  per due differenti volumi di dispersione (10 e 20  $\mu\text{l}$ ). Le linee solide sono riferite ai valori di  $T_2$ , mentre quelle vuote ai valori delle aree. Come si vede le curve di  $T_2$  sono molto simili per i campioni dispersi in 10 e 20  $\mu\text{l}$ , poiché il tempo di rilassamento trasversale dipende direttamente e in maniera preponderante dalla concentrazione di ferro, piuttosto che dal volume della soluzione. Dall'analisi del grafico risulta chiaro come all'aumentare della concentrazione di ferro e di conseguenza al diminuire del corrispondente valore di  $T_2$ , aumenti l'area di segnale

positivo. Questi dati inoltre, confermano ulteriormente l'importanza del fattore volume sul contrasto positivo.

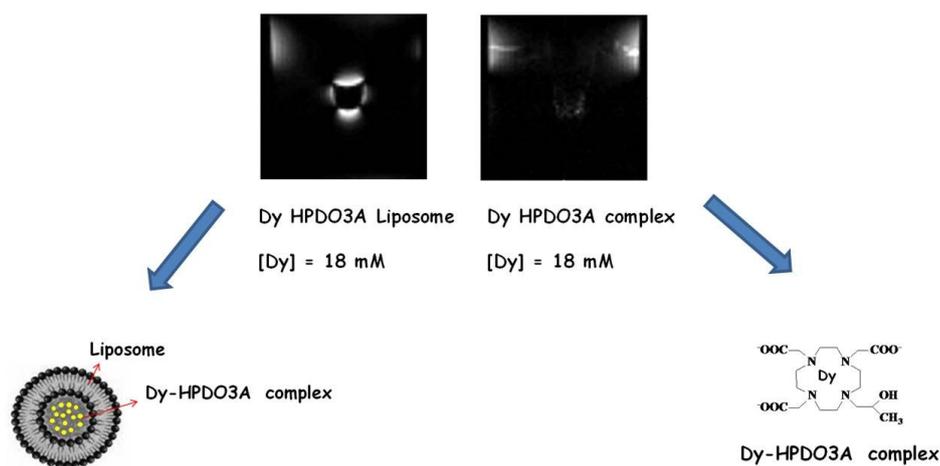


**Figura 7. Grafico con area di segnale positivo, concentrazione di ferro, valori di T<sub>2</sub> per due differenti volumi di dispersione (10 e 20 µl).**

### IRON e liposomi

L'analisi al DLS ha dimostrato come i liposomi, preparati incapsulando al loro interno il complesso paramagnetico Disprosio HPDO3A, possiedono un diametro idrodinamico medio di 158 nm ± 7 nm con un ottimo indice di polidispersione (PDI) pari a 0,1. Questo a dimostrazione dell'uniformità di distribuzione dimensionale dei liposomi. La concentrazione di Disprosio presente al loro interno, calcolata con il metodo Evans, è risultata essere uguale a 18 mM. Come descritto in precedenza uno degli obiettivi di questo progetto era quello di valutare la possibilità di estendere l'applicazione della sequenza IRON ai liposomi caricati con complessi paramagnetici. In Figura 8 sono riportate le immagini acquisite con la sequenza IRON modificata : a sinistra è mostrata l'immagine relativa al phantom preparato con il complesso di Disprosio incapsulato nel liposoma, a destra invece quella relativa al phantom con il complesso libero (entrambi i campioni possiedono la stessa concentrazione di disprosio [18 mM]). Si nota come l'effetto positivo sia presente solo per il complesso incapsulato all'interno dei liposomi (il segnale positivo presente ai bordi delle immagini non è da considerare, poiché causato da piccole inomogeneità del campo di natura strumentale). Questo avviene poiché

l'incapsulazione e la compartimentalizzazione di ioni metallici con un grande momento magnetico, come nel caso del Disprosio, non solo causa una forte riduzione del  $T_2$  ma genera anche un disturbo esterno al campo magnetico, in maniera del tutto simile alle particelle SPIO. Questo fenomeno è necessario e più rilevante della riduzione del  $T_2$  per ottenere il contrasto positivo.



**Figura 8. Immagini IRON del complesso di Disprosio incapsulato nei liposomi (sinistra) e del complesso libero (destra)**

### Sequenza IRON e cell labeling

Come descritto in precedenza, esperimenti di cell labeling sono stati eseguiti incubando macrofagi con le particelle MC2 (100  $\mu\text{g/ml}$ ) per 1 h. Al termine del periodo di incubazione le cellule labellate (1 milione) sono state utilizzate per preparare il phantom. In Figura 9 è riportata l'immagine ottenuta applicando la sequenza IRON modificata : l'area di segnale iperintenso è presente anche con le particelle internalizzate all'interno della cellula. L'effetto di contrasto positivo è favorito dalla compartimentalizzazione all'interno delle cellule.



**Figura 9. Immagine IRON dei macrofagi labellati con MC2.**

## CONCLUSIONI

In quest'ultima parte del progetto di ricerca la sequenza MRI IRON è stata studiata ed ottimizzata in termini di forma, potenza, durata e larghezza di banda del pulso di saturazione. Questa sequenza è stata ideata recentemente per ottenere contrasto positivo con le SPIO. I risultati preliminari suggeriscono che il contrasto positivo generato dalle SPIO dipende, in maniera preponderante, dal disturbo che esse creano al campo magnetico applicato, più che dall'effetto di riduzione del tempo di rilassamento  $T_2$  (anche se i due fenomeni sono strettamente correlati). Un ruolo rilevante su questo fenomeno è svolto anche dal volume occupato dalle soluzioni di particelle. La dimostrazione della possibilità di estendere questo approccio ai complessi di metalli paramagnetici incapsulati all'interno di liposomi, risulta essere molto interessante poiché accresce notevolmente le possibili applicazioni future nel settore del drug delivery. Infatti, l'accumulo di liposomi (caricati con farmaci e agenti di contrasto) in un particolare tessuto o organo potrebbe essere monitorato in vivo tramite contrasto positivo o negativo a seconda delle esigenze e delle caratteristiche del tessuto stesso. Inoltre, provocando la rottura dei liposomi tramite stimoli esogeni, come ultrasuoni e temperatura o endogeni, come pH ed attività enzimatica, potrebbe essere possibile visualizzare il rilascio di farmaco. Ad esempio, in un'ipotetica applicazione si potrebbe scegliere di visualizzare l'accumulo nel fegato dei liposomi caricati con complessi di lantanidi (o con particelle SPIO) tramite contrasto negativo (o positivo tramite IRON), e poi confermare il rilascio di farmaco grazie al contrasto positivo (o negativo) generato dal simultaneo rilascio dell'agente positivo (o negativo).

## CONCLUSIONI GENERALI

In questo lavoro di ricerca sono state applicate e messe a punto diverse metodiche per la sintesi di nanoparticelle SPIO come agenti di contrasto MRI per applicazioni in campo biomedico e farmaceutico. Particolare attenzione è stata rivolta allo sviluppo e alla caratterizzazione di particelle di magnetite con un coating organico di acido citrico. Queste particelle sono state impiegate come struttura base per la realizzazione di ulteriori processi di funzionalizzazione con altri coating polimerici (APTES, dendrimeri PAMAM). Le caratterizzazioni effettuate hanno dimostrato l'esito positivo delle reazioni di sintesi, così come le analisi MRI hanno testimoniato la possibilità di utilizzare le particelle SPIO sintetizzate come agenti di contrasto negativi. Questo aspetto è stato ulteriormente confermato attraverso l'impiego delle particelle SPIO con coating di acido citrico in diverse applicazioni in campo biologico. In questo senso gli esperimenti di labeling cellulare, eseguiti con cellule staminali mesenchimali e macrofagi murini, hanno dimostrato il profilo non citotossico delle particelle SPIO e il preservarsi della loro capacità di fungere da agenti di contrasto MRI anche dopo l'uptake cellulare. Particolarmente interessante risulta il fatto che l'internalizzazione delle SPIO da parte delle cellule non ha influenzato in maniera negativa le normali funzioni biologiche e fisiologiche (capacità di differenziamento delle cellule staminali). Le analisi preliminari svolte somministrando le particelle a dei modelli murini hanno dato risultati incoraggianti per future applicazioni in vivo. Infine lo studio e l'ottimizzazione della sequenza MRI definita IRON, hanno fornito l'opportunità di ottenere contrasto positivo a partire dalle particelle SPIO sia su phantoms che a livello cellulare, bypassando così alcuni svantaggi connessi con il contrasto negativo. La dimostrazione della possibilità di estendere questo approccio ai liposomi caricati con complessi paramagnetici, porta all'opportunità di poter utilizzare questi sistemi nanovesicolari come agenti  $T_1$  (positivi), agenti  $T_2$  (negativi) o entrambi a seconda delle esigenze. Inoltre si potrebbe coniugare tutto ciò con le ben note caratteristiche di biocompatibilità e versatilità come sistemi di drug delivery dei liposomi per monitorare tramite MRI il rilascio di farmaci o per studiare carriers sito specifici.

## RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare la Prof.ssa Gavini e il Prof. Giunchedi per avermi dato l'opportunità di svolgere il Dottorato.

La Porto Conte Ricerche s.r.l. nelle persone del Prof. Uzzau e della Dott.ssa Roggio per la possibilità concessami di effettuare buona parte di questo progetto di ricerca presso i laboratori da loro coordinati. Ringrazio inoltre la Dott.ssa Fresu per la sintesi dei polimeri di natura dendrimerica, il Dott. Piccinini per la caratterizzazione FTIR, la Dott.ssa Addis ed il Dott. Pisanu per avermi insegnato la tecnica SDS-PAGE e tutti i colleghi con cui ho condiviso due anni di lavoro.

Il Prof. Aime direttore del Molecular Imaging Center (CIM) dell'Università degli Studi di Torino, per la splendida accoglienza riservatami durante l'ultimo anno del mio percorso di Dottorato. Tutti i dipendenti del CIM (strutturati, dottorandi, studenti ecc.) ed in particolare il Dott. Dastrù per gli utili consigli strumentali e le sempre gradite discussioni calcistiche, Giorgio e Miklos per i bei momenti passati insieme e Giuseppe per il grande e spassionato aiuto negli esperimenti di cell labeling sui macrofagi e per aver condiviso con me l'esperienza di due congressi scientifici. Ma più di tutti ringrazio il Prof. Terreno, o come preferisco chiamarlo io Enzo, raramente mi è capitato di lavorare con una persona di tale valore scientifico ed umano, nella speranza di future e sempre più fruttuose collaborazioni.

Il Dott. Anedda, o meglio, Roberto per avermi introdotto nel mondo della risonanza magnetica e per aver sempre difeso in prima persona questo lavoro di dottorato contro tutto e contro tutti. Mi viene difficile pensarlo come capo o collega, più semplicemente lo vedo come amico e come compagno per le prossime sfide lavorative che ci attendono.

Ringrazio mio padre esempio e faro della mia vita, che anche in quest'occasione mi ha insegnato ad andare avanti anche nei momenti più difficili. Mia madre che nonostante il mio carattere mi vuole ogni giorno più bene, e che mi ha insegnato

l'importanza dell'onestà e della lealtà, valori imprescindibili per chi cerca di fare ricerca scientifica. Mia sorella per la gioia che mi dà ogni volta che la vedo.

Ed infine Simona, senza di lei questo lavoro non sarebbe stato possibile. Grazie per avermi sempre incoraggiato e per aver creduto in me e nelle mie capacità anche quando nemmeno io ci riuscivo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Kuperman V. Magnetic Resonance Imaging physical principles and applications . Academic press, 2000.
2. Landini L., Positano V., Santarelli M. Advance image processing in magnetic resonance imaging. Taylor & Francis Group, 2005.
3. Hashemi R.H., Bradley W. G. Jr., Lisanti C. J., MRI The Basics. Lippincott Williams &Wilkins, 2010.
4. Prasad P. V., Magnetic resonance imaging: methods and biologic applications. Humana Press, 2006.
5. Modo M. M. J., Bulte J. W. M. Molecular and Cellular MR imaging. CRC Press, 2007.
6. Silverstein R. M., Webster F. X. Identificazione Spettroscopica di Composti Organici. CEA, 1999.
7. Derome A. Modern NMR Techniques for Chemistry Research. Pergamon press, 1987.
8. Levitt M.H. Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance. Wiley, 2008.
9. Hornak J.P. The Basics of MRI. <http://www.cis.rit.edu> Copyright © 1996-2009.
10. Bernstein M.A., King K. F., Zhou X. J. Handbook of MRI Pulse Sequences. Elsevier, 2004.
11. McRobbie D. W., Moore E. A., Graves M. J., Prince M. R. MRI from Picture to Proton Cambridge, 2006.
12. Rinck P.A. Magnetic Resonance in Medicine. ABW Wissenschaftsverlag, 2003.
13. Weissleder R., Ross B. D., Rehemtulla A., Gambhir S. S. Molecular Imaging Principles and Practice, PMPH-USA, 2010.
14. Caravan P. Strategies for increasing the sensivity of gadolinium based MRI contrast agents. Chem. Soc. Rev., 2006, 35, 512-523.

15. Coroiu I. Relaxivities of different superparamagnetic particles for application in NMR tomography. *J. Magn. Magn. Mater.*, 1999, 201, 449-452.
16. Misselwitz B., Schmitt-Willich H., Ebert W., Frenzel T., Weinmann H. J. Pharmacokinetics of Gadomer-17, a new dendritic magnetic resonance contrast agent. *Magn. Reson. Mater. Phys.*, 2001, 12, 128-134.
17. Aime S., Delli Castelli D., Lawson D., Terreno E. Gd-Loaded Liposomes as T1, Susceptibility, and CEST Agents, All in One, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 2430-2431.
18. Aime S., Botta M., Terreno E. Gd (III) – based contrast agents for MRI. *Adv. Inorg. Chem.*, 2005, 57, 173-237.
19. Lauffer R. B. Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging: theory and design. *Chem. Rev.*, 1987, 87, 901–927.
20. Aime S., Botta M., Fasano M., Terreno E. Lanthanide(III) chelates for NMR biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.*, 27, 1998, 19-29.
21. Neuberger T., Schöpfa B., Hofmann H., Hofmann M., von Rechenberg B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *J. Magn. Magn. Mater.*, 2005, 293, 483–496.
22. Jung C.W., Jacobs P. Physical and chemical properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents-ferumoxides, ferumoxtran, ferumoxil. *Magn. Reson. Imaging*, 1995, 13, 661-674.
23. Cornell RM, Schertmann U. The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrence and uses. WCH publishers, 1996.
24. Fauconnier N., Bee A., Roger J., Pons JN. Synthesis of aqueous magnetic liquids by surface complexation of maghemite nanoparticles. *J. Mol. Liq.*, 1999, 83, 233-242.
25. Tadmor R., Rosensweig RE, Frey J, Klein J. Resolving the puzzle of ferrofluid dispersants. *Langmuir*, 2000, 16, 117-120.
26. Gupta A. K., Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 2005, 26, 3995-4021.

27. Chen M., Yamamuro S., Farrel D., Majetich S. A. Gold coated iron nanoparticles for biomedical applications. *J. Appl. Phys*, 2003, 93, 7551-7553.
28. Bowen C.V., Zhang X., Saab G., Gareau P. J., Rutt B. K. Application of the static dephasing regime theory to superparamagnetic iron oxide loaded cells. *Magn. Reson. Med.*, 2002, 48, 52-61.
29. Roch A., Gossuin Y., Muller R. N., Gillis P. Superparamagnetic colloid suspensions : Water magnetic relaxation and clustering. *J. Magn. Magn. Mat.*, 2005, 293, 532-539.
30. Weissleder R., Mahmood U. Molecular Imaging. *Radiology*, 2001, 219, 316-333.
31. Heckl S., Pipkorn R., Nagele T., Vogel U., Kuker W., Voight, K. Molecular imaging: bridging the gap between neuroradiology and neurohistology. *Histol. Histopathol.*, 2004, 19, 651–668.
32. Weissleder R. Molecular imaging: exploring the next frontier *Radiology*, 1999, 212, 609–614.
33. Calvo B.F., Semelka R.C. Beyond anatomy: MR imaging as a molecular diagnostic tool. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, 1999, 8, 171–183.
34. Massoud T.F., Gambhir S. S. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev.*, 2003, 17, 545–580.
35. Artemov D. Molecular magnetic resonance imaging with targeted contrast agents. *J. Cell. Biochem.*, 2003, 90, 518–524.
36. Lorusso V., Pascolo L., Ferneti C., Anelli P.L., Uggeri F., Tiribelli C., Magnetic resonance contrast agents: from the bench to the patient. *Curr. Pharm. Design*, 2005, 11, 4079–4098.
37. Modo M., Hoehn M., Bulte J.W. Cellular MR imaging. *Mol. Imaging*, 2005, 4, 143–164.
38. Melia C. D., Rajabi-Siahboomi A. R., Bowtell R. W. Magnetic resonance imaging of controlled release pharmaceutical dosage forms. *Pharm. Sci. Technol. Today*, 1998, 1, 32–39.

39. Richardson J. C., Bowtell R. W., Mäder K., Melia C.D. Pharmaceutical applications of magnetic resonance imaging (MRI). *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2005, 57, 1191-1209.
40. Rudin M., Beckmann N., Porszasz R., Reese T., Bochelen D., Sauter A. In vivo magnetic resonance methods in pharmaceutical research: current status and perspectives. *NMR Biomed.*, 1999, 12, 69-97.
41. Chin A. B., Yaacob I. I. Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles via w/o microemulsion and Massart's procedure. *J. Mater. Process. Technol.*, 2007, 191, 235-237.
42. Albornoz, C., Jacobo, S. E. Preparation of a biocompatible magnetic film from an aqueous ferrofluid. *J. Magn. Magn. Mater.*, 2006, 305, 12-15.
43. Kimata M., Nakagawa D., Hasegawa M. Preparation of monodisperse magnetic particles by hydrolysis of iron alkoxide. *Powder Technol.*, 2003, 132, 112-118.
44. Martinez-Mera I., Espinosa M. E., Perez-Hernandez R., Arenas-Alatorre. Synthesis of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles without surfactants at room temperature. *J. Mater. Lett.*, 2007, 61, 4447-4451.
45. Jolivet J. P., Chaneac C., Tronc E. Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks. *Chem. Commun.*, 2004, 5, 477-483.
46. Sahoo Y., Goodarzi A., Swihart M. T., Ohulchanskyy T. Y., Kaur N., Furlani E. P., Prasad P. N. Aqueous Ferrofluid of Magnetite Nanoparticles: Fluorescence Labeling and Magnetophoretic Control. *J. Phys. Chem. B*, 2005, , 109, 3879-3885.
47. Babes L., Denizot B., Tanguy G., Le Jeune J. J., Jallet P. Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Used as MRI Contrast Agents: A Parametric Study. *J. Colloid Interface Sci.*, 1999, 212, 474-482.
48. Gupta A. K., Wells S. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *IEEE Trans. Nanobiosci.*, 2004, 3, 66-73.
49. Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Elst L. V., Muller R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization,

- Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.*, 2008, 108, 2064–2110.
50. Maity D., Agrawal D.C., Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media. *J. Magn. Mater.*, 2007, 308, 46-55.
  51. Radbruch A., B. Mechtold, Thiel A., Miltenyi S., Puger E. High-Gradient Magnetic Cell Sorting. *Methods Cell Biol.*, 1994, 42, 387-403.
  52. Pan B.F., Gao F., Gu H.C. Dendrimer modified magnetite nanoparticles for protein immobilization. *J. Colloid Interface Sci.*, 2005, 284, 1-6.
  53. Barie N., Rapp M., Sigrist H., Ache H. J. Covalent photolinker-mediated immobilization of an intermediate dextran layer to polymer-coated surfaces for biosensing applications. *Biosens. Bioelectron.*, 1998, 13, 855-860.
  54. Shen X.C., Fang X.Z., Zhou Y.H., Liang H. Synthesis and Characterization of 3-Aminopropyltriethoxysilane-Modified Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles. *Chem. Lett.*, 2004, 33, 1468.
  55. Can K., Ozmen M., Ersoz M., Immobilization of albumin on aminosilane modified superparamagnetic magnetite nanoparticles and its characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2009, 71, 154–159.
  56. Kneuer C., Sameti M., Haltner E. G., Schiestel T., Schirra H., Schmidt H., Lehr C. M. Silica nanoparticles modified with aminosilanes as carriers for plasmid DNA. *Int. J. Pharm.*, 2000, 196, 257-261.
  57. Schiestel T., Brunner H., Tovar G. E. M. Controlled Surface Functionalization of Silica Nanospheres by Covalent Conjugation Reactions and Preparation of High Density Streptavidin Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotech.*, 2004, 4, 504–511.
  58. Bhattacharya A. A., Curry S., Franks N. P. Binding of the General Anesthetics Propofol and Halothane to Human Serum Albumin: High Resolution Crystal. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275 , 38731-38738.
  59. Jevprasesphant R., Penny J., Attwood D., McKeown N.B., D'Emanuele A. Engineering of Dendrimer Surfaces to Enhance Transepithelial Transport and Reduce Cytotoxicity. *Pharmaceut. Res.*, 2003, 10, 1543-1550.

60. Duncan R., Izzo L. Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 2005, 57, 2215-2237.
61. Dendrimers for vaccine and immunostimulatory uses. A review. *Bioconjugate Chem.*, 2010, 21, 405-418.
62. [http:// www.panalytical.com](http://www.panalytical.com) Copyrights © 2011.
63. Merbach E. A., Toth E. The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging. Wiley, 2001.
64. Sun, X. C.; Nava N. Microstructure and Magnetic Properties of Fe(C) and Fe(O) Nanoparticles. *Nano Lett.*, 2002, 2, 765-769.
65. Pascal C., Pascal J. L., Favier F., Elidrissi Moubtassim M. L., Payen C. Electrochemical Synthesis for the Control of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticle Size. Morphology, Microstructure, and Magnetic Behavior. *Chem. Mater.*, 1999, 11, 141-147.
66. Miguel O. B., Gossuin Y., Morales M.P., Gillis P., Muller R.N., Veintemillas-Verdaguer S. Comparative analysis of the <sup>1</sup>H NMR relaxation enhancement produced by iron oxide and core-shell iron-iron oxide nanoparticles. *Magn. Reson. Imaging*, 2007, 25, 1437–1441.
67. Mailänder V., Landfester K. Interaction of Nanoparticles with Cells, Biomacromolecules, 2009, 10, 2379-2400.
68. Bulte J., Long C. In vivo tracking of cellular therapeutics using magnetic resonance imaging. *Expert Opin. Biol. Ther.* , 2009, 9, 293-306.
69. Miltenyi, S. CD34+ Selection: The Basic Component for Graft Engineering. *Oncologist*, 1997, 2, 410–413.
70. Bulte J., Kraitchman D. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed.*, 2004, 17, 484-499.
71. Weissleder R. Liver MR imaging with iron oxides: toward consensus and clinical practice. *Radiology*, 1994, 193, 593–595.
72. Dousset V, Ballarino L, Delalande C, Coussemacq M, Canioni P, Petry KG, Caille JM. Comparison of ultrasmall particles of iron oxide (USPIO)-enhanced T2-weighted, conventional T2-weighted, and gadolinium-enhanced T1-weighted MR images in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am. J. Neuroradiol.*, 1999, 20, 223–227.

73. Harisinghani M. G, Barentsz J, Hahn P. F., Deserno W. M. , Tabatabaei S., van de Kaa C. H., de la Rosette J., Weissleder R. Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *New Engl. J. Med.* 2003, 348, 2491–2499.
74. Berman S. M. C., Walczak P., Bulte J. W. M. Tracking stem cells using magnetic nanoparticles. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.*, 2011, 4, 343–355.
75. Muller-Sieburg C. E, Deryugina E. The stromal cells' guide to the stem cell universe. *Stem Cell.*, 1995, 13, 477–486.
76. Grove J. E., Bruscia E., Krause D. S. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells*, 2004, 22, 487–500.
77. Morrison S. J., Shah N. M. , Anderson D. J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, 1997, 88, 287– 298.
78. Shambloott M. J., Axelman J., Wang S., Bugg E. M., Littlefield J. W., Donovan P. J., Blumenthal P. D., Huggins G. R., Gearhart J. D. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* ,1998, 95, 13726–13731.
79. Muraglia A., Cancedda R., Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J. Cell Sci.*, 2000, 113, 1161–1166.
80. Janeway C., Travers P., Walkport M., Shlomchik M. *Immunobiology.* Garland Science Churchill Livingstone, 2005.
81. Pier G.B., Lyczak J.B., Wetzler L.M. *Immunologia, Infezione, Immunità.* Piccin, 2006.
82. Freshney R.I., *Culture of Animal Cells*, Wiley, 2005.
83. Rad A.M., Arbab A. S, Iskander A. S. M., Jiang Q., Soltanian-Zadeh H. Quantification of Superparamagnetic Iron Oxide (SPIO)-Labeled Cells Using MRI. *JMRI* , 2007, 26, 366–374.
84. Wang L., Deng J., Wang J., Xiang B., Yang T., Gruwel M., Kashour T., Tomanek B., Summer R., Freed D., Jassal D. S., Dai G., Glogowski M., Deslauries R., Arora R. C., Tian G. Superparamagnetic iron oxide does not affect the viability and function of adipose-derived stem cells, and

- superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging identifies viable cells. *Magn. Reson. Imaging*, 2009, 27, 108-109.
85. Kostura L., Kraitchman D. L., Mackay A. M., Pittenger M. F., Bulte J. W. M. Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis.
  86. Schäfer R., Bantleon R., Kehlbach R., Siegel G., Wiskirchen J., Wolburg H., Kluba T., Eibofner F., Northoff H., Claussen C., Schlemmer H. P. Functional investigations on human mesenchymal stem cells exposed to magnetic fields and labeled with clinically approved iron nanoparticles. *BMC Cell Biology*, 2010, 11, 1-7.
  87. Beduneau A., Ma Z., Grotepas C. B., Kabanov A., Rabinow B.E., Gong N., Mosley R. L., Dou H., Boska M. D., Gendelman H. E. Facilitated Monocyte-Macrophage Uptake and Tissue Distribution of Superparamagnetic Iron-Oxide Nanoparticles. *PLoS ONE*, 2009, 4, 1-12.
  88. Cunningham C. H., Arai T., Yang P. C., McConnell M. V., Pauly J. M., Conolly S.M. Positive Contrast Magnetic Resonance Imaging of Cells Labeled with Magnetic Nanoparticles. *Magn. Reson. Med.*, 2005, 53, 999–1005.
  89. Zurkiya O., Hu X.. Off-Resonance Saturation as a Means of Generating Contrast With Superparamagnetic Nanoparticles. *Magn. Reson. Med.*, 2006, 56, 726–732.
  90. Stuber, M., Gilson, W.D., Schär M., Kedziorek D.A., Hofmann L.V., Shah S., Jan Vonken E., Bulte J. W. M., Kraitchman D. L. Positive Contrast Visualization of Iron Oxide-Labeled Stem Cells using Inversion-Recovery With ON-Resonant Water Suppression (IRON). *Magn. Reson. Med.*, 2007, 58, 1072–1077.
  91. Torchilin V.P., Weissig V. *Liposomes*. Oxford university press, 2003.
  92. Allen T.M., *Liposomal Drug Formulations: Rationale for Development and What We Can Expect for the Future*. *Drugs*, 1998, 56, 747-756.
  93. Corsi D.M., Platas-Iglesias C., van Bekkum H., Peters A. J. Determination of paramagnetic lanthanide (III) concentrations from bulk magnetic susceptibility shifts in NMR spectra. *Magn. Reson. Chem.*, 2001, 39, 723-726.