



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE**

**Facoltà di Ingegneria**

---

**Corso di Laurea in Ingegneria Biomedica**

**Aspetti termofluidodinamici del drug delivery basato su campi magnetici**

**Thermo-fluid dynamic aspects of drug delivery based on magnetic fields**

**Relatore:**

**Ing. Valerio D'Alessandro**

**Tesi di Laurea di:**

**Davide Laviani**

**Anno accademico 2023/2024**

---

INDICE.....	pag.1
1. INTRODUZIONE.....	pag.4
2. CENNI TEORICI.....	pag.5
2.1. LAMINARE E FLUSSO TURBOLENTO.....	pag.5-6
2.2. EMODINAMICA.....	pag.6-7
2.3. IPERTERMIA MAGNETICA.....	pag.7-8
3. MICROSCOPIA DI LORENTZ PER DESCRIZIONE DI CAMPI MAGNETICI DI NP E TEM.....	pag.9-11
4. SINTESI DI NANOPARTICELLE $Fe_3O_4$ .....	pag.12-13
5. MISURAZIONE DEI PARAMETRI DI IPERTERMIA MAGNETICA.....	pag.14-16
5.1. MISURAZIONE SPA.....	pag.16-18
6. NANOPARTICELLE MAGNETICHE.....	pag.18
6.1. CLASSIFICAZIONE DEI NANOVETTORI MAGNETICI.....	pag.18-19
6.2. SPION.....	pag.19-20
6.3. NP D'ORO.....	pag.20
6.4. NP DI SILICE.....	pag.20-21
6.5. MNP CORE-SHELL.....	pag.21-22
6.6. NANOIDROGEL.....	pag.22-23
6.7. NANOSFERE.....	pag.23
6.8. NANOMATERIALI POROSI.....	pag.23-24

6.9. MICELLE POLIMERICHE.....	pag.24
7. RISULTATI DI INTERESSE IN VITRO E IN VIVO DELLE MNP RIVESTITE CON POLISACCARIDI E POSSIBILI LORO APPLICAZIONI.....	pag.25-32
7.1. RISULTATI DI INTERESSE E DESCRIZIONE DELLE MNP RIVESTITE CON CHITOSANO.....	pag.32-42
7.2. RISULTATI DI INTERESSE E DESCRIZIONE DELLE NP RIVESTITE DI ALGINATO.....	pag.42-48
7.3. RISULTATI DI INTERESSE E DESCRIZIONE DELLE NP RIVESTITE CON HA.....	pag.48-51
7.4. RISULTATI DI INTERESSE DELLE NP RIVESTITE CON DESTRANO.....	pag.51-52
7.5. RISULTATI DI INTERESSE E DESCRIZIONE DELLE NP INCAPSULATE CON DERIVATI DI CELLULOSA.....	pag.52-56
7.6. RISULTATI DI INTERESSE E DESCRIZIONE DELLE NP RIVESTITE CON AMIDO.....	pag.56-61
7.7. RIASSUNTO DI ALCUNI RISULTATI IN VITRO E IN VIVO DELLE MNP CON ALTRI TIPI DI NUCLEI, GUSCI E FORME.....	pag.61-68
7.8. RIASSUNTO DI ALCUNI RISULTATI DI NP PER TERAPIA FOTOTERMICA.....	pag.69
8. INTRODUZIONE ALLA MODELLAZIONE MATEMATICA DEL TRASPORTO OTTIMALE.....	pag.70-71
8.1. FLUSSO DEL FLUIDO.....	pag.72
8.2. AVVEZIONE, DIFFUSIONE E ADESIONE DELLE MNP.....	pag.73-74
8.3. CONVEZIONE E DIFFUSIONE DEL CALORE.....	pag.74-76
8.4. CONFRONTO TRA MODELLO SVILUPPATO DI RECENTE E QUELLO DI PENTA ED AL SARIRI NEL 2022.....	pag.76
9. CONCLUSIONE.....	Pag.77-78

10. BIBLIOGRAFIA..... pag.78-81

## 1. INTRODUZIONE

Le neoplasie, sono delle patologie abbastanza diffuse in tutto il mondo. In Italia, dal punto di vista della ricerca scientifica viene trattata in modo abbastanza importante la branca medica dell'oncologia. Un esempio è la famosa AIRC ovvero Associazione Italiana Ricerca sul Cancro. Ci sono tantissimi istituti di ricerca in merito a tutto ciò. Negli anni sono stati sviluppati diversi tipi di trattamenti per diminuire la massa dei tumori solidi per poi asportarli con la chirurgia e rimuoverli in maniera definitiva, ove possibile, dal corpo umano dei pazienti. Non si nasconde che ancora oggi, la maggior parte delle volte i farmaci che vengono utilizzati per diminuire la massa dei tumori solidi dai dottori e le dottoresse di oncologia sono dei chemioterapici in forma libera, anche in Italia e non solo, con l'approccio classico della chemioterapia sistemica. In questa categoria di farmaci sono presenti vari tipi di chemioterapici. Le tecniche di rimozione ed ablazione chirurgica sono classificabili in diverse categorie. La problematica di somministrazione efficiente dei farmaci chemioterapici risulta ancora aperta. Infatti, la loro diversificazione in funzione della neoplasia da trattare così come la loro tossicità a lungo termine e le possibili reazioni messe in atto dalle cellule tumorali rendono il problema estremamente complesso. Le moderne tecniche di diagnosi: (i) risonanza magnetica (RM) con e senza mezzo di contrasto; (ii) la tomografia assiale computerizzata (TAC) hanno permesso di accelerare i tempi di diagnosi rispetto al passato in modo da permettere l'applicazione di terapie efficaci. Ad oggi la quantità di tumori curabili, purché diagnosticati in fase opportuna, è enormemente aumentata. Tuttavia, esistono ancora forme tumorali non curabili. Alcuni esempi di quelli che sono diventati debellabili sono: il tumore al seno, tumore al cervello (glioblastoma), tumore al colon retto, tumore alla prostata, tumore al collo dell'utero. Altri esempi di neoplasie che non sono ancora oggi debellabili ovvero definitivamente asportabili dal corpo umano sono: tumore al pancreas, tumore al fegato, in più l'NSCLC ossia non small cells lung cancer (cancro al polmone non a piccole cellule) è una forma di cancro molto aggressivo. L'obbiettivo di questa di tesi è analizzare le moderne tecniche di drug delivery ossia di rilascio controllato di farmaci mediante l'utilizzo dei campi magnetici esterni. In particolare, verranno presi in considerazione gli aspetti termofluidodinamici (TFD) delle tecniche di rilascio. Nello specifico ci si è concentrati sull'utilizzo di nanoparticelle (NP) sferiche di materiale avente proprietà magnetiche.

Tali nanoparticelle magnetiche (MNP) se introdotte nel corpo di interesse, per via endovenosa, vengono veicolate dall'esterno con un campo magnetico ad intensità controllato e non nocivo per le persone, fino al raggiungimento del tumore solido dove rilasceranno il farmaco in questione. Gli aspetti termo fluidodinamici di cui parlerò a loro volta avranno l'obbiettivo di illustrare equazioni di fisica allo scopo di analizzare la dinamica di queste particelle all'interno dei vasi sanguigni. Queste MNP sono di recente sviluppo. Infatti si è iniziato a prendere in considerazione il possibile utilizzo di questo metodo di drug delivery già nel 2010 a Roma, nella decima conferenza internazionale sui materiali nano strutturati (Nano 2010) tenuta presso il consiglio nazionale delle ricerche ovvero il CNR e nell'Università di Roma "La Sapienza".

## 2. CENNI TEORICI

Vengono riportati dei concetti generali della termofluidodinamica che possono essere utili per trattare gli aspetti delle MNP utilizzate per il drug delivery con campi magnetici, ovvero: flusso laminare e turbolento di un fluido, emodinamica, ipertermia magnetica (MHT, magnetic hypertermia).

### 2.1 FLUSSO LAMINARE E FLUSSO TURBOLENTO

Un flusso laminare è costituito da un moto ordinato in cui il fluido sembra scorrere strato su strato. In altri termini la componente della velocità ortogonale alla direzione prevalente del flusso è trascurabile. Si ha nel caso di fluidi viscosi a bassa velocità ovvero in un flusso lungo una superficie in prossimità del bordo di attacco.

Un flusso turbolento è un flusso altamente disordinato con fluttuazioni di velocità, con componenti trasversali non trascurabili che danno luogo ad un moto vorticoso. Si ha quando i flussi hanno alte velocità ed è prevalente nei flussi interni a canali lunghi.

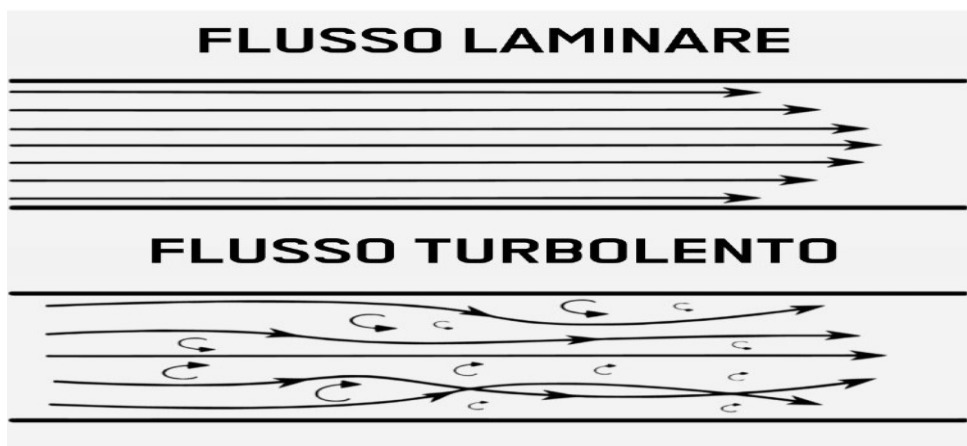


Fig. 2.1.1 viene fatta vedere in sostanza la differenza tra un flusso laminare e un flusso turbolento

Il parametro fondamentale per la determinazione del regime del flusso, ossia stabilire se il flusso di un liquido è laminare o turbolento è il numero di Reynolds. Esso è una grandezza adimensionale. Dal punto di vista della fisica dei fluidi viene rappresentato in questo modo:

$$Re = \frac{\rho \omega L}{\mu} = \frac{\omega L}{\nu}$$

dove  $\omega$  è la velocità del flusso indisturbato,  $\rho$  è la densità del fluido ( $\text{Kg}/\text{m}^3$ ),  $\mu$  è la viscosità dinamica ( $\text{Kg}/\text{m}\cdot\text{s}$  oppure  $\text{Pa}\cdot\text{s}$ ) e  $\nu = \frac{\mu}{\rho}$  ( $\frac{\text{m}^2}{\text{s}}$ ) ed è la viscosità cinematica del fluido ed  $L$  (m) è la lunghezza caratteristica del fenomeno considerato

Per ogni geometri può essere determinato un numero di Reynolds critico:

$$Re_{crit} = \frac{\rho \omega L_{crit}}{\mu} = \frac{\omega L_{crit}}{\nu}$$

tale che quando abbiamo  $Re < Re_{crit}$  allora possiamo dire che il flusso è laminare, quando invece abbiamo  $Re > Re_{crit}$  il flusso è turbolento.  $L_{crit}$  è la distanza dal bordo di attacco in cui si può ritenere che avvenga la transizione da flusso laminare a flusso turbolento. Per flusso su lastra piana  $L_{crit} = 5 \times 10^5 m$ . Si osserva che il valore al numeratore dipende da forze inerziali mentre quello del denominatore dipende dalle forze viscosse. Per un flusso forzato all'interno di un condotto, il Re è dato da:

$$Re_D = \frac{wD}{\nu} = \frac{4\dot{m}}{\pi\mu D}$$

Dove  $\dot{m}$  è la portata massica del fluido,  $w$  è la velocità media nella sezione considerata,  $D$  è il diametro del tubo,  $\mu$  è la viscosità dinamica del fluido,  $\nu$  è la viscosità cinematica del fluido come è stata descritta sopra.

Per condotti non cilindrici  $D = 4A/p$ , dove  $A$  è l'area trasversale della sezione del condotto e  $p$  è il perimetro della sezione.

Per cui grazie al Numero di Re possiamo stabilire il regime di flusso di un fluido in un tubo a sezione circolare. Si può assumere che per valori di  $Re < 2300$  il flusso è laminare con una sezione del tubo pari a  $L_{ingr,idr} = 0.05 D Re_D$ , per  $2300 < Re < 4000$  il flusso attraversa il regime di transizione e per  $Re > 4000$  con una  $L_{ingr,idr} = 10D$ , il flusso è turbolento.

## 2.2. EMODINAMICA

L'emodinamica è quella branca della termofluidodinamica (TFD) che si occupa di studiare il movimento del sangue all'interno dei vasi sanguigni. Uno tra i fenomeni di maggior importanza che si può notare nel sangue è l'effetto di Fåhræus-Linqvist (FLE) che prende il nome dagli scienziati svedesi che l'hanno studiato per la prima volta. Questo effetto è conosciuto anche con il nome di plasma skimming, ed è un fenomeno fluidodinamico secondo cui la viscosità del sangue varia al variare del  $D$  del condotto in cui fluisce. In particolare la viscosità diminuisce passando in vasi più sottili, ovvero a partire da vasi di  $D = 300 \mu m$  e diventa più evidente al diminuire del  $D$  del vaso. Tutto ciò continua a verificarsi fino a quando la viscosità raggiunge un valore minimo di soglia, nei piccoli capillari di  $6-7 \mu m$ . È giusto specificare che questo effetto si inverte al di sotto della precedente soglia e che si raggiunge il blocco del flusso per  $D < 2.7 \mu m$ .

Di seguito viene riportato lo scambio di calore che varia in funzione del diametro e della  $\mu$  e viceversa:

$$Q = \frac{128\mu L}{\pi D^4} \Delta p \Rightarrow \mu = \frac{Q\pi D^4}{128L\Delta p}$$

Dove  $Q$  è la portata e  $\Delta p$  è la caduta di pressione applicata tra 2 estremi della sezione del vaso.

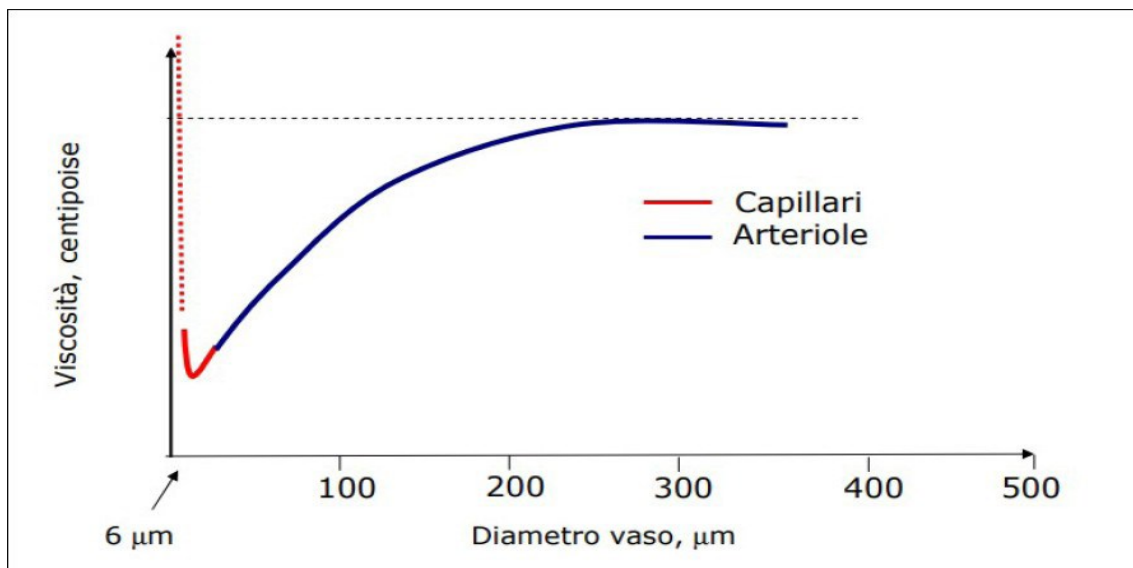


Fig.2.2.1 viene riportata la variazione della viscosità del sangue al variare del diametro dei vasi. Sull'asse delle ordinate abbiamo la viscosità dinamica espressa in centipoise (cP) mentre sull'asse delle ascisse abbiamo il diametro dei vasi espresso in  $\mu\text{m}$  (Appunti dell'Ing. Valerio D'Alessandro)

### 2.3. IPERTERMIA MAGNETICA

L'ipertermia magnetica (MHT, magnetic hyperthermia) è un promettente approccio terapeutico per il trattamento del cancro, ancora non ufficializzato nella pratica clinica, volto ad indurre localmente la morte delle cellule tumorali. Questa nuova possibile futura tecnica potrebbe essere integrata insieme alla chemioterapia e radioterapia. Di fatto viene sfruttato il riscaldamento di MNP in presenza di campo magnetico alternato. La trasformazione dell'energia del campo magnetico in calore avviene attraverso diversi meccanismi e l'efficienza del processo dipende fortemente dalla frequenza del campo esterno nonché dalle caratteristiche delle MNP tra cui la loro forma, dimensione, i materiali di cui sono fatte e le interazioni che hanno tra di loro. L'efficienza dell'ipertermia può quindi essere migliorata con la regolazione di questi parametri. In questo modo si può puntare ad un uso di MNP in quantità minori con campi magnetici ad ampiezze d'onda (frequenze) minori. I metodi di preparazione chimica ci consentono di controllare la forma, le dimensioni e di conseguenza interazioni magnetiche (es di tecnica: aggregazione controllata di NP multi-core, ovvero multi nucleo a singoli cristalli regolari). Il campo magnetico può essere generato anche tramite una bobina, dove viene fatta passare corrente alternata (AC), con l'idea di poter essere applicata intorno a distretti specifici del corpo. Questa modalità di trattamento alternativa, continua ancora oggi ad essere studiata, con l'obiettivo di poterla controllare da remoto. Il fenomeno della MHT può essere utile per il fatto che le cellule cancerogene risultano più intolleranti al calore rispetto alle cellule sane. Per cui in presenza di temperature locali  $T \geq 40^\circ\text{C}$  le cellule della massa tumorale iniziano a morire, di solito con un'ipertermia, ad oggi si può arrivare fino a  $44^\circ\text{C}$ .

L'abilità di un materiale di essere un buon mediatore ipertermico è data dall'assorbimento di potenza specifico (SPA, specific power absorption), viene anche chiamato tasso di assorbimento specifico (SAR) oppure potenza di perdita specifica (SLP). Questa grandezza rappresenta il potere termico, in questo caso, sviluppato dalle MNP per unità di massa. La



SPA si misura in  $\frac{W}{g}$ . Riguardo alla biodisponibilità, la magnetite ha dimostrato di essere molto promettente principalmente perché può essere ottenuta in grande quantità e con semplici processi di sintesi anche per ottenere nanostrutture, con un buon controllo della forma e dimensione. Dal punto di vista magnetico la scelta della magnetite è dovuta anche alla sua anisotropia magneto-cristallina. L'anisotropia è una proprietà del materiale tale per cui le sue caratteristiche risultano differenti al variare della direzione spaziale in cui vengono considerate. Il suo contrario è l'isotropia. Quindi di per sé, è una proprietà intrinseca del materiale. In questo caso nella magnetite, questa proprietà è rappresentata dalla composizione della struttura cristallina che condiziona la forma del ciclo d'isteresi, ovvero quel fenomeno che nel caso di materiali ferromagnetici, descrive la sua magnetizzazione a fronte della sollecitazione di un campo magnetico esterno che varia nel tempo la sua intensità. Come tutte le forme di isteresi, anche quella magnetica, dipende sia dalle condizioni istantanee in cui si trova il materiale e sia dalle condizioni in cui si trovava in precedenza. La magnetite è stata inoltre scelta per via della dimensione critica legata al regime superparamagnetico. Con quest'ultima proprietà si intende una forma di magnetismo che hanno le NP di grandezze nm con l'applicazione sempre di un campo magnetico esterno. In assenza di un campo magnetico applicato, la magnetizzazione delle NP è prossima allo zero. La magnetizzazione avviene soprattutto per rotazione delle particelle stesse. Più alto è il valore dell'anisotropia e più piccola sarà la dimensione critica. È ovvio che l'anisotropia condiziona il valore di SPA che ha dimostrato di essere massimo in prossimità della dimensione critica delle NP. Allo stesso tempo è ovvio che anche le variazioni della forma ed anche della superficie delle MNP, possono produrre una variazione dell'anisotropia. L'isteresi e la perdita di rilassamento rappresentano i due meccanismi di perdita di potenza che contribuiscono a condizionare SPA. Questi due meccanismi sono fortemente influenzati anche dallo stato d'aggregazione delle stesse. Il contributo delle correnti I parassite si può trascurare a causa della bassa conduttività (o conducibilità) della magnetite.

Nell'ipotesi di un sistema ideale di NP superparamagnetiche e isolate, l'assenza di campo magnetico, impedisce la determinazione delle loro interazioni magnetiche, di conseguenza impedisce l'agglomerazione, in questo modo si rendono i sistemi delle NP instabili. Nei sistemi reali le interazioni dipolari sono quelle che influenzano fortemente il potere riscaldante delle sospensioni colloidali. Infatti Martinez-Boubeta et al., Burrows et al. e Jeun et al. hanno dimostrato l'effetto delle interazioni dipolari nell'aumentare il valore SPA. Il tutto aumenta l'aggregazione delle NP. È stato proposto un modello da Landi et al., dove è stato mostrato che la SPA può aumentare e diminuire anche secondo il valore di  $\sigma$  che può essere scritto come il rapporto tra l'altezza della barriera energetica e quella dell'energia termica. La barriera energetica  $E_b$  è la differenza di energia di una particella quando si trova in due diverse posizioni, in questo modo la particella non può da sola, spostarsi da una posizione a bassa energia ad una ad alta energia senza assorbire energia. L'energia termica  $E_t$ , è la forma di energia posseduta da qualsiasi corpo che abbia una temperatura superiore allo 0 assoluto, ovvero 0 K. L'energia cinetica termica media di un sistema composto da un numero di particelle pari ad N, avente  $f$  gradi di libertà in generale vale:  $E_{ctm} = N \frac{f}{2} T K_b$ , dove  $K_b = 1,380649 \times 10^{-23} J/K$  è la costante di Boltzmann, T è la temperatura espressa in Kelvin (K), ed  $f$  rappresenta i gradi di libertà, ovvero il numero di coordinate necessarie per determinare la posizione di un oggetto specifico nello spazio 3D. I gradi di libertà dipendono dal tipo di particella o molecola che si vuole considerare. Le NP nel regime a barriera bassa, sono caratterizzate da frequenti salti di magnetizzazione tra i due minimi energetici e con un piccolo rilascio di energia in ciascun salto; le interazioni dipolari aumentano il valore di SPA.

### 3. MICROSCOPIA DI LORENTZ E TEM COME STRUMENTI DI OSSERVAZIONE DI NP E DEI CAMPI MAGNETICI

Tanto per mettere ordine in dei concetti che possono essere utili nella spiegazione dei prossimi argomenti:

- L'induzione magnetica ( $\vec{B}$ ) rappresenta la forza che esercita il campo magnetico sulla materia circostante. La sua unità di misura è il Tesla (T).
- l'intensità di campo magnetico ( $\vec{H}$ ) è una grandezza che si esprime nell'unità di misura A/m. Possiamo dire che insieme al  $\vec{B}$  contribuisce a descrivere un campo magnetico in qualunque punto dello spazio.
- Il momento magnetico  $m_m$  è la grandezza che caratterizza i dipoli magnetici (DM) ed hanno la dimensione nel SI di  $A \cdot m^2$ , ovvero Corrente Elettrica · Area di superficie.
- Il dipolo magnetico può essere definito come un magnete ottenuto considerando una spira microscopica percorsa da I. Può essere anche modellizzato come 2 cariche opposte, quindi una con carica positiva (+) e una con carica negativa (-) rigidamente interconnesse con un campo magnetico.
- $\vec{M}$  sta per magnetizzazione ed è una grandezza definita come il rapporto tra il momento magnetico totale del materiale e il suo volume. I materiali nella loro struttura microscopica sono formati atomi di elementi avente un momento magnetico diverso da 0. A loro volta questi atomi hanno gli elettroni che ognuno di questi è dotato di momento magnetico. Proprio per quantificare questo momento magnetico complessivo si ricorre ad  $\vec{M}$  e dato che il momento magnetico totale si misura in  $A \cdot m^2$  ed il volume V in  $m^3$ ,  $\vec{M}$  si esprime come A/m.
- Nelle perdite di rilassamento di Néel,  $m_m$  all'inizio bloccato lungo l'asse cristallino elementare, ruota allontanandosi da esso, verso il campo esterno. In questo modo all'interno del reticolo delle NP, per via dell'attrito si genera calore.
- Nelle perdite di rilassamento di Brown, per via delle rotazioni vere e proprie delle intere NP contro l'attrito viscoso della miscela, si riscalda tutta la soluzione contenente le NP.
- La Risoluzione è la minima distanza tra 2 punti materiali che si può osservare con un certo microscopio. Un TEM normale ha una risoluzione di 0,2 nm.
- Si vuole specificare che d'ora in poi per abbreviazione pratica nella scrittura della tesi, ogni acronimo che si scriverà, starà a significare i vari termini scritti in lingua inglese. Questo sia che ci si riferisca ad una particolare tecnica, nome di particella, grandezza fisica, termini adimensionali o altro.

- Per DLS ovvero Dynamic Light Scattering, Diffusione Dinamica della Luce si intende un'altra tecnica utilizzata in fisica per determinare le dimensioni e distribuzione delle particelle e polimeri sospesi in una soluzione.

-

Per poter visualizzare e mappare le interazioni interparticellari nel 2012 è stata utilizzata la Microscopia di Lorentz (ML); una tecnica affidabile che può essere utilizzata anche nella TEM ovvero microscopia elettronica a trasmissione con biprisma di Fresnel, in inglese transmittance electron microscopy. Il biprisma di Fresnel è un blocchetto di vetro avente 2 prismi rettangolari uniti i raggi luminosi provenienti da una fenditura centrata e parallela rispetto al biprisma vengono rifratti in modo tale da formare due fasci separati che di seguito si sovrappongono dando origine a immagini di colore chiaro e scuro. La caratterizzazione riportata viene eseguita su un sistema modello costituito da MNP con diversi gradi di interazione. Per poter studiare questo tipo di sistemi, sono state utilizzate MNP senza l'aggiunta di nessun tipo di tensioattivo stabilizzante. Qui sono state riportate come la ML può essere impiegata per ricavare SPA e per correlare l'ipertermia delle NP al loro stato di aggregazione su scala nanometrica.

I campioni NP per la TEM sono state preparate depositando una goccia di sospensioni colloidali diluite in 1mg/10mL sopra le griglie TEM. Le dimensioni e la morfologia delle NP sono state studiate con un TEM funzionante a 200 kV, in particolare si è fatto anche ricorso alla microscopia elettronica ad alta risoluzione (HRTEM) ovvero un tipo di TEM avente una risoluzione nell'ordine degli Angstrom (Å) che equivale a  $10^{-10}$  m ossia 0,1 nm. Dagli elettroni trasmessi che hanno attraversato il campione si ricostruiscono, attraverso un sistema di lenti elettromagnetiche, le immagini del campione in contrasto di fase (HRTEM) o in contrasto di ampiezza (Brightfield TEM o BFTEM). Gli istogrammi sono stati costruiti misurando il diametro delle NP di diverse regioni, compresi gli agglomerati. Il valore della media dei diametri delle NP è riportato nel simbolo di  $\langle D \rangle$  e  $\sigma$ , in questo caso rappresenta la deviazione standard della distribuzione. La ML è stata eseguita a temperatura ambiente, spegnendo la lente dell'obiettivo, per evitare di modificare la nano struttura magnetica del campione ed utilizzando al suo posto la mini lente. Poi i campioni vengono inseriti nella colonna TEM in un ambiente privo di campo. La ricostruzione delle immagini può essere fatta tramite opportuni software. Con questo metodo è anche possibile visualizzare i campi magnetici sempre su scala nanometrica.

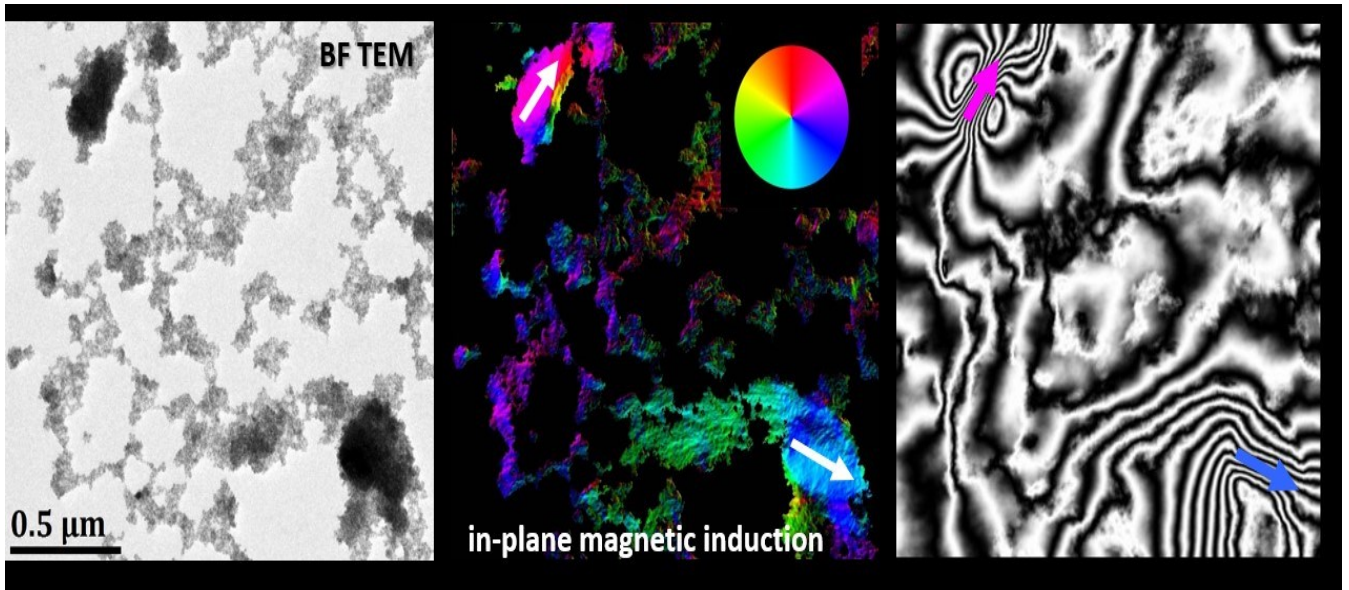


Fig. 3.1.: alla sinistra del lettore della tesi, vengono rappresentati gli aggregati di MNP tramite BFTEM in bianco e nero, verso gli estremi che stanno sullo spigolo sinistro e destro sempre della stessa immagine, si riescono a vedere i 2 grandi aggregati (GA) di NP; è da tenere conto che la grandezza dei GA sono dell'ordine di centinaia di nm per via delle interazioni dipolari (ID) più forti. Inoltre si possono intravedere degli aggregati lineari (AL) per via delle ID deboli con NP separate. Al centro e a destra vengono rappresentati le linee di campo magnetico tramite la ML; queste ultime 2 immagini non fanno vedere le NP, esse infatti sono state "mascherate" per visualizzare meglio le proprietà magnetiche degli aggregati. Sempre in queste 2 immagini si può notare come i grandi aggregati hanno una magnetizzazione uniforme nelle 2 frecce indicate in figura. La figura al centro di solito è nota come mappa dei colori dell'induzione magnetica  $\vec{B}$ . In più a destra si vede che le linee di  $\vec{B}$  dei GA non sono disturbate da quelle dei piccoli aggregati di NP. Le linee del campo magnetico dei grandi aggregati mostrano una buona tendenza a concentrarsi sulle loro NP. (CNR,2012)

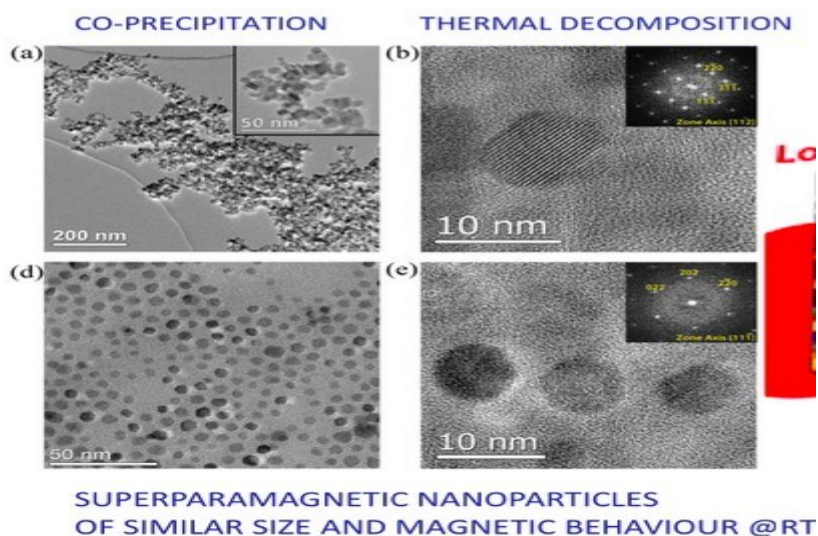


Fig. 3.2: caratterizzazione al TEM delle NP: (a) immagine in campo chiaro a basso ingrandimento (nel riquadro in alto alla destra del lettore è mostrata un'area fortemente

ingrandita); (b) immagine ad HREM (c) distribuzione delle dimensioni delle NP sintetizzate per co-precipitazione; (d) immagine in campo chiaro a basso ingrandimento; (e) immagine HREM; (f) distribuzione dimensionale delle NP sintetizzate mediante termo-decomposizione (Campanini et al.,2012)

#### 4. SINTESI DI NANOPARTICELLE $Fe_3O_4$

Le NP possono essere sintetizzate tramite 2 tipi di processi: la co-precipitazione (o co-precipitazione) e la termo-decomposizione (o termo-decomposizione o decomposizione termica).

La sintesi per co-precipitazione consistere nell'aggiungere 4 g di  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  (20mmol, ovvero 20millimoli) a una soluzione di 11 g di  $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$  (40mmol) in 120 ml di acqua ( $H_2O$ ) deionizzata (demineralizzata) ovvero acqua che è stata privata della sua componente salina.  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ ,  $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$  sono 2 molecole che hanno subito un processo di idratazione, tramite una reazione di idratazione si aggiunge una certa quantità d'acqua nelle molecole e queste cristallizzano nelle 2 forme diverse scritte sopra. In questo tipo di reazione la molecola non viene scissa come avviene nelle reazioni di idrolisi. Rispettivamente,  $FeCl_2$  è il cloruro ferroso mentre  $FeCl_3$  è il cloruro ferrico. Nelle 2 formule chimiche scritte sopra, l'aggiunta di acqua a  $FeCl_2$  trasforma il cloruro ferroso in cloruro ferroso tetraidrato cristallizzato. Un fenomeno simile avviene per  $FeCl_3$  che in questo caso si forma il cloruro ferrico esaidrato. Queste 2, sono le forme idratate di più comuni di cloruro di ferro che si trovano in commercio e nei laboratori. La soluzione è stata riscaldata a  $360 K \cong 87^\circ C$  sotto atmosfera di Argon (Ar). Il valore di PH è stato regolato a 10 con l'aggiunta di una soluzione acquosa concentrata con l'ammoniaca ( $NH_3$ ). La formazione della magnetite è iniziata immediatamente. Dopo un'agitazione fatta per 4 ore sotto atmosfera di Ar, la reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente (RT, room temperature). Le nanoparticelle sono state lavate più volte sempre con acqua deionizzata. Tutto questo è stato fatto per rimuovere l'eccesso di  $NH_3$ . Il precipitato nero è stato raccolto mediante decantazione magnetica che consiste nel separare la parte meno densa di un miscuglio dalla parte più densa. La parte meno densa consiste in un precipitato che si è depositato sul fondo. Il tutto viene fatto con l'aiuto di un magnete. Il precipitato viene successivamente essiccato sotto vuoto spinto al fine di ottenere le NP. Il prodotto è stato facilmente ridisperso in soluzione acquosa mediante sonicazione per 5 minuti. Quest'ultimo procedimento nella co-precipitazione consiste nell'utilizzare ultrasuoni al fine di facilitare la dispersione di queste NP in  $H_2O$ . Tutto questo serve al fine di rompere gli agglomerati particellari che nel momento della sintesi possono risultare sgraditi, in questo modo si hanno corpi con delle dimensioni più piccole e simili. È una tecnica che può essere utilizzata anche per la sintesi di altri tipi di campioni in altri settori di ricerca. In questo modo è stato sintetizzato un campione finale denominato CO-NP.

(a) *Co-precipitation synthesis*

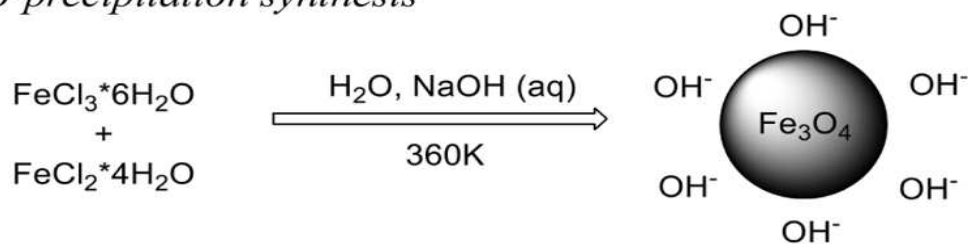


Fig. 4.1 viene illustrata uno schema di sintesi di MNP tramite la tecnica di co-precipitazione. (Campanini et al., 2015)

La sintesi per termo-decomposizione è stata eseguita in modo diverso rispetto alla co-precipitazione. In questo caso sono stati miscelati  $Fe(acac)_3$  (2mmol) ossia tris(acetilacetato) ferro(III), 1,2-esadecandiol (10mmol), acido oleico (6mmol) e oleilammina (6mmol) che è un'ammina correlata all'acido oleico; tutto questo in 20 mL di etere benzilico sotto un flusso di azoto. L'acido oleico si trova in vari oli vegetali, nella sua forma pura è un composto inodore ed incolore; tuttavia i composti in commercio possono risultare giallastri a causa della presenza di impurità. Viene utilizzato come eccipiente, cioè con la funzione di stabilizzare il composto e in questo caso ha un'azione protettiva sulla superficie delle NP. L'1,2-esadecandiol svolge la funzione di agente riducente. L'etere benzilico ha una buona miscibilità con  $H_2O$ , viene utilizzato come solvente.  $Fe(acac)_3$ , fa parte di una famiglia di acetilacetoni metallici. È un composto rosso, stabile a contatto con l'aria. La miscela è stata riscaldata a 473 K che corrisponde ad una  $T \cong 200^\circ C$  per 2 ore e poi riscaldata a riflusso 573 K  $\cong 300^\circ C$  per 1 ora sotto copertura di azoto. Quando la miscela nero-marrone ha raggiunto la RT, sono stati aggiunti 40 mL di etanolo (un tipo di alcol). Dopo di questo viene fatto precipitare il materiale nero-marrone mediante la centrifugazione ad una velocità di 5000 giri/min per un tempo di 15 min. Subito dopo la centrifugazione, si può estrarre il precipitato finale e aggiungerlo in un solvente, l'esano. Questo tipo di campione viene indicato con il termine di TD-NP.

(b) *Thermal decomposition synthesis*

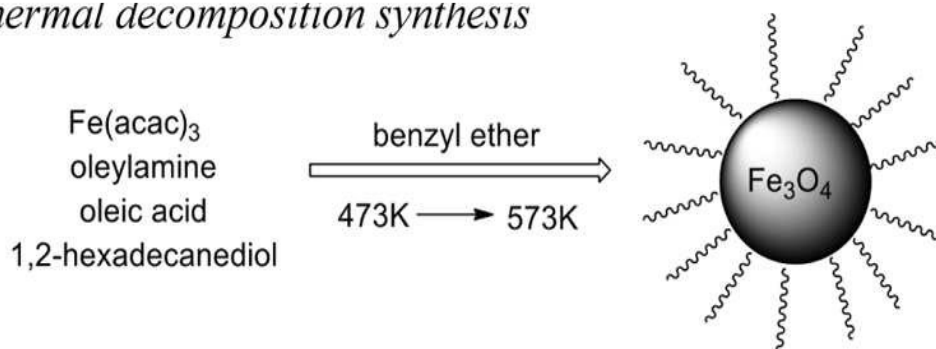


Fig. 4.2 illustrazione schematica della termo-decomposizione come sintesi alternativa delle MNP (Campanini et al., 2012)

Sintetizzando le NP con queste 2 tecniche sono stati formati i vari gradi di interazione tra le NP.

## 5. MISURAZIONE DEI PARAMETRI DI IPERtermia Magnetica

Sia per i CO-NP che per i TD-NP, le  $\vec{B}$  di bassa entità che vengono prodotte dai 2 campioni sotto l'applicazione di un campo magnetico esterno, possono essere misurate con un magnetometro SQUID (dispositivo superconduttivo ad interferenza quantistica). Si tratta di un rilevatore sensibile che riesce a misurare campi magnetici molto piccoli, fino a quantità di  $\vec{B} = 5 \cdot 10^{-14}$  T.

Lo stato di aggregazione delle NP nella sospensione colloidale è stata studiata utilizzando la tecnica Dynamic Light Scattering (DLS) utilizzando un laser di lunghezza d'onda  $\lambda = 632$  nm. Il diametro idrodinamico  $D_h$  misurato con questo strumento, è un parametro influenzato da molti fattori, tra questi è ovvio che non possono mancare il rivestimento e l'aggregazione delle NP. I circuiti di magnetizzazione dei campioni delle NP a RT sono stati ottenuti mediante un magnetometro a forza di gradiente alternato (AGFM) o mediante magnetometro campione vibrante (VSM). Il AGFM sfrutta campi magnetici variabili nel tempo (t) ed è utile per misurare la magnetizzazione di saturazione ( $\vec{M}_s$ ), la coercività ( $\vec{H}_c$ ) e la curva d'isteresi. La  $\vec{M}_s$  è la massima  $\vec{M}$  che il nanomateriale può raggiungere sotto l'applicazione di un campo magnetico esterno; la  $\vec{H}_c$  è il campo magnetico necessario per ridurre la  $\vec{M}$  residua di un materiale a 0; la curva d'isteresi rappresenta invece la relazione tra  $\vec{B}$  e  $\vec{M}$  del materiale. Il VSM utilizza un campo magnetico che mette in vibrazione il campione preso sotto analisi; il campione per via della sua vibrazione genera un segnale sinusoidale; quest'ultimo viene recepito da bobine pick-up ovvero di raccolta, che sono fissate su posizioni ben definite e sono perpendicolari tra loro. L'ampiezza della sinusoide rilevata è proporzionale al momento magnetico del campione ( $\vec{m}_m$ ). I magneti sul VSM sono montati su una base rotante avente un asse centrale. Il fatto che le bobine siano perpendicolari tra loro è utile per fornire sia la componente parallela che quella perpendicolare della  $\vec{M}$ . La componente parallela è chiamata  $\vec{M}_x$  mentre quella perpendicolare  $\vec{M}_y$ . L'intensità del campo massimo applicato è stato di  $\vec{B} = 2$  Tesla (2T). Inoltre Per avere una caratterizzazione magnetica completa, è stato anche caratterizzato lo Zero Field Cooling (ZFC), ovvero raffreddamento a campo zero e Field Cooling (FC), ossia il raffreddamento del campo. Queste altre 3 grandezze sono state ottenute tramite un magnetometro SQUID. Nella prassi questo vuol dire le polveri vengono essiccate in una capsula e raffreddate a  $T=5K$ . Per cui viene applicato un campo magnetico esterno di  $\vec{H} = 7,96$  kA/m e il  $\vec{m}_m$  viene misurato durante il riscaldamento fino a temperatura ambiente (RT, room temperature) che corrisponde a ZFC. Poi il campione viene raffreddato di nuovo nello stesso campo magnetico esterno e il  $\vec{m}_m$  viene rimisurato durante l'ulteriore riscaldamento (FC). Da queste due misurazioni successive si determinano la temperatura di blocco  $T_B$ ; questa si ottiene come la T alla quale lo ZFC mostra un massimo; la T di

irreversibilità  $T_I$  che è stimata come la T alla quale iniziano a trovarsi le curve ZFC-FC separate; ed infine la T di saturazione  $T_S$  che è definita come la T alla quale la FC smette di essere costante. Per un sistema reale di NP poli-disperse, la  $T_B$  può considerarsi come la temperatura media di blocco. Questo vuol dire che sotto la  $T_B$  ci sono le NP in forma bloccata mentre sopra la  $T_B$  le NP si trovano nello stato superparamagnetico (SPM). La  $T_I$  può essere considerata come il massimo valore della temperatura di blocco delle MNP più grandi. Infine la  $T_S$  è il minimo valore della temperatura di blocco delle NP più piccole.

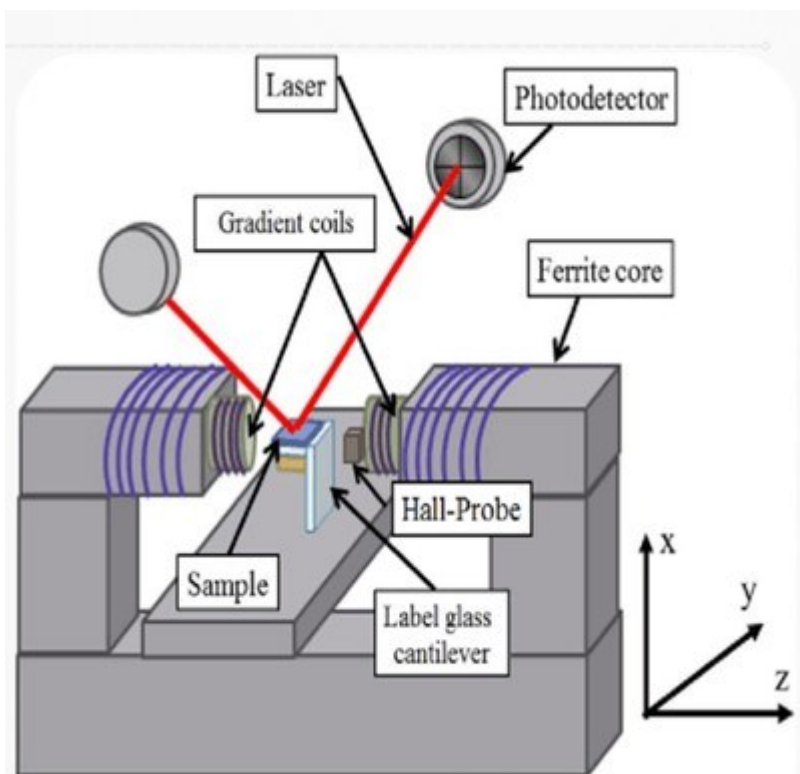


Fig. 5.1 componenti di un'altra variante di magnetometro AGFM: il campione viene messo al centro, ai lati ci sono le bobine di gradiente, affianco alle bobine ci sono i nuclei di ferrite, la sorgente laser e il fotodetector. (electricity-magnetism.org)



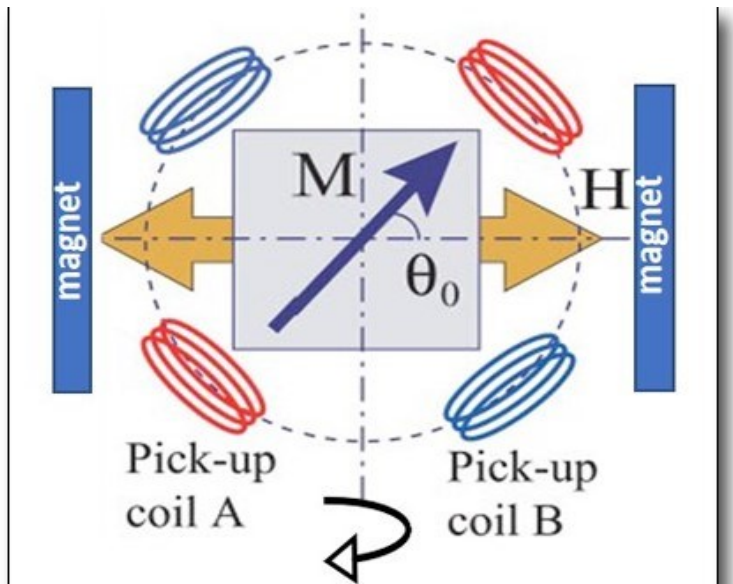


Fig. 5.2 schema di un magnetometro VSM: si notano 2 magneti ai lati, il campione in mezzo con la sua  $\vec{M}$  e le 4 bobine (fonte: ISM-CNR)

## 5.1 MISURAZIONE DI SPA

Per quanto riguarda le misurazioni fatte su SPA, sono state ottenute, con l'utilizzo di questa tecnica, su sospensione colloidale di NP con una concentrazione inferiore all'1% in peso disperso in solventi organici come l'esano oppure disperso in acqua ( $H_2O$ ) mediante un applicatore commerciale di AC. In questo modo è stato applicato un campo  $\vec{H}$  di ampiezza 12,7 kA/m e frequenza 235 kHz. L'aumento della temperatura è stato misurato tramite un termometro a fibra ottica per evitare l'accoppiamento con il campo a radiofrequenza. Di per sé un termometro a fibra ottica, è utile per misurare le T in ambienti sottovuoto ed anche in presenza di campi magnetici, in quanto con questo strumento le misure delle T non subiscono interferenze magnetiche con questo tipo di termometro. In questo modo si è visto che il valore SPA misurato è stato in W/g può essere espresso in questo modo:

$$SPA = \frac{m_p c_p + m_s c_s}{m_p} \cdot \frac{\Delta T}{\Delta t}$$

Dove  $m_p$  e  $c_p$  rappresentano rispettivamente la massa e il calore specifico delle NP, mentre  $m_s$  e  $c_s$  rappresentano le stesse grandezze riportate sopra ma per il sovente. Il termine  $\frac{\Delta T}{\Delta t}$  rappresenta la pendenza dell'incremento iniziale nella T.

Per la descrizione dell'ipertermia dei campioni è stata fatta una sua misurazione su entrambi i campioni CO-NP e TD-NP con  $\vec{H} = 12,7$  kA/m a 235 Hz. SPA è risultato pari a 3,4 W/g per TD-NP e 50 W/g per CO-NP. Tenuto conto che i dati pubblicati si riferiscono a sistemi con gradi di interazione variabili e diversi parametri di misurazione ( $\vec{H}$ , f in Hz, ecc...) i valori SPA

sono attendibili per altri NP della stessa dimensione. Ciò che può meravigliare di più è la differenza di SPA che c'è tra i 2 tipi di NP se consideriamo che sono comparabili tra i 2 campioni sia la distribuzione delle dimensioni delle NP che anche i valori di magnetizzazione  $M_S$ . L'unica spiegazione possibile di questa differenza è la formazione di forti interazioni dipolari tra le CO-NP.

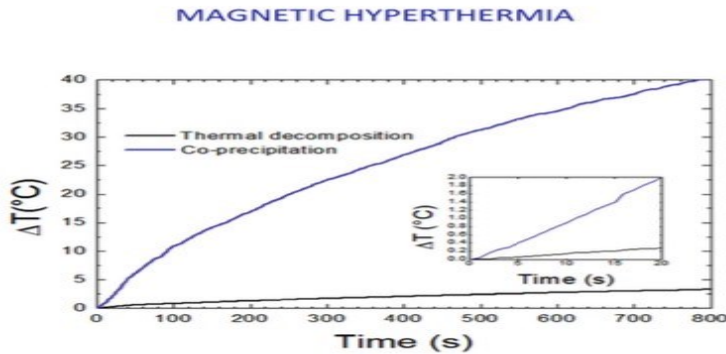


Fig. 5.1.1 variazione della T in funzione del tempo per MNP ottenute per CO e TD, viene mostrata una forte differenza di pendenza delle 2 curve, si può notare come la  $\Delta T$  aumenta di più nelle CO-NP rispetto che nelle TD-NP (CNR, 2012)

Si è ritenuto utile anche valutare la barriera energetica dalle curve ZFC-FC. La massima energia della barriera è data da:

$$\Delta = k_B T_I \times \ln\left(\frac{\tau_m}{\tau_0}\right)$$

Dove  $k_B$  come sempre è la costante di Boltzmann,  $T_I$  è il massimo valore della T di blocco per gli aggregati più grandi,  $\tau_m$  è il tempo di misura mentre  $\tau_0$  è il tempo di prova. Consideriamo la  $\tau_m$  di un magnetometro pari a 100s e il classico valore  $\tau_0 = 10^{-9}$  s l'espressione di sopra diventa:

$$\Delta = 25 k_B T_I$$

Questo valore  $\Delta$  corrisponde a  $1,7 \times 10^{-20}$  J nelle TD-NP a  $T_I = 51$  K, mentre a  $7 \times 10^{-20}$  J per CO-NP con  $T_I = 200$  K.  $\Delta$  è per cui potenziato nel campione CO-NP, questo aspetto può a sua volta influenzare ulteriormente la SPA.

I valori  $\Delta$  sopra indicati possono essere utilizzati per stimare le T di blocco dei 2 gruppi di particelle a 235 kHz, cioè con un  $\tau_m = 6,77 \times 10^{-7}$  s. L'inserimento dei valori  $\Delta$  e della nuova  $\tau_m$  nella prima equazione dove compare il ln, ci permette di ottenere altri 2 valori di T uguali a 189 K per le TD-NP e 780 K per le CO-NP. Questo risultato è un'altra prova del comportamento diverso dei due campioni a RT. I campioni TD-NP dovrebbero trovarsi nel regime SPM anche ad alta  $f = 235$  kHz. I meccanismi di Néel e Brown spiegano l'aumento di T durante l'MHT. Nel caso di TD-NP si vede anche qui che si ha dei valori moderati di SPA. Nei CO-NP a causa della solita  $f$  che induce un aumento della T di blocco, i grandi aggregati (GA) si trovano in regime bloccato. In questo caso il contributo alla generazione del calore è dato dalle perdite dell'isteresi magnetica. In questo modo si hanno un aumento dei valori di SPA ancora più alti.

Per cui si può concludere che anche se il campione mostra un comportamento SPM, nei GA le interazioni magnetiche inducono ciascuna NP ad avere dei momenti magnetici con

orientamenti preferenziali, correlati agli orientamenti dei momenti di altre NP; questo vale per ogni GA. Per cui il superparamagnetismo è fortemente influenzato da interazioni dipolari (ID) e questo aspetto viene preso in considerazione per descrivere il comportamento ipertermico del campione. Questo è confermato dal valore che è stato valutato a  $T_I = 200 K$ .

L'analisi al ML eseguita su una significativa area del campione TD-NP sottolinea chiaramente l'elevata stabilità dei GA. In questo caso le deboli ID non influenzano in modo significativo il campo magnetico totale del sistema. Dai risultati sopra indicati possiamo dire che per il TD-NP, il guscio organico ostacola lo stabilirsi di forti ID tra le particelle, in questo modo i momenti magnetici ( $\overline{m_m}$ ) sono liberi di ruotare all'interno della struttura cristallina senza orientamenti preferenziali, ovvero hanno orientamenti del tutto casuali.

Tutto ciò da parte di questi campioni, comporta la formazione di aggregati lineari (AL). In questo caso il valore SPA è dovuto principalmente al meccanismo di rilassamento di Néel e Brown. In totale, i diversi comportamenti che riguardano le ID dei CO-NP e TD-NP tra le particelle danno origine ai GA interconnessi dagli AL, come si può notare lo stesso nella fig 2.3.1. I risultati ottenuti utilizzando la ML dimostrano che:

- I GA mostrano un comportamento dipolare, essi sotto un campo magnetico statico non presentano alcuna isteresi. Invece sotto un campo magnetico AC applicato a  $f = 235 \text{ kHz}$ , i GA si trovano nel regime bloccato, per cui possono dare valori di SPA più alti a causa delle perdite d'isteresi.
- Nelle NP esterne ai GA non si vedono caratteristiche peculiari attribuibili ad un comportamento dipolare. Esse mostrano comunque un comportamento SPM e grazie al campo dipolare generato dai GA si organizzano in AL; tutto ciò viene anche riportato nella fig. 2.3.1, nell'immagine vista alla sinistra del lettore della tesi.

In sintesi possiamo concludere che per quanto riguarda la SPA, per le CO-NP essa è dovuta a 2 diversi contributi:

- Un contributo più grande dovuto alla perdita d'isteresi nei GA
- Un contributo più piccolo derivante dalle perdite di rilassamento di Néel e Brown che sorgono come conseguenze nella formazione di AL.

## 6. NANOPARTICELLE MAGNETICHE

I nanovettori consentono un facile controllo della posizione dei farmaci nel corpo del paziente. In questo capitolo si vuole riportare una descrizione generica di queste MNP, con particolare riguardo alla loro classificazione in base al tipo di nanovettori, si vuole fornire informazioni anche sulle loro proprietà principali e di conseguenza, in merito proprio a queste ultime, riportare le loro possibili principali applicazioni nella chemioterapia antitumorale.

Si farà anche riferimento al miglioramento che di recente è stato implementato nella fabbricazione delle MNP con il rivestimento in polisaccaridi. Di concetto questo miglioramento è servito per diminuire in modo importante la tossicità delle MNP che possono apportare all'organismo umano.

## 6.1. CLASSIFICAZIONE DEI NANOVETTORI MAGNETICI

Ci sono vari tipi di nanovettori magnetici che possono essere utilizzati nella terapia antitumorale. Tra questi sono presenti le MNP decorate con polisaccaridi, le Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPION) ovvero nanoparticelle superparamagnetiche di ossido di ferro e le nanoparticelle d'oro e le NP rivestite di silice. Nella descrizione ci concentreremo soprattutto sulle MNP rivestite con polisaccaridi, tra quelli più desiderabili per la sintesi di oltre il 70 % delle MNP con nucleo di  $Fe_3O_4$  ci sono: Chitosano (CS), Alginato (Alg), amido, cellulosa, acido ialuronico (HA) e destrano (DEX).

Le MNP rivestite con polisaccaridi si classificano principalmente in:

- 1) Nanoportatori magnetici core-shell (o nucleo-guscio)
- 2) Magneto nanoidrogel
- 3) Nanoportatori vari che sono:

Qui sotto viene anche riportato lo schema di classificazione dei vari tipi più recenti di MNP elencate nei 3 punti sopra; subito dopo si procederà con la loro descrizione:

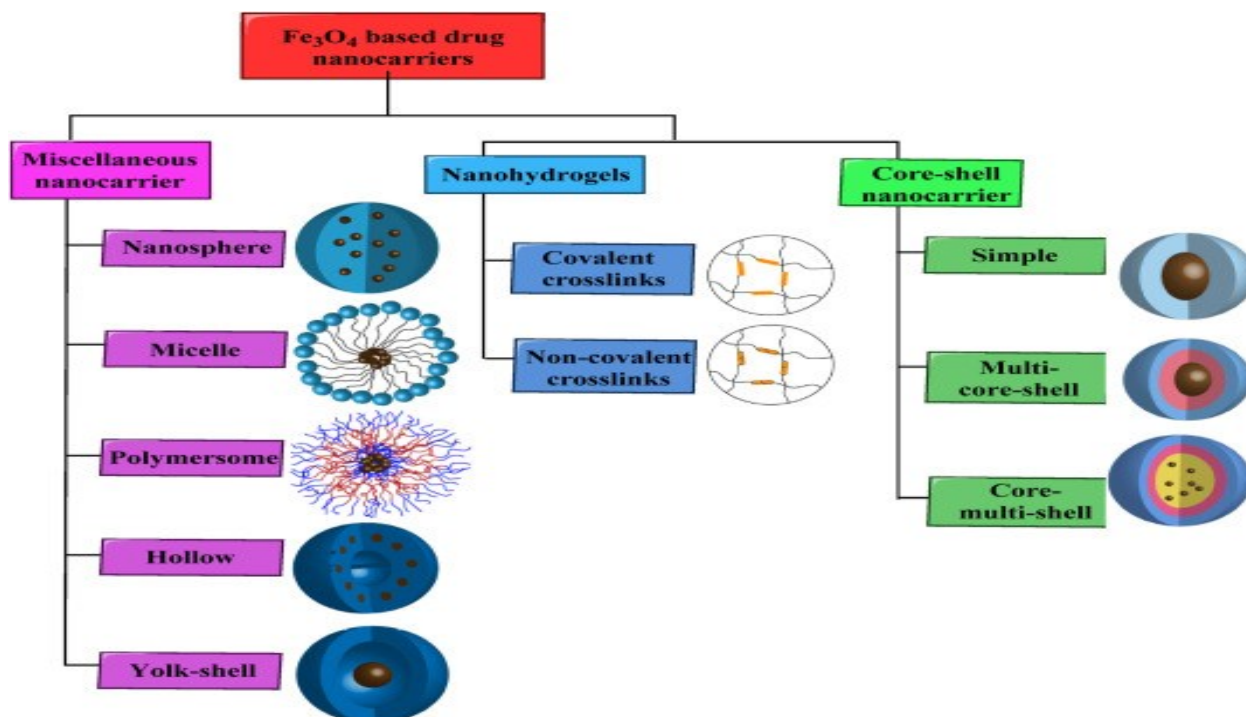


Fig. 6.1.1 schema di classificazione dei nanocarrier presenti ad oggi (Pourjavadi et al., 2024).

## 6.2. SPION

Le SPION sono state ampiamente studiate a causa delle loro proprietà magnetiche uniche rispetto all'ossido di ferro sfuso, tra cui: comportamento superparamagnetico con una grande suscettibilità magnetica; bassa temperatura di Curie; e alta coercitività. La temperatura di Curie in sostanza indica la temperatura fino alla quale deve essere riscaldato un magnete

per essere smagnetizzato. La coercitività è l'intensità di un campo magnetico inverso che è necessario applicare ad un materiale per annullare la sua magnetizzazione dopo che questa ha raggiunto il suo valore di saturazione. Le SPION sono NP di ossido di ferro costituite da magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Questi materiali hanno mostrato un eccellente potenziale nelle applicazioni teranostiche; in particolare per la diagnosi presso il punto di cura, si sono dimostrati dei buoni agenti di contrasto per la RM, impiegabili nei trattamenti antitumorali ipertermici e nella DDS (sistema di somministrazione farmaci). Per cui le proprietà magnetiche degli SPION dipendono dalle loro dimensioni e forma; il controllo di tali caratteristiche così come l'uniformità è fondamentale. Altri metodi di rivestimento sintetico sia covalenti che non covalenti sono: la stabilizzazione con acido citrico, adsorbimento dei polimeri e rivestimento con materiale inorganico come la silice o anche chiamata diossido di silicio o anidride silicica ( $\text{SiO}_2$ ). In quest'ultimo modo possiamo ottenere SPION@ $\text{SiO}_2$  core-shell. Le dimensioni e la stabilità delle NP SPION@ $\text{SiO}_2$  formate, sono state caratterizzate utilizzando la microscopia elettronica a trasmissione (TEM) e la diffusione dinamica della luce (DLS). Le proprietà magnetiche sono state valutate utilizzando la magnetometria del campione vibrante (VSM). Quando le MNP, comprese anche le SPION si trovano sospese in dei liquidi trasportatori, essi vengono chiamati fluidi magnetici o ferrofluidi. Per schermare la particella magnetica dall'ambiente circostante, oltre che effettuare gli appositi rivestimenti, vi si possono collegare anche dei gruppi carbossilici (per es: biotina, avidina, carbodiimmide) al fine anche di aumentare la resa del bersaglio. In più queste molecole che vengono aggiunte in agiscono come punti di fissaggio (attachment points) per l'accoppiamento di farmaci o anticorpi bersaglio.

### 6.3. NP D'ORO

Di per sé stesse le nanoparticelle d'oro (AuNP), sono delle SPION che vengono ricoperte nella loro superficie di oro, in modo da migliorare l'assorbimento del farmaco nella cellula ed anche l'imaging molecolare delle cellule tumorali per la loro diagnosi, fungendo da agenti di contrasto. Tutto questo sempre grazie alla loro stabilità, alla capacità di legarsi comunque alle biomolecole, alle loro caratteristiche di assorbimento plasmonico della superficie e grazie alle loro proprietà ottiche che consentono a questi tipi di NP di assorbire e rilasciare luce visibile. È stato dimostrato che in genere, il processo di segnalazione delle AuNP sulle cellule, anche con delle possibili combinazioni con fluorofori, è il migliore possibile quando hanno dimensione compresa tra i 40 e 50 nm. Degli studi hanno dimostrato che l'oro elemento in genere passivo per i sistemi biologici, se ridotto sotto forma di nanoparticelle diviene invece fortemente attivo, in questo modo questo materiale permette la penetrazione selettiva e l'accumulazione in cellule cancerogene. La sintesi delle AuNP è stata ben consolidata in formato di sfere, cubi, bastoncini, gabbie e fili. Tutte queste nanoforme possono essere acquistate in quantità molto buone e con un attento controllo della loro qualità. Anche qui, come nelle SPION "normali", il controllo della morfologia di queste AuNP è importante in quanto condizione le loro proprietà fisiche che a loro volta condizionano il loro ruolo come sonde per l'imaging.

## 6.4. NP DI SILICE

La silice è generalmente considerata un materiale biosicuro ed è stata utilizzata anche per impianti chirurgici. È ben documentato che nella sintesi di NP di silice è possibile ottenere un controllo accurato delle dimensioni e della morfologia. In generale, offrono un facile caricamento di un'ampia gamma di funzioni terapeutiche e di imaging: Tutto questo rende queste NP@SiO<sub>2</sub> dei buoni candidati per scopi teranostici. Possono essere formate mediante idrolisi e condensazione del tetraetil ortosilicato (TEOS). Per introdurre gruppi funzionali sulle particelle, è molto comune utilizzare l'amminopropiltrimetossisilano (APS) o il mercaptopropilmetossisilano (MPS) come co-precursori, che co-coagulano con la matrice TEOS per portare gruppi amminici o tiolici sulla superficie delle particelle. In questo modo una molecola funzionale può essere facilmente importata nel nanosistema durante la formazione delle particelle, se è preaccoppiata con APS/MPS. Sia i coloranti organici che i complessi del gadolinio (Gd) con un ligando acido dietilentriammina-pentacetico (Gd-DTPA) sono stati accoppiati e integrati nella matrice di particelle di silice attraverso questo approccio per produrre agenti otticamente o magneticamente attivi. A loro volta anche le AuNP possono essere rivestite con la silice. Altre NP di silice alternative sono quelle realizzate in forma mesoporosa con un accurato controllo della dimensione dei pori. Queste strutture sono costituite da centinaia di canali vuoti e con ampia area superficiale; sono eccellenti serbatoi per permettere il caricamento di molti prodotti farmaceutici a piccole molecole. Inoltre, sono state sviluppate tecnologie per tappare i mesopori dopo il caricamento del farmaco per inibire il rilascio prematuro del farmaco.

## 6.5. MNP CORE-SHELL

Il termine “nanoparticelle core-shell” è emerso negli anni '90 quando i ricercatori hanno studiato le nanoparticelle semiconduttrici multistrato. Queste particelle comprendono almeno due componenti, uno al centro che è il nucleo e l'altro componente è il guscio che circonda il nucleo. Ci sono quattro categorie di nanoparticelle nucleo-guscio che vengono classificate in base ai loro numeri di nuclei e gusci: le core-shell, multi-core-shell, core-multishell, multi-core-multishell. Rispettivamente le core-shell sono quelle nanoparticelle che a livello di struttura hanno un nucleo ed un guscio; le multi-core-shell sono quelle che presentano un guscio e al loro interno più nuclei; le core-multishell hanno un nucleo all'interno e più gusci di rivestimento sovrapposti tra di loro; le multicore-multishell invece hanno più nuclei e più gusci di rivestimento.

Qui sotto viene riportata l'immagine della classificazione delle MNP core-shell:

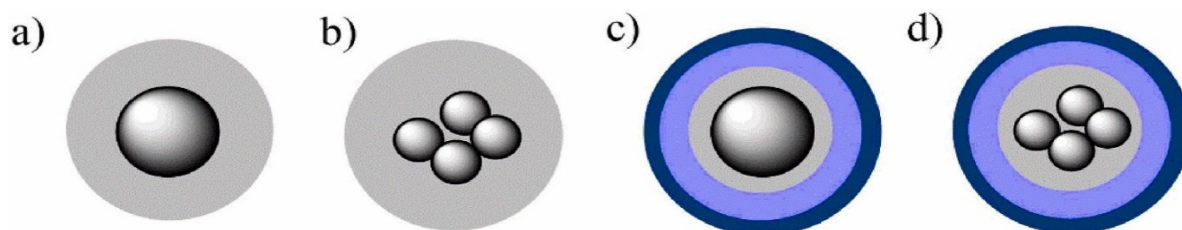


Fig 6.5 questo è un altro tipo di classificazione delle MNP in base alle diverse strutture core-shell di sintesi che possono essere fatte nei laboratori di ricerca competenti: a) core-shell, b) multi-core-shell, c) core-multishell, d) multi-core-multishell.



Nelle MNP core-shell le proprietà del nucleo e del guscio possono essere completamente diverse. Questa differenza può essere ottenuta modificando il tipo di materiale o il rapporto tra le masse del nucleo e guscio. Allo stesso tempo, la riduzione dell'attività e dell'aggregazione del nucleo magnetico è possibile mediante l'incapsulamento dello stesso. Ad oggi l'uso di MNP con guscio inorganico è più utilizzato nel settore scientifico di ricerca competente. Tra i vari macrotipi di materiali inorganici utilizzati per questo fine ci sono la silice, i metalli e i sali. Possono essere anche usati polimeri organici polimeri, per esempio: il polidopammide (PDA) e materiali in carbonio; in più possono essere utilizzati anche materiali organici-inorganici sempre per i gusci. Grazie a questi diversi tipi di materiali il guscio non si dissolve in modo rapido di conseguenza funge da barriera al rilascio precoce del farmaco per ridurre le perdite precoci durante il loro percorso nei vasi sanguigni. Tra i polimeri, quelli che sono stati ultimamente considerati più appropriati al rilascio dei farmaci, sono i polisaccaridi.

## 6.6. NANOIDROGEL

Gli idrogel, ovvero dei materiali in 3D intelligenti che contengono polimeri morbidi reticolati con la caratteristica di poter assorbire e trattenere l'acqua. Nonostante l'uso estensivo di questi materiali nei sistemi di somministrazione dei farmaci, a quanto sembra questi potrebbero avere delle limitazioni sulla reattività agli stimoli e sulla controllabilità del rilascio dei farmaci. Per risolvere questi problemi, i ricercatori hanno iniziato a produrre idrogel funzionalizzati. Tutto questo viene fatto con l'aggiunta di MNP agli idrogel polimerici, in modo da produrre una nuova classe di materiali la cui caratteristica più importante è la loro magnetizzazione, in questo caso possiamo parlare di magneto nanoidrogel o nanoidrogel magnetici. L'uso di MNP migliora la stabilità meccanica e termica degli idrogel e determina un maggiore controllo sul rilascio del farmaco. In questo senso oggi ci si sta concentrando sul ruolo dei nanoidrogel magnetici a base di polisaccaridi nella terapia del cancro. Un esempio tra questi nanocompositi è dato dalla realizzazione (Zhang et al.; 10 aprile 2012) di nanogel ibridi basati su punti quantici di chitosano (CS) e  $Fe_3O_4$  per il rilascio antitumorale di camptotecina (CPT), un farmaco che in forma libera può essere utilizzato nella cura dei tumori al seno, alle ovaie, ai polmoni, al colon-retto e allo stomaco.

Gli idrogel sono di per sé stessi delle reti polimeriche; per cui sono presenti dei legami incrociati nella loro struttura chimica che evitano la dissoluzione delle catene del polimero idrofilo nella fase acquosa. Le reti così ottenute mostrano un comportamento viscoelastico e talvolta puramente elastico. In molte applicazioni compreso il drug delivery, è vantaggioso avere degli idrogel che ovviamente siano degradabili, motivo per cui in essi vengono spesso introdotti legami labili che nella maggior parte dei casi verranno rotti per idrolisi. Di solito questi idrogel hanno una buona biocompatibilità ovvero la loro superficie idrofila ha una bassa energia libera interfacciale a contatto con i fluidi corporei, che si traduce in una bassa tendenza delle proteine e delle cellule ad aderire a queste superfici, in questo modo non si creano con artificio agglomerati di cellule evitando anche sotto questo aspetto la formazione di emboli e trombi, cioè si evita la formazione di ostruzioni e tappi che possono portare alla rottura dei vasi sanguigni. Quest'ultimo aspetto risulta di necessaria importanza per la loro applicazione. Inoltre, la natura morbida e gommosa degli idrogel riduce al minimo l'irritazione dei tessuti circostanti.

Come si può leggere nello schema iniziale di classificazione, ci sono due tipi di nanoidrogel; quelli a reticolazione covalente (chiamati anche covalent crosslink) e quelli a reticolazione non covalente (non-covalent crosslink).

Per gli idrogel a reticolazione non covalente si intendono quelli che nella loro formazione sono stati sottoposti a reticolazioni mediante interazioni ioniche che è una forma di reticolazione fisica e non chimica.

I nanoidrogel a reticolazione covalente hanno legami covalenti nelle diverse catene polimeriche di cui sono fatti. Essi sono stati ottenuti mediante reticolazione chimica.

Per quanto riguarda la reticolazione ionica, di solito il classico esempio di polimero che può essere reticolato in questo modo è l'alginato (Alg), un polisaccaride con residui di acido mannuronico e glucuronico che può essere reticolato da ioni calcio. La reticolazione può essere effettuata a temperatura ambiente (RT = room temperature) e pH fisiologico. Per cui i gel di alginato, di solito vengono utilizzati anche per il rilascio di proteine. Questo tipo di reticolazione non richiede per forza la presenza di gruppi ionici nel polimero dell'idrogel. L'alginato, è stato riconosciuto per la sua non antigenicità, non tossicità, biocompatibilità soddisfacente, biodegradabilità favorevole e sensibilità al pH.

## 6.7. NANOSFERE

Le nanosfere (NS) sono nanostrutture sferiche in cui molecole o particelle specifiche, come farmaci e MNP, sono disperse o intrappolate nel tessuto della matrice. La grandezza di queste particelle è variabile, le nanosfere possono essere collocate nell'intervallo di grandezza di 1 fino a 1000 nm; le microsfele sono un altro tipo di materiale per altre applicazioni; esse hanno grandezze comprese invece nell'intervallo di 1-1000  $\mu\text{m}$ . Le nanosfere più piccole di 200 nm sono più adatte per veicolare farmaci antitumorali, in quanto sono meno immunocompromittenti dopo che sono state iniettate all'interno del flusso sanguigno.

## 6.8. NANOMATERIALI POROSI

Per quanto riguarda i materiali porosi, è stata data maggiore importanza a strutture cave porose ovvero con grandi cavità e con guscio omogeneo a causa della loro bassa densità, elevata area superficiale e disponibilità di spazi interni. A questo proposito, i nanotubi e i nanotubi spazialmente porosi rappresentano potenti opzioni per i sistemi di somministrazione di farmaci. Tra i nanotubi più conosciuti ci sono: i nanotubi di carbonio, i nanotubi di halloysite (HNT) con la superficie ricoperta di nanoparticelle di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , nanocompositi cavi a base di polielettroliti ed infine le nanoparticelle a guscio d'uovo.

I nanotubi di carbonio sono il materiale più prezioso in grado di assorbire le molecole di farmaci antitumorali idrofobici come la doxorubicina (DOX) e il metotrexato (MTX) tramite le solite interazioni idrofobiche e picchettamento  $\pi$ - $\pi$ .

Gli HNTs sono nanomateriali sicuri e biocompatibili in modo relativo, di per sé stessi sono delle nanoargille, in particolare sono composte da materiali a base di alluminosilicati (con una formula molecolare di  $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) che fornisce uno spazio vuoto per il caricamento dei farmaci. Inoltre, possono essere meno dannosi dei nanotubi di carbonio.



Un altro gruppo di nanotubi esistenti sono le nanobarre d'oro che vengono utilizzate come nucleo e le MNP come guscio mesoporoso cavo. Questo altro tipo di nanostrutture sono sensibili al pH grazie all'utilizzo di acido ialuronico (HA) modificato con polidopamina come secondo guscio. Le interazioni di coordinazione tra i gruppi  $-OH$  e  $Fe$  vengono scisse nel mezzo acido, provocando l'apertura dei pori e il rilascio del farmaco antitumorale. Questo nanocarrier è stato sintetizzato e studiato anche per erogare i chemioterapici in combinazione con una possibile terapia fototermica, tutto ciò è stato reso possibile grazie al suo guscio di polidopamina.

Le nanoparticelle a guscio d'uovo o tradotto dall'italiano all'inglese, le "yolk-shell", sono particelle vuote in cui un nucleo mobile è racchiuso in un guscio cavo. L'ampio spazio interno di queste strutture le rende un sito desiderabile per il caricamento dei farmaci.

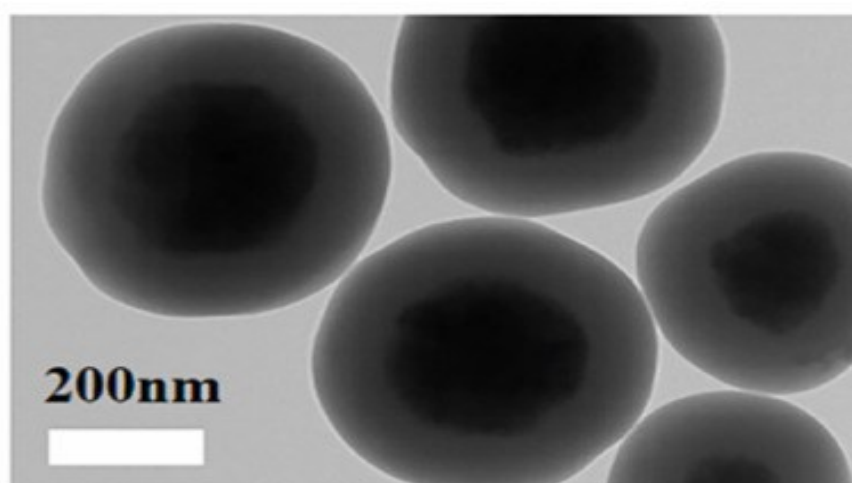


Fig. 3.4 Viene mostrata un'immagine visualizzata tramite microscopia elettronica a trasmissione (TEM), dove si riesce a vedere nanoportatori magnetici a tuorlo d'uovo basati con rivestimento in acido ialuronico (HA).

## 6.9. MICELLE POLIMERICHE

Le micelle polimeriche, in inglese Polymeric Micelles (PM) o polimerisomi sono due disposizioni create dall'autoassemblaggio di copolimeri anfifilici nel mezzo acquoso. Questa è una potente strategia per sviluppare nanovettori di farmaci. Durante la formazione delle micelle in acqua, al centro viene posizionata la sezione idrofobica dei copolimeri, che può caricare farmaci antitumorali idrofobici e NP. Pertanto, le PM possono incapsulare i materiali al loro centro. Le PM che di solito possiedono una struttura core-shell, sono diventate un tema caldo nel campo della somministrazione di farmaci negli ultimi anni grazie alla loro capacità di migliorare la solubilità e la bioattività dei farmaci liposolubili (Xu et al., 2018), nonché i vantaggi della somministrazione mirata, della buona stabilità, della permeabilità dei tessuti e dell'effetto di rilascio prolungato che consente un lungo tempo di permanenza dei farmaci nel corpo (Yao, et al., 2017). I polimeri anfipatici sensibili agli stimoli esterni alla temperatura (T), al pH, alla riducibilità, al magnetismo, alla luce, all'elettricità, alla forza

ionica e agli enzimi reattivi, possono essere preparati mediante opportune modifiche chimiche (Guerry, et al., 2014 ; Li et al., 2012 ). Le PM costruite con questi polimeri anfipatici sensibili agli stimoli esterni sono eccellenti trasportatrici per il rilascio controllabile del farmaco. Le micelle polimeriche incorporate in NP magnetiche (MNP-PM) possono rispondere ai campi magnetici, mantenere una buona biocompatibilità e stabilità chimica. Sempre questi MNP-PM, possono migliorare la solubilità e l'efficienza di incorporamento dei farmaci idrofobici. Nuovi sistemi di PM con derivati anfipatici del CS, possono essere preparati modificando il CS con gruppi idrofili e idrofobi. In questo modo si può migliorare l'efficienza di introduzione di materiale biologico esogeno in cellule eucariotiche (Berlind, Gudjonsson, Baldursson e Masson, 2014). Un altro noto polimero utilizzato per costruire micelle polimeriche è il glicole polietilenico (PEG). Esso presenta il vantaggio di evitare l'adsorbimento delle proteine plasmatiche, prolungando così il tempo di circolazione delle NP e del farmaco nel sangue.

## 7. RISULTATI IN VITRO E IN VIVO DELLE MNP CON POLISACCARIDI NEI LABORATORI DI RICERCA E POSSIBILI LORO APPLICAZIONI

La comunità scientifica, nel corso del tempo sta studiando nuove tecniche di drug delivery per una somministrazione più efficace dei farmaci chemioterapici. Vengono riportate le principali terminologie che vengono utilizzate nella descrizione dei risultati di interesse e delle specifiche NP che sono state utilizzate per questo scopo.

termini di biologia e altre scienze:

- La citotossicità in vitro, viene esaminata con il test o saggio MTT. Esso serve per valutare l'attività metabolica delle cellule. È un saggio colorimetrico che viene fatto su piastre multi pozzetto (96 pozzetti). Quanto più è di colore viola scuro la soluzione su ogni pozzetto tanto più è maggiore il numero delle cellule cancerogene vitali in soluzione, metabolicamente ancora attive. Si chiama test MTT in quanto viene utilizzato un sale tetrazolio giallo, chiamato anche MTT che viene ridotto dalle cellule vive, per via degli enzimi riduttasi al sale formazano a cristalli viola. Quest'ultimo meccanismo spiega la colorazione viola del liquido contenuto nei pozzetti. Per cui in tutti i risultati in cui è stata riportata un buon livello di citotossicità nei confronti delle cellule cancerogene con il test MTT, ci si riferisce sempre ad un test fatto solo in vitro. Se non verrà specificato altro, vuol dire che il test è stato fatto in vitro e non in vivo, salvo tutti quei casi in cui verrà specificato che è stato fatto il test anche in vivo. Ovviamente nei test in vitro si intendono anche altri test simili a MTT (es: test CCK-8).
- Per test in vivo si intendono tutti quei test che sono stati anche fatti su topi di razza BALB/c.
- In tutti quei casi in cui è stato dichiarato che la i test della citotossicità sono stati fatti anche in vivo, vuol dire che i test sono stati fatti sui topi (o murini).
- L'immunogenicità è la capacità posseduta da una sostanza di indurre una risposta immunitaria da parte dell'organismo. Più in generale l'immunogenicità è la proprietà di una molecola di stimolare da sola, il sistema immunitario senza il supporto di un'altra molecola adiuvante.
- Idrofilia è la proprietà fisica di materiali e singole specie chimiche come le molecole a legarsi con l'acqua.
- Idrofobia è il contrario dell'idrofilia.

- Lo xenotrapianto in questo caso, è il trapianto di tessuti e organi fatto su una specie animale, chiamata ricevente. I tessuti e organi provengono da una specie animale diversa rispetto a quella ricevente in cui sono stati trapiantati.
- L'intervallo di banda di un semiconduttore è l'intervallo di energia proibito agli elettroni. Questo concetto può essere utilizzato anche per gli isolanti.
- L'efficienza quantica è l'efficienza di conversione ed utilizzo della luce, di solito da parte di punti quantici.
- La lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) della luce visibile è:  $380 \text{ nm} \leq \lambda \leq 760 \text{ nm}$ ; in base alla  $\lambda$  specifica la luce assume uno tra i colori dell'arcobaleno.
- I tioli o tioalcoli, dal punto di vista chimico hanno i gruppi tiolici o gruppi solfidrili, ovvero un gruppo funzionale R-SH, a differenza degli'alcoli che hanno il gruppo funzionale idrossile (-OH).
- I legami disolfuro (S-S) di solito vengono coinvolti nell'accoppiamento di due gruppi tiolici. Il ponte disolfuro, confrontato con i legami C-C e C-H, ha un legame con una forza minore del 40% rispetto a C-C e C-H. Questa caratteristica fa del legame disolfuro, un possibile anello debole per molte molecole.
- GSH è un acronimo che in sostanza vuol dire glutathione, in questo caso contribuisce nel dissociare i nanocarrier attraverso la riduzione dei legami disolfuro, in questo modo avviene un rapido rilascio del DOX, tutto questo nel citoplasma delle cellule.
- La transizione da sol-gel indica il processo di trasformazione di soluzioni colloidali sol in dei gel. Il sol è una miscela in cui una sostanza si trova in uno stato finemente disperso in un liquido; il gel è una sostanza che ha nella sua struttura un reticolo continuo interconnesso in una soluzione liquida; si può passare dallo stato di sol a quello di gel attraverso reazioni di idrolisi e condensazione.
- L'enzima superossido dismutasi (SOD) appartiene alla classe delle ossidoreduttasi. Si tratta di un importante antiossidante in quasi tutte le cellule esposte all'ossigeno ( $O_2$ ). La sua funzione contribuisce al mantenere le cellule in vita; infatti senza questo enzima possono avvenire reazioni di ossidazione che possono produrre radicali liberi, molecole chimiche molto reattive, responsabili a loro volta dell'avvio di una reazione a catena che danneggia le cellule.
- La microscopia elettronica a trasmissione (TEM) è una tecnica microscopica in cui un fascio di elettroni viene trasmesso attraverso un campione per formare un'immagine. Il campione è molto spesso una sezione ultrasottile di spessore inferiore a 100 nm o una sospensione su una griglia. I TEM trovano applicazione nella ricerca sul cancro, nella virologia e nella scienza dei materiali. In questo c'è anche da aggiungere che la TEM rispetto alla DLS, fornisce un'analisi della dimensione delle NP meno precisa.
- Le specie reattive dell'ossigeno (ROS o Reactive Oxygen Species) sono specie chimiche, chimicamente reattive, contenenti ossigeno. Tale definizione è utilizzata in biologia, negli studi basati sullo stress ossidativo.
- Per QD si intendono punti quantici semiconduttori con fotoluminescenza regolabile in base alle loro dimensioni, larghezza di banda di emissione ristretta ed elevata stabilità fotochimica. Sono ampiamente studiati come sonde di fluorescenza nell'imaging cellulare. In inglese vengono chiamati anche "quantum dot", da questo si capisce l'acronimo QD. Dal punto di vista della loro nanostruttura, sono atomi artificiali formati dall'inclusione di 2 materiali semiconduttori. I possibili impieghi dei QD ne sono tanti, nella nanomedicina vengono utilizzati come sorgente fluorescente per contribuire all'imaging e trasporto dei drug delivery in chemioterapia.
- Per co-polimero (o copolimero) si intende tutte quelle macromolecole, la cui catena polimerica contiene piccole molecole reagenti di 2 o più specie diverse. Talvolta il

termine co-polimero viene utilizzato in senso più stretto per indicare i polimeri ottenuti a partire da monomeri di 2 specie diverse.

- Le DNA topoisomerasi (o semplicemente topoisomerasi) sono enzimi che catalizzano i cambiamenti nello stato topologico del DNA, convertendo forme rilassate e super avvolte, specie collegate e non collegate e DNA annodato e non annodato.
- Il nostro azobenzene, è un composto fotocommutabile ed è costituito da 2 anelli fenilici legati da un doppio legame  $N=N$ . Essi hanno la proprietà di assorbire la luce, per cui sono coloranti comuni.
- CSLM è un acronimo che sta per Confocal Scanning Laser Microscopy ovvero microscopia confocale a scansione laser. È ovvio che la sorgente luminosa è un raggio laser. L'osservazione viene realizzata in ottica confocale, illuminando cioè un piccolo volume del campione con un determinato colore alla volta, in corrispondenza del punto focale del sistema ottico, raccogliendo la luce unicamente dallo stesso volume tramite filtri spaziali posti sul cammino ottico dei raggi. Il vantaggio principale di questo microscopio è l'alto grado di contrasto.

#### I polisaccaridi:

- Il destrano è un polimero ramificato del glucosio, di peso molecolare variabile. È un polisaccaride batterico prodotto da un particolare batterio lattico. È un materiale commercialmente interessante grazie alla sua buona solubilità. Il destrano a basso peso molecolare è un espansore del plasma; ciò vuol dire che può agire come emosostituto, ovvero agisce anche come analogo artificiale di alcuni componenti del sangue. Pertanto, il destrano viene proposto principalmente per progettare trasportatori polimerici e ibridi nei sistemi di drug delivery.
- Il chitosano (CS) è un polisaccaride ottenuto mediante deacetilazione della chitina. È il polisaccaride più popolare utilizzato nei sistemi di somministrazione dei farmaci. È ricco di gruppi funzionali amminici. I gruppi amminici possono essere convertiti in ioni ammonio mediante assorbimento di protoni per essere convertiti, in ambiente acido, in ammonio e interagire con i gruppi fosfato della superficie cellulare per migliorare ulteriormente la permeabilità cellulare. Il legame idrogeno e le interazioni elettrostatiche tra farmaci e CS conferiscono sensibilità al pH al nanocarrier che viene rivestito con questo polisaccaride.
- L'alginato (Alg) è un polisaccaride anionico che viene estratto dalle pareti cellulari delle alghe brune. Presenta dei gruppi anionici che possono essere utili per preparare vari tipi di idrogel.
- I dendrimeri sono strutture ramificate polimeriche scoperte dal professor Donald Tomalia nel 1985. Hanno un sistema altamente ordinato. I loro gruppi funzionali terminali sono sintetizzabili con artificio. I dendrimeri di poliammidoammina (PAMAM), con uno scheletro ricco di ammine, sono tra i dendrimeri, più utilizzate nella fabbricazione di nanovettori.
- L'acido ialuronico (HA) è un polisaccaride lineare presente naturalmente nel corpo umano. Le sue applicazioni in vivo riguardano di solito, il mantenimento dell'umidità e la lubrificazione delle articolazioni con possibile loro rigenerazione. Il punto forte dell'HA è la sua interazione con vari recettori sulla superficie delle cellule tumorali come LYVE-1 ovvero il recettore endoteliale dei vasi linfatici 1, il CD44 e il RHAMM. Il LYVE-1 e il CD44 sono tutti e 2 dei marcatori linfatici. Diversi studi hanno dimostrato che il LYVE-1 può essere anche utilizzato come marcatore nei tessuti linfoidei e nella linfoangiogenesi. Il recettore per la motilità mediata dall'acido ialuronico RHAMM, può essere esportato sulla superficie cellulare dove lega l'acido ialuronico (HA) e

interagisce con il recettore CD44 dell'HA. Processi come la mobilità (o motilità) cellulare, la guarigione delle ferite e l'invasione sono modulati da RHAMM. Pertanto, l'utilizzo dell'HA nella struttura dei nanovettori di farmaci antitumorali può aumentare il loro assorbimento cellulare.

- La cellulosa è un polisaccaride molto abbondante in natura. Questo polimero non mostra una buona solubilità in acqua nella sua forma nativa a causa del suo legame H intra/intermolecolare. La modifica della struttura della cellulosa influisce direttamente sulle sue interazioni intra-intermolecolari e sull'idrofobicità. Pertanto, la cellulosa viene solitamente utilizzata nelle strutture di nanovettori dei farmaci sotto forma di suoi derivati.
- L'amido è un polisaccaride naturale prodotto sotto forma di granuli come fonte di energia da varie piante, anche lui è un materiale economicamente vantaggioso. Pertanto, è un materiale economicamente vantaggioso per la preparazione di nanovettori di farmaci. L'amido viene decomposto nel corpo umano dagli enzimi  $\alpha$ -amilasi e dall'idrolisi. Questa caratteristica rende l'amido più biodegradabile della maggior parte dei polisaccaridi.

#### Termini di medicina e farmacia:

- Gli adenocarcinomi sono forme tumorali maligne che di solito si sviluppano nei tessuti ghiandolari dell'organismo.
- Quando si parla di adenocarcinoma o carcinoma di grado 4 si vuole intendere un tumore in fase di metastasi, cioè le cellule tumorali hanno colonizzato altri organi del corpo distanti dal tumore primario.
- I carcinomi sono invece forme tumorali maligne che di solito si sviluppano nei tessuti epiteliali dell'organismo.
- Un profarmaco è un medicinale non farmacologicamente attivo al momento della somministrazione, ma che lo diviene in seguito ai processi metabolici subiti una volta penetrato nell'organismo.
- Per HER2 ci si riferisce al recettore 2 per il fattore di crescita epiteliale (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2), noto anche come *ERBB2*. Nei tumori della mammella, tumore all'esofago (gastroesofageo) e allo stomaco, le cellule tumorali presentano più di due copie del gene che codifica per questa proteina, con la conseguente iperproduzione della HER2. Questi gruppi di tumori sono noti come HER2-positivi, caratterizzati da una aggressività maggiore rispetto agli HER2-negativi e dal fatto che rispondono in maniera diversa alle terapie.
- Per cui il test per *HER2* eseguito su un campione di tessuto tumorale identifica i tumori come *HER2*-positivi o negativi.
- La PET, dall'inglese "positron emission tomography" ovvero tomografia ad emissione di positroni, è una tecnica diagnostica utilizzata in medicina che dà informazioni circa la fisiologia di un determinato organo di interesse. Come per tutte le tecniche diagnostiche, l'organo di interesse si può visualizzare con delle mappe. Al contrario le risonanze magnetiche (RM) e le tomografie computerizzate (TC) possono dare informazioni riguardo alla morfologia di un organo.
- Il tamoxifene (TAM) è un farmaco antitumorale che di solito si può assumere per via orale e che viene utilizzato in clinica per la terapia di alcune forme del tumore al seno. È un farmaco appartenente alla famiglia dei SERM, ovvero modulatori selettivi del

recettore degli estrogeni. Gli estrogeni a loro volta, sono i principali ormoni sessuali femminili ad oggi conosciuti.

- La doxorubicina (DOX) è un antibiotico antineoplastico appartenente alla famiglia delle antracicline. Il farmaco si lega al DNA cellulare inibendo la sintesi degli acidi nucleici. La DOX è attiva soprattutto nella fase S del ciclo cellulare, ovvero la fase di sintesi e duplicazione del DNA. Ad oggi nella pratica clinica, questo farmaco viene utilizzato per il trattamento di diversi tumori, in combinazione con altri chemioterapici.
- Il metotrexato (MTX) è una molecola antagonista dell'acido folico. Di per sé stesso è un farmaco che inibisce l'enzima diidrofolato reductasi; in questo modo riesce a inibire la sintesi del DNA. trova anche la sua applicazione in oncologia clinica per alcune forme tumorali.
- La camptotecina (CPT) è una molecola inibitrice della topoisomerasi, è stata utilizzata clinicamente in Cina per il trattamento di tumori gastrointestinali. Ad oggi è presente sul mercato in diverse forme e nomi. Ad oggi nel mondo viene utilizzata, per il trattamento di tumore al polmone, tumore alle ovaie, tumore al colon, tumore al seno e tumore gastroesofageo.
- L'erlotinib è un farmaco utilizzato per gestire alcuni tipi di tumori polmonari non a piccole cellule e tumori pancreatici in stadio avanzato. Come farmaco fa parte degli inibitori del recettore della tirosin chinasi.
- La gemcitabina (GEM) è un farmaco antineoplastico, anche in questo caso, la sua attività citotossica è dovuta all'inibizione della fase S. Ad oggi è il chemioterapico in forma libera di prima linea, utilizzato per la cura del tumore al pancreas.
- Il paclitaxel (PTX) è un agente antineoplastico impiegato nel trattamento di varie neoplasie, tra cui i tumori dell'ovaio, della mammella e del polmone non a piccole cellule. Fa parte del gruppo dei taxani, il suo funzionamento si basa sull'inibizione della fase mitotica cellulare (fase M).
- L'oxaliplatino è un agente chemioterapico antineoplastico in grado di legarsi al DNA, in questo modo interferisce con tutte le fasi del ciclo cellulare. L'oxaliplatino è un analogo del farmaco cisplatino. Viene utilizzato in clinica in tutti quei casi di neoplasie solide che hanno acquisito resistenza al cisplatino e al carboplatino. Può essere perciò utilizzato per carcinoma polmonare, dell'esofago, dello stomaco, della vescica ed altri carcinomi.
- Cetuximab è un inibitore dei recettori del fattore di crescita cellulare spesso utilizzato per trattare le metastasi colo rettal e gastriche. Viene utilizzato di solito in forma libera anche nel trattamento del tumore al cervello, del collo e del polmone. Cetuximab è un mab che si lega al recettore del fattore di crescita nelle cellule impedendone l'assorbimento. Negli ultimi anni, è stato utilizzato in combinazione con DOX nei nanocarrier per il rilascio di farmaci. Ciò ha attirato particolare attenzione grazie all'efficace targeting, di conseguenza anche grazie all'effetto tossico contro le cellule tumorali polmonari.
- Tra i macro gruppi di cellule tumorali che funzionano ad espressione del recettore folato ci sono oltre che il tumore al seno: il tumore alla vescica, quello del testicolo, del polmone, del cervello, del pancreas, dello stomaco, del rene, della prostata e così via.
- La biocompatibilità è la proprietà che hanno le sostanze, organi, materiali e impianti artificiali di essere ben tollerate dall'organismo vivente e dai tessuti circostanti ad uno o più organi di interesse di studio.
- Il gene BLM è importante in quanto codifica una proteina che fa parte della famiglia delle elicasi. Questa proteina viene coinvolta nella riparazione del DNA. Nel caso dell'esperimento fatto sulle cellule HCT 116, esse hanno avuto un'alterazione del gene BLM, questo ha portato ad una rottura del DNA; questo è uno dei motivi per cui la



linea HCT 116 è un gruppo di cellule cancerogene. Le varie forme di cancro che presentano questo tipo di alterazione, hanno la caratteristica di poter anche insorgere nelle persone in età precoce.

- La genipina è un composto naturale che si ottiene estraendo il frutto della pianta Gardenia Jasminoides Ellis che proviene dalle regioni dell'Asia meridionale dove è ampiamente utilizzata nella medicina tradizionale cinese secondo cui allevierebbe il mal di testa e i sintomi del diabete di tipo II e tratterebbe le infiammazioni e le malattie del fegato.
- I pneumociti sono le cellule che costituiscono l'epitelio degli alveoli polmonari, ovvero una componente dei polmoni che si trova in posizione terminale dopo i bronchioli polmonari. Un insieme di alveoli formano un grappolo che viene chiamato infundibolo. Gli alveoli sono ricoperti da uno strato sottile di epitelio, essi permettono gli scambi gassosi.
- I linker sono frammenti di DNA sintetico contenenti una sequenza specifica riconosciuta da enzimi di restrizione. Viene utilizzato in ingegneria genetica per legare tra loro molecole di DNA di diversa origine.
- IC50 o concentrazione inibente è la concentrazione di un inibitore enzimatico (farmaco, veleno, tossina) necessaria per inibire il 50% del bersaglio in esame che può essere un enzima, una cellula, un recettore o microrganismo.
- La desmoplasia ci si riferisce alla crescita del tessuto fibroso o connettivo. È anche chiamata reazione desmoplastica per sottolineare che avviene dopo l'innescò di un certo stimolo esterno e si può verificare intorno al tumore. Essa è di solito associata solo alle neoplasie maligne.
- Lo stroma è un tessuto che fornisce nutrimento e sostegno ad una neoplasia maligna per aiutarla a proliferare. Sia cellule tumorali che quelle dello stroma si scambiano dei segnali, tutto ciò viene fatto anche per stimolare le cellule dello stroma a formare nuovi vasi sanguigni per procurare ancora più ossigeno e nutrienti al fine di far in modo che il tumore continui a crescere (angiogenesi).
- La terapia fototermica è una delle tecniche emergenti nel campo della ricerca sul trattamento delle neoplasie; di solito impiega agenti che assorbono la luce nel vicino infrarosso (NIR) per generare calore dall'energia ottica, portando all'ablazione termica delle cellule tumorali. In questo contesto le NP sono progettate per assorbire specifiche lunghezze d'onda della luce convertendola anch'essa in energia termica. Di recente sono state fatte delle ricerche anche sulle NP d'oro utilizzate sia per questo stesso scopo sia per sviluppo di possibili future tecniche di imaging medico.
- La prognosi è la previsione sul decorso e soprattutto sull'esito di un determinato quadro clinico.
- Il PDAC ovvero adenocarcinoma duttale pancreatico, è il tumore solido più mortale e aggressivo, è ancora incurabile nelle fasi precliniche a causa dello stroma multiforme, della densa desmoplasia e di conseguenza della regressione immunitaria. Inoltre, l'eterogeneità del tumore e i cambiamenti metabolici sono collegati a risultati traslazionali clinici di basso grado. Esso è anche caratterizzato da una prognosi sfavorevole, ha un alto tasso di mortalità, con meno del 10% delle possibilità di sopravvivenza globale dopo 5 anni di malattia per i pazienti. Spesso le diagnosi continuano ad essere tardive e non permettono di prendere in tempo la malattia per un efficace terapia e chirurgia.
- L'ipossia, ovvero la carenza di ossigeno nei tumori contribuisce alla progressione complessiva del tumore, essa interviene nell'angiogenesi e metastasi.
- Il tumore della mammella resta una delle neoplasie più frequenti, infatti con 54.976 nuove diagnosi in un anno, questo tumore rappresenta infatti il 30,3% di tutti i tumori

che colpiscono le donne e il 14,6% di tutti i tumori diagnosticati in Italia. Il tumore al seno è una malattia potenzialmente grave se non è individuata e curata per tempo. È dovuto alla moltiplicazione incontrollata di alcune cellule della ghiandola mammaria che si trasformano in cellule maligne e acquisiscono la capacità di staccarsi dal tessuto che le ha generate per invadere quelli circostanti e, col tempo, anche organi più lontani. In teoria tutte le cellule presenti nel seno possono dare origine a un tumore, ma nella maggior parte dei casi il cancro ha origine dalle cellule ghiandolari (dai lobuli) o da quelle che formano la parete dei dotti. Nonostante tutto il tumore al seno, nel corso degli anni è diventato sempre più curabile.

- NSCLC è un acronimo che sta per non-small-cells lung cancer, ovvero tumore polmonare non a piccole cellule; rappresenta ad oggi 85% - 90% di tutti i casi di tumori polmonari; è una delle neoplasie più diffuse al mondo ed anche una causa di morte molto diffusa tra i casi clinici di cancro presenti nel mondo. Purtroppo questa alta mortalità è dovuta dal fatto che NSCLC ha una diagnosi tardiva, per cui di solito nel momento in cui i pazienti si sottopongono a diagnosi, essi presentano questo tumore già in forma metastatica. Inoltre la chemioterapia in forma libera, presa da sola, non è selettiva; questo determina solo un modesto aumento della sopravvivenza per le persone affette. Come conseguenza di questi fattori viene limitato anche il ricorso alla chirurgia solo per una minoranza della popolazione. Tuttavia, quello che ad oggi si sa su questa forma di cancro, è che le cellule che lo compongono presentano alti livelli di espressione del Recettore del Fattore di Crescita Epidermico (EGFR); questo in circa l'80% dei tumori NSCLC e questo può essere un fattore importante nell'utilizzo di mab come ad esempio Cetuximab.
- L'epatocarcinoma umano (CEC o HCC), o più raramente epatoma è la forma più comune di tumore del fegato. L'HCC rappresenta il 90% dei casi di neoplasia al fegato. Esso è il sesto tumore al mondo per incidenza di casi clinici. Molti pazienti si presentano alla diagnosi già con malattia in stadio avanzato con una prognosi sfavorevole; tra i tumori presenti ad oggi è uno tra i più mortali. È la quarta causa di decessi per cancro.
- Il tumore al collo dell'utero si sviluppa nella parte inferiore dell'utero, l'organo dell'apparato femminile dove viene accolto e si sviluppa l'embrione nel corso della gravidanza. Secondo i dati riportati nel mondo il tumore della cervice uterina si colloca al quarto posto tra i tumori più comuni nelle donne. I dati di GloboCan (Global Cancer Observatory) indicano anche che il 60% circa dei casi di questo tumore si registra in Asia e un altro 19% in Africa. Come scrivono gli esperti dell'OMS, la neoplasia della cervice è tra le più comuni nelle donne in 25 Paesi, la maggior parte dei quali nell'Africa sub-Sahariana. Nel mondo occidentale il numero dei casi e quello dei decessi continuano a diminuire. In Italia ogni anno si registrano circa 2.500 nuovi casi, l'1,3% di tutti i tumori diagnosticati nelle donne.

Qui di seguito si fa un punto della situazione di quelli che sono stati i risultati principali nelle ricerche in laboratorio dei nanocarrier (NC) sopra descritti. Verranno presi in considerazione i vari tipi di nanovettori magnetici. In generale possiamo dire che i tumori possono eliminare i materiali organici grazie a dei loro meccanismi di difesa specifici; proprio per questo motivo, in questi ultimi 10 anni sono stati progettati diversi tipi di nanovettori ibridi organico-inorganici, che mostrano i vantaggi sia dei componenti organici con maggiore biocompatibilità e biodegradabilità che inorganici con elevata stabilità e bassa immunogenicità. Gli studi clinici riconfermano che le MNP modificate con polisaccaridi hanno il potenziale di migliorare la



qualità delle immagini della Magnetic Resonance Imaging, MRI, l'ipertermia locale e la somministrazione mirata di farmaci, grazie anche ad una loro adeguata biocompatibilità e per il loro targeting più specifico anche grazie all'applicazione di un magnete esterno.

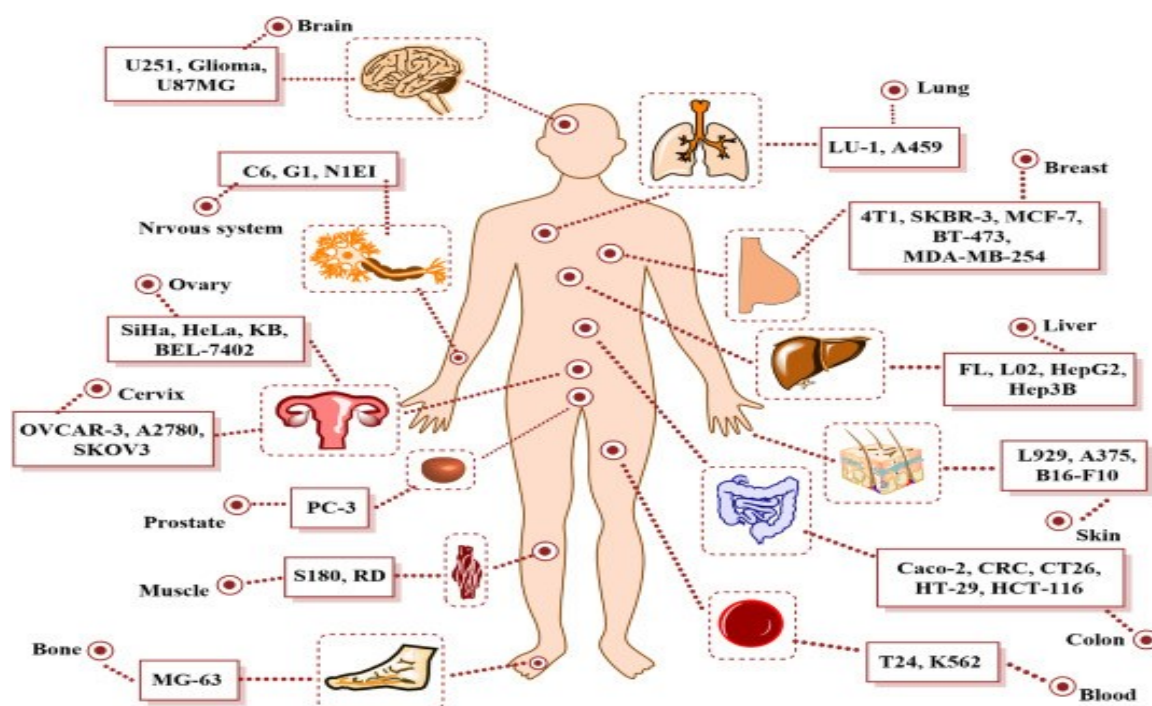


Fig. 4. In questa figura sono state riportate le varie linee cellulari tumorali che sono state utilizzate in laboratorio per lo studio della citotossicità delle MNP per il drug delivery; si vuole precisare che dai paragrafi 4.1 in poi non sono stati riportati tutti i risultati associati a tutte le linee cellulari riportate in questa immagine. Verranno specificate di seguito le linee cellulari nella descrizione dei risultati (Pourjavadi et al.,2024)

## 7.1. RISULTATI IN LABORATORIO E DESCRIZIONE DELLE MNP RIVESTITE CON CHITOSANO

In questa sezione vengono riportati i risultati principali che sono venute fuori negli' anni in fatto di sperimentazione delle MNP rivestite con chitosano (CS). Nelle MNP rivestite con CS, il legame idrogeno e le interazioni elettrostatiche tra farmaci e CS conferiscono sensibilità al pH alla MNP. In questo contesto di tesi, la sensibilità al pH significa un maggiore rilascio di farmaco in un microambiente tendenzialmente acido. Infatti è stato visto che un ambiente microbiologico con PH tendenzialmente acido favorisce il rilascio di un chemioterapico. Inoltre la repulsione dei gruppi amminici del CS, provoca la separazione del guscio, seguita dalla rimozione dal nanocarrier, di tutti i farmaci simili alla doxorubicina (DOX). Tuttavia il CS è insolubile in acqua. Poiché l'idrofilia di un nanotrasportatore di farmaco è un fattore decisivo per la biocompatibilità e la resistenza al sistema immunitario, la modifica del CS è una strategia di routine prima o durante la preparazione di nanotrasportatori a base di CS. Questa strategia aumenta la solubilità in acqua, il contenuto di carico del farmaco e la sensibilità al

pH. A questo riguardo il carbossimetil chitosano (CMCS) è uno dei derivati idrofili del CS più famosi per la sintesi di nanovettori di farmaci.

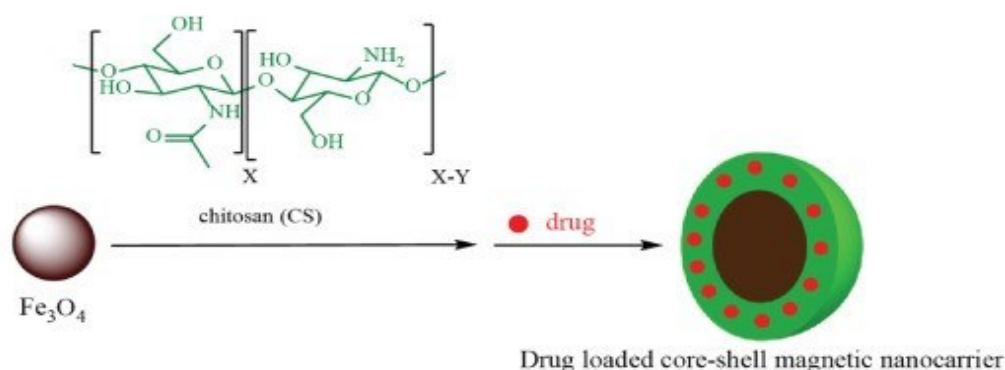


Fig 7.1.1. Lo schema mostra un modello molto semplificato di caricamento di un farmaco in una MNP@CS core-shell (Pourjavadi et al.,2024)

Nel 2015 Zhenqing Hou et al., hanno sperimentato MNP rivestite con CS funzionalizzate con glicole polietilenico o polietilenglicole (PEG), seguite dal caricamento del chemioterapico metotrexato (MTX), un farmaco antitumorale, insieme col colorante cianina fluorescente nel vicino infrarosso (Cy5.5). MTX-PEG svolge un'azione anche di ligando oltre che quella di un chemioterapico. Il nanosistema risultante è stato testato per l'imaging e per la terapia antitumorale. I risultati si sono dimostrati positivi sia in vitro che in vivo, ovvero con l'esperimento fatto direttamente sui topi con xenotrapianto di cellule tumorali HeLa ed in vitro sempre sulla stessa linea cellulare. Le HeLa sono cellule tumorali del collo dell'utero, esse sono molto resistenti, per cui sono in grado di moltiplicarsi in numerose condizioni ambientali anche sfavorevoli. Per cui il drug delivery caricato con il chemioterapico ha sviluppato tossicità per le HeLa in tutte e 2 le sperimentazioni. Il rilascio del MTX è stato effettuato per effetto dell'idrolisi del legame peptidico ad opera di enzimi, a pH=5. In questo caso queste MNP hanno dimostrato che possono svolgere una doppia azione sia per la diagnosi (o imaging) e contemporaneamente anche per il trattamento. Per via delle caratteristiche di SPION-CS-PEG-MTX-Cy5.5, si potrebbe fornire MTX alle cellule tumorali grazie ai loro recettori FA; sempre grazie all'endocitosi mediata da recettori FA, le cellule tumorali interiorizzano queste NP. Infine le SPION-CS-PEG-MTX-Cy5.5 hanno rilasciato MTX tramite legami peptidici idrolizzati da pH/proteasi, un enzima che scinde i legami peptidici, mostrando una migliore attività antitumorale con minori effetti collaterali. Questo drug delivery non ha sviluppato tossicità nelle NP prive di MTX.

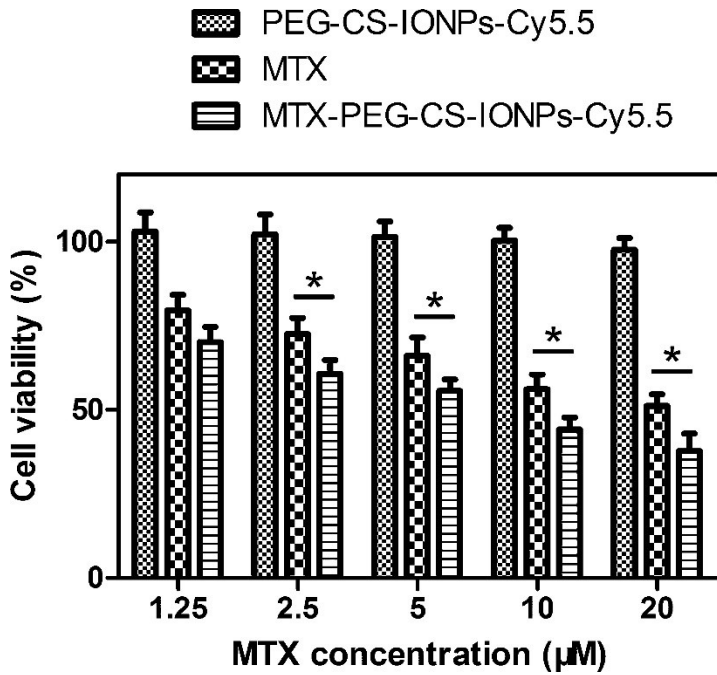


Fig 7.1.2. Andamento della vitalità delle cellule tumorali HeLa rispetto al tipo di drug delivery utilizzato; si può notare che rispetto a MTX free, MTX-PEG-CS-IONP(SPION)-Cy5.5 riesce a parità di concentrazioni di MTX ad uccidere una percentuale maggiore di cellule; anche in quantità maggiore di PEG-CS-IONPs-Cy5.5 (ovvero NP senza MTX). Nonostante ciò si può lo stesso notare una citotossicità comunque importante per via delle NP senza MTX (Zhenqing Hou et al., 2015)

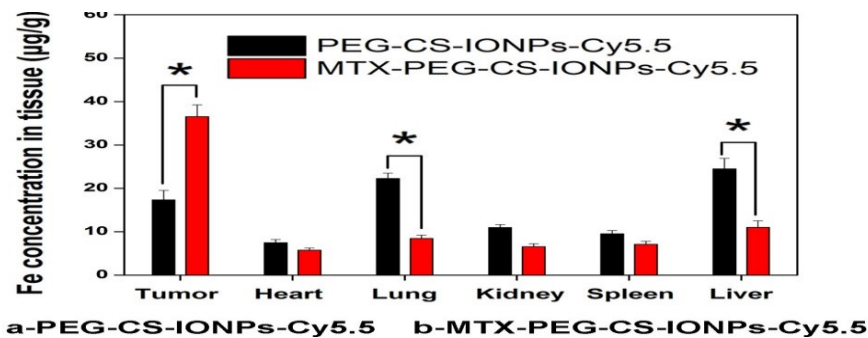


Fig 7.1.3. Profili di distribuzione dell'elemento ferro nei tumori e nei tessuti normali a 12 ore dopo l'iniezione (Zhenqing Hou et al., 2015)

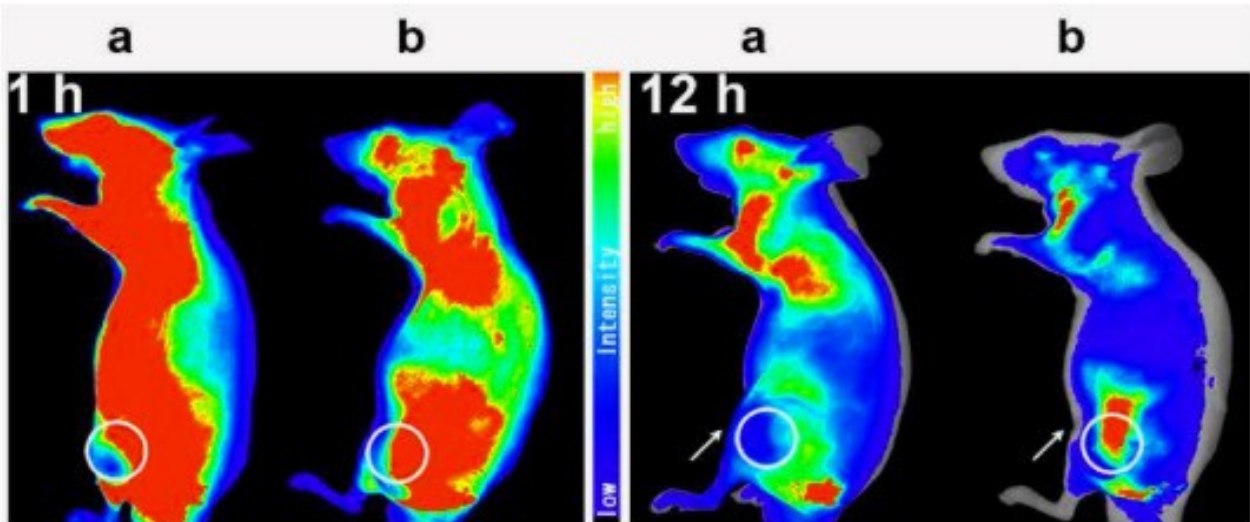


Fig 7.1.4. Imaging a fluorescenza in vivo dei topi portatori di HeLa dopo iniezione endovenosa di MNP rivestite con CS e PEG per dimostrare l'effetto di targeting MTX. Dalle immagini si può vedere l'effetto mirato di MTX. (Zhenqing Hou et al., 2015).

Sono state preparate due MNP utilizzando il guscio idrofilo CS/PAMAM per co-fornire DOX e MTX. I nanoparticolari sono stati sintetizzati innestando nel CS il PAMAM ed anche il PEG, in modo da sintetizzare MNP-CS-PAMAM-PEG. PAMAM di per sé è un dendrimero. In questo modo è stato ottenuto anche un chitosano dendritico, ovvero con una struttura molto ramificata simile ad un albero. In questo tipo di CS ci sono molti gruppi amminici e carbossilici superficiali che hanno la vera funzione di caricamento dei farmaci. In questo modo è stata ottenuta un'elevata efficienza di carico sia per DOX (95,96%) e MTX (67,91%). Questo tipo di nanocarrier ha dimostrato di avere un basso rilascio del farmaco nel flusso sanguigno, simulato con pH=7,4 ed invece un elevato tasso di rilascio farmaci nell'ambiente cancerogeno a pH = 4 - 5,4. Gli effetti emolitici di questa NP funzionalizzata, sono trascurabili sui globuli rossi umani (Human Red Blood Cells, HRBC), per cui queste MNP hanno una buona biocompatibilità. Oltre che questo le proteine presenti nei sistemi di circolazione sanguigna potrebbero attaccarsi alla superficie di questo nanocarrier fornendogli proprietà invisibili adatte a questo tipo di drug delivery. Questo esperimento è stato fatto su linea cellulare di adenocarcinoma mammario umano MCF-7 in vitro. Studi sulla citotossicità ha evidenziato una buona attività antitumorale in vitro. Tutti i dati hanno mostrato che gli effetti apoptotici del nanocarrier caricato con i 2 farmaci sono maggiori rispetto ai corrispondenti farmaci somministrati in forma libera. Gli studi hanno comprovato che c'è un alto assorbimento delle MNP all'interno delle cellule entro 3 ore. In più è stato utilizzato anche il modello murino per valutare i possibili effetti collaterali delle MNP caricate con i farmaci e quelli legati al drug delivery in forma libera. Si è concluso che non si sono presentati effetti collaterali importanti in questa terapia combinata, per cui può essere utilizzata per ulteriori applicazioni in vivo (Salehi et al., 2017).

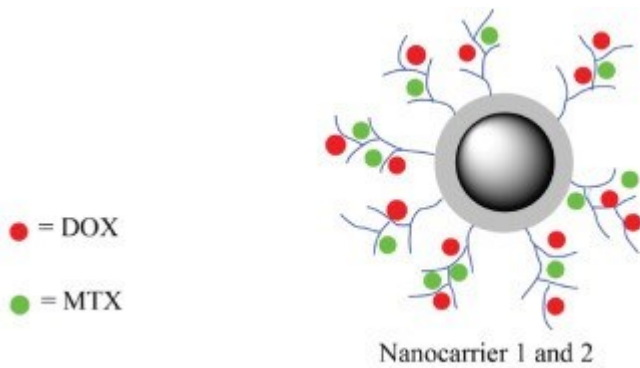


Fig 7.1.5. Viene riportato il caricamento di MTX e DOX su un nanocarrier di tipo MNP – CS - PAMAM - PEG (Salehi et al., 2017)

Nel 2014 Aniket S. Wadajkar et al. hanno riportato la sintesi di MNP rivestite con poli (*N*-isopropil acrilammide innestato con chitosano, ovvero PAC), ovvero di PAC-MNP con risposta pH e risposta termica per il rilascio mirato di DOX. Hanno anche dimostrato che l'ancoraggio dei peptidi R11 specifici del cancro alla prostata al trasportatore aumenta l'assorbimento della linea cellulare PC3, ovvero cellule di un adenocarcinoma prostatico di grado 4, cioè nel tumore che si trova in fase metastatica. Nonostante la presenza dei peptidi R11 specifici, l'assorbimento cellulare delle NP è stato ulteriormente aumentato grazie alla presenza di un campo magnetico di 1,3 Tesla (1,3T). In questa sperimentazione, si è visto come la DOX sulle PAC-MNP è stata rilasciata al livello massimo a 40°C durante la prova. Ciò ha causato la morte di più cellule del cancro alla prostata, confermando così il ruolo importante dell'ipertermia magnetica (MHT) sia nell'arrecare stress termico alle cellule tumorali per generare apoptosi, sia anche nel migliorare la cinetica stessa del rilascio del farmaco (dipendente dalla temperatura). L'apoptosi per stress termico è dovuto dal fatto che le cellule tumorali presentano una loro intolleranza naturale alle alte T. La compatibilità di PAC-MNP e R11-PAC-MNP è stata testata su cellule HDF e PZ-HPV-7 e i risultati hanno mostrato una vitalità superiore all'80% nell'arco di 24 ore, affermando la loro natura citocompatibile. La linea HDF è costituita principalmente da fibroblasti dermici primari umani normali; la linea PZ-HPV-7 è costituita invece da cellule umane dell'epitelio della prostata normali. I PAC-MNP hanno mostrato un'eccellente citocompatibilità fino a una concentrazione di 500 µg/ml; infatti i risultati hanno mostrato una vitalità superiore all'80% nell'arco di 24h. Inoltre, la coniugazione superficiale delle molecole R11 sui PAC-MNP non ha alterato la vitalità cellulare. Questi risultati indicano che il rivestimento degli MNP con polimeri migliorerebbe la loro citocompatibilità per usi futuri. La citotossicità nei confronti delle cellule sane è stata testata su linee cellulari HDF e PZ-HPV-7. Il tutto si è tradotto in efficacia terapeutica in vitro soprattutto per le PAC-MNP.

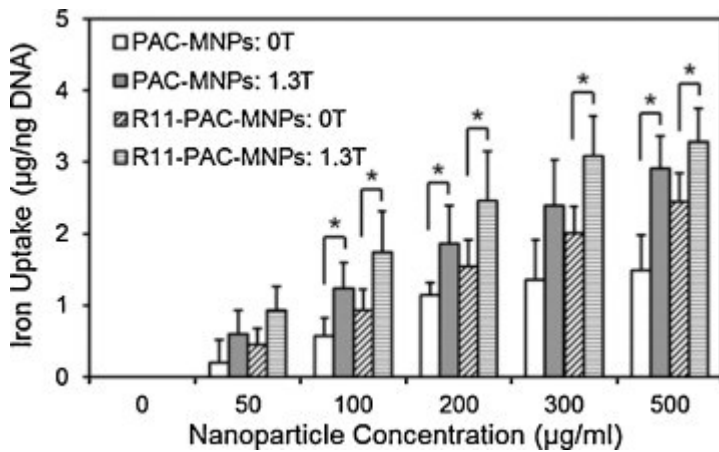


Fig. 7.1.6. Assorbimento cellulare di NP da parte delle cellule PC3 dopo 24 ore di incubazione delle NP in assenza e presenza di un campo magnetico (1,3 T), mostrando un maggiore assorbimento di particelle in presenza di campo magnetico e peptidi R11 (Aniket S. Wadajkar et al.).

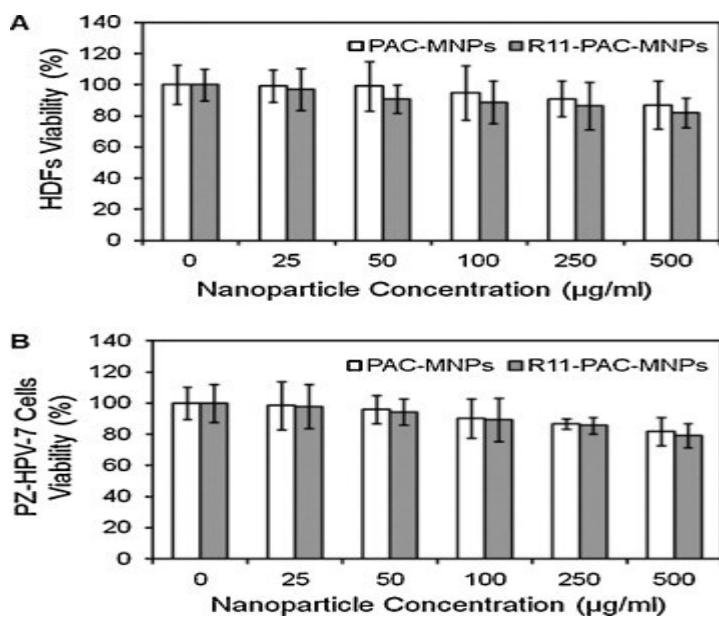


Fig. 7.1.7. Vitalità delle 2 linee cellulari sane di prova; non si sono riscontrati tassi di citotossicità importanti in vitro (Aniket S. Wadajkar et al.).



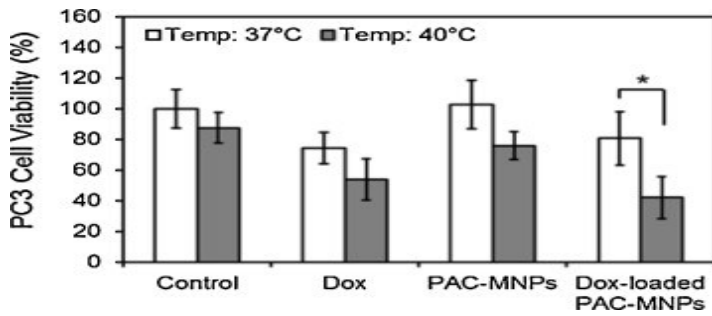


Fig. 7.1.8. Effetti di DOX libero, PAC-MNP vuoti e PAC-MNP caricati con DOX sulla sopravvivenza delle cellule PC3 a 37°C e 40°C, mostrando una mortalità cellulare significativa in caso di PAC-MNP caricati con DOX a 40°C rispetto a 37°C (Aniket S. Wadajkar et al.).

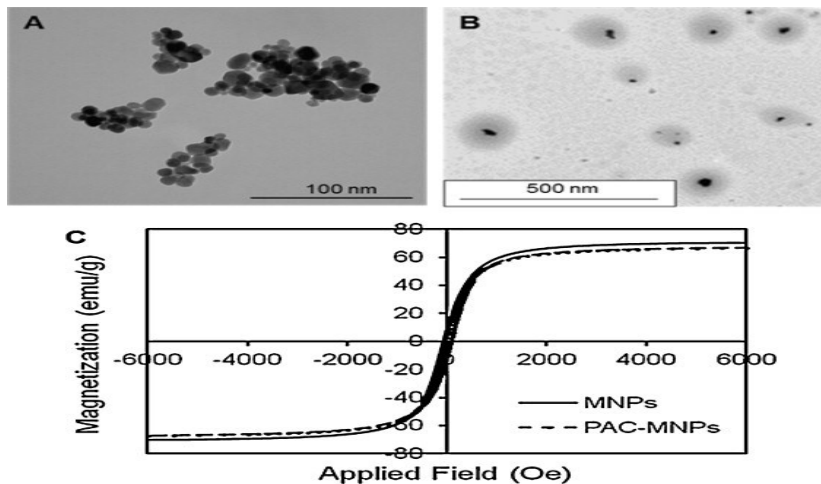


Fig. 7.1.9. (A) Immagine TEM degli MNP, diametro medio: 10 nm (B) Immagine TEM dei PAC-MNP, diametro medio: 150 nm che mostra la struttura core - shell (C) Anelli di isteresi magnetica di MNP nudi e PAC-MNP che mostrano comportamenti superparamagnetici (Aniket S. Wadajkar et al.).

In un lavoro recente, è stato fabbricato un nuovo nanocarrier (NC) per la somministrazione dell'acido diglutarico della curcumina (CG) che a sua volta è un precursore della curcumina (CUR). In questo caso sono stati utilizzati NC SPION rivestiti con oligosaccaridi di PEG-CS. L'assorbimento cellulare di questo NC è stato studiato su HT-29, una linea cellulare di un adenocarcinoma del colon retto (ACR) di 1° grado, ottenuta da una paziente di 44 anni (no metastasi). Il test viene fatto senza un'aggiunta di un'ulteriore colorazione fluorescente in quanto CG ha già di per sé proprietà fluorescenti, infatti la sua lunghezza d'onda di eccitazione ed emissione è rispettivamente di 400 e 470 nm. Il diametro di questo tipo di NP è di 130nm. Tutto questo è stato sperimentato in vitro e la citotossicità è stata valutata con il test MTT in vitro. La colorazione fluorescente è stata utile per vedere l'assorbimento di queste CG-PEG-CS-SPION. È stato visto che l'assorbimento cellulare (o internalizzazione, endocitosi) di queste CG-PEG-CS-SPION è più alto rispetto del CG assunto in forma libera. Anche la citotossicità espressa per mezzo di questo drug delivery, ha dimostrato un

incremento alto sempre nei confronti delle cellule HT-29 con tasso di vitalità cellulare residuo del 52% per una quantità di NP di 1µg/ml iniettate in soluzione. È da considerare che la citotossicità risulta più alta in concentrazioni di NP maggiori o al più uguali di 5 µg/ml fino a 40µg/ml. Infatti per queste valori di concentrazioni si vede una maggiore intensità di fluorescenza verde emanata da CG. Il pH risultante per un ottimale rilascio della sostanza è di 5,5. (Pranee Rojsitthisak et al., 2020).

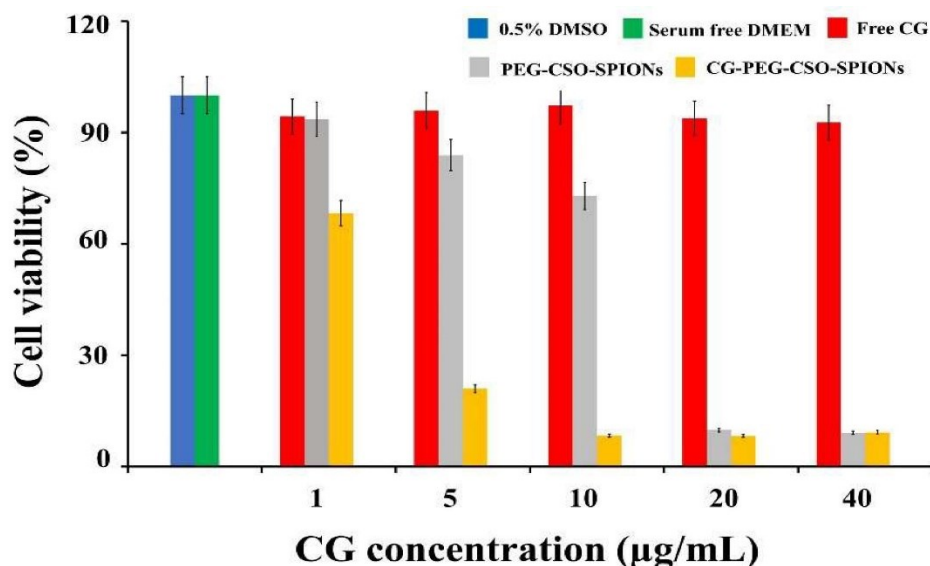


Fig 7.1.10. Andamento della vitalità cellulare cancerogena in base al tipo di drug delivery utilizzato e concentrazione di CG; si può notare che le CG-PEG-CS-SPION dimostrano di avere una tossicità sempre più alta, da 5 µg/ml fino a 40 µg/ml; mentre il CG somministrato in forma libera (Free CG) non presenta lo stesso incremento di tossicità (Pranee Rojsitthisak et al., 2020).

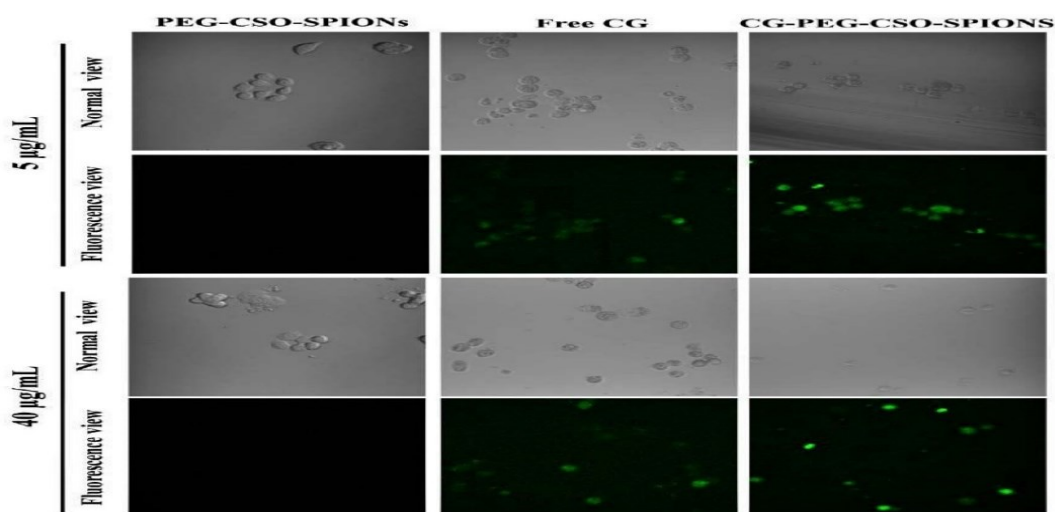


Fig 7.1.11. Osservazioni al microscopio sia ottico che a fluorescenza delle varie forme di drug delivery testate; in particolare si può vedere come le CG-PEG-CS-SPION emettono un colore



più fluorescente rispetto alla free CG; questo è dovuto al maggior assorbimento delle NP-CG nelle cellule tumorali rispetto che al free CG (Pranee Rojsitthisak et al., 2020).

È stato fatto anche un altro test con Tamoxifene (TAM) caricato su SPION rivestite con diversi polimeri. Il test MTT è stato fatto sulla linea cellulare MCF-7. È stata valutata la citotossicità a  $37 \leq T \leq 42$  °C ed è stata valutata come sempre, anche in base a variazioni di pH. In particolare tra le NP testate si è visto che le SPION-CS-PVP-BSA-TAM ovvero SPION rivestite con CS, polivinilpirrolidone (PVP), siero fetale bovino (BSA); sono state le più efficienti rispetto alle altre NP testate nella stessa ricerca. Il BSA viene utilizzato come rivestimento del nucleo SPION insieme al CS. Tutto ciò ha dimostrato la più alta quantità di citotossicità rispetto alle altre a  $T = 42^\circ\text{C}$  e  $\text{pH} = 4$  (Prabha e Raj, 2018).

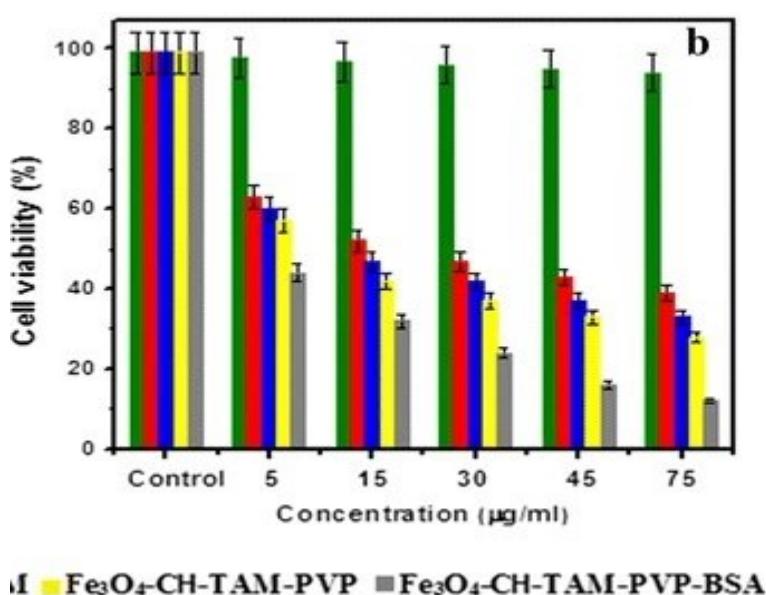


Fig 7.1.12. Viene riportato l'andamento della vitalità cellulare in base alle sperimentazioni che sono state fatte da Prabha e Raj, si riesce ad osservare la vitalità sempre più minore per le cellule tumorali MCF-7 che sono state trattate con SPION-CS (o CH) – TAM – PVP - BSA in vitro. In rosso, in blu e in verde sono riportati gli effetti della vitalità rispettivamente per i drug delivery di free TAM, SPION-CS-TAM, NP vuote, ovvero senza nessun caricamento di CG (Prabha e Raj, 2018).

L'utilizzo di CMCS come primo e secondo guscio per preparare un nanocarrier magnetico luminescente per la consegna di DOX viene fatto con un assemblaggio strato per strato. DOX e folato (FA) sono stati caricati nella fase sintetica finale; i punti quantici (QD) di Tellururo di Cadmio (CdTe) come agente di fluorescenza, sono stati caricati prima del secondo guscio (nanocarrier 5) sulla superficie degli MNP. In un lavoro simile CdTe/ZnS sono stati utilizzati come agenti di fluorescenza (nanoportatore 6). Entrambi i nanovettori 5 e 6 sono stati rivestiti con un doppio strato di CS, sono risultati sensibili al pH e altamente citotossici contro le cellule di un carcinoma polmonare umano di un maschio di 58 anni A549 e contro le cellule del HepG2. La maggiore inibizione delle cellule tumorali ha confermato gli effetti mirati del FA che hanno innescato l'endocitosi specifica mediata dal recettore FA

sulla membrana delle cellule tumorali. I QD CdTe altamente fluorescenti hanno offerto molti vantaggi nello studio in vitro. Tuttavia, preso da solo, il CdTe ha sempre avuto un'alta tossicità per via del metallo Cd e questo ne ha limitato le applicazioni in vivo. Per cercare di superare questo problema sono stati sintetizzati dei rivestimenti con gusci inorganici per migliorare la biocompatibilità. A questo proposito, un esempio di sintesi di questo tipo di NP è stata fatta sintetizzando con successo QD core-shell CdTe@ZnS stabilizzati e ricoperti con glutazione (GSH) con elevata fluorescenza e bassa tossicità (Ensafiet. al., 2015).

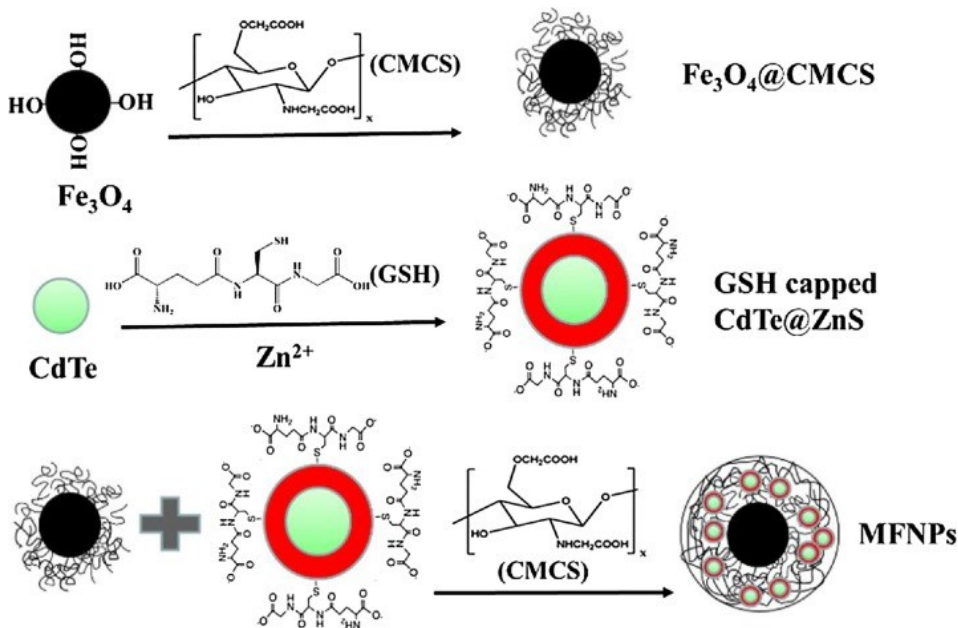


Fig 7.1.13. Questa è una sintesi di MNP@QD core-shell CdTe@ZnS con CMCS; per quello che può interessare in questa tesi è importante osservare la sequenza di come viene sintetizzata la MNP finale, ovvero MNFPs; non tanto la parte di biochimica delle molecole che entrano in gioco. (Hong Yin et al., 2017)

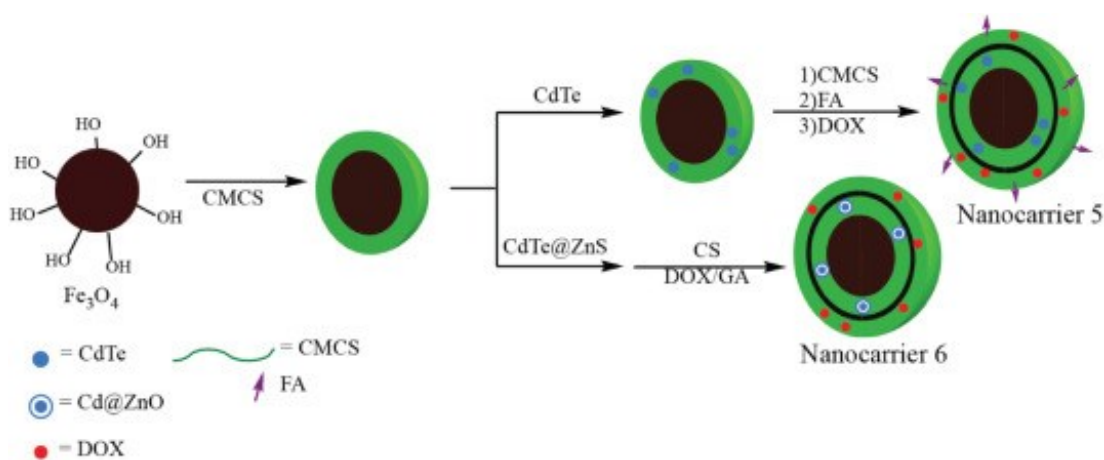


Fig 7.1.14. Altra immagine che rappresenta un'altra variante di MNP funzionalizzate con QD rappresenta i nanocarrier 5 e 6 (Ding et al., 2017)

Per valutare la citotossicità *in vitro* è stato fatto anche qui il test MTT standard sulle cellule BEAS-2B e A549. Le BEAS-2B sono cellule normali di pneumociti umani. Queste linee cellulari sono state incubate con DOX libero, MFNP caricati con DOX (MFNP-DOX) e MFNP puri (senza DOX) per 24 ore a diverse concentrazioni. È stato osservato che Le MFNP hanno una citotossicità molto bassa per entrambe le linee cellulari, ovvero oltre l'80% di vitalità cellulare (fino a 400 µg/ml) dopo 24 ore, il che implica una buona biocompatibilità di questo nanocomposito basato su CMCS. Quando trattate con DOX-MFNP, la vitalità delle cellule A549 è inferiore a quella delle cellule BEAS-2B alla stessa concentrazione da 50 µg/ml a 400 µg/ml. Alla concentrazione più alta testata (400 µg/ml), il 72% delle cellule BEAS-2B erano vive rispetto al 48% delle cellule A549. La maggiore inibizione delle cellule tumorali, anche qui ha confermato gli effetti mirati dell'FA che hanno innescato l'endocitosi specifica mediata dal recettore FA sulla membrana delle cellule tumorali. Per cui anche questo tipo di nanocarrier può essere un candidato (Hong Yin et al., 2017)

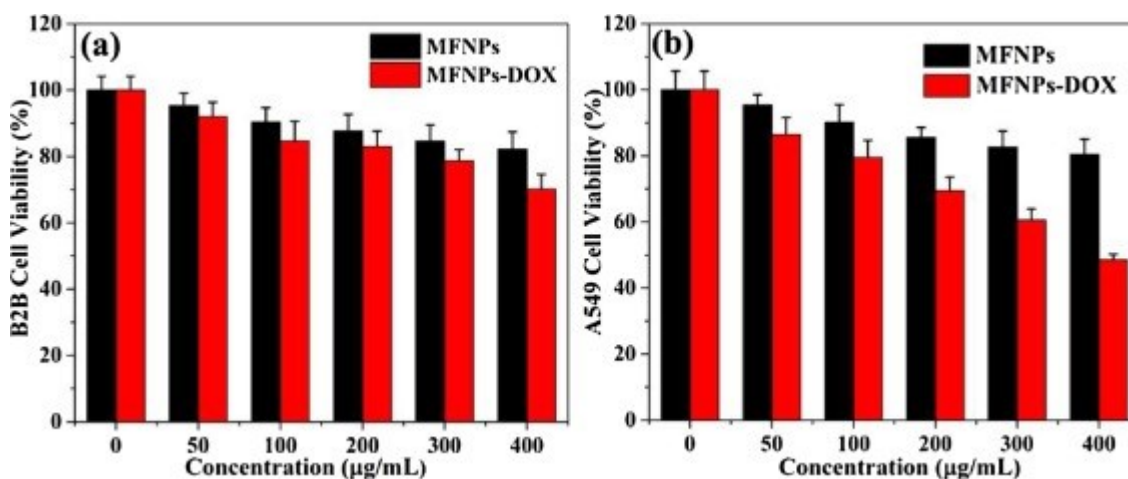


Fig 7.1.15. Citotossicità *in vitro* delle cellule (a) BEAS-2B e (b) A549 dopo il trattamento con MFNP vuote e MFNP caricate con DOX a diverse concentrazioni per 24 ore (Ding et al., 2017).

## 7.2. RISULTATI NEI LABORATORI E DESCRIZIONE DELLE NP RIVESTITE DI ALGINATO:

Per quanto riguarda le applicazioni con rivestimento in alginato, i gruppi anionici presenti in questo polisaccaride, lo hanno reso molto adatto per preparare vari tipi di idrogel. Sono stati prodotti SPION rivestiti con Alg caricati con DOX per l'ipertermia e la chemioterapia antitumorali. A causa del legame ammidico tra DOX e la matrice Alg, si è verificata una maggiore idrolisi nelle soluzioni acide e ha causato un rilascio del farmaco più elevato a pH = 5,0. Sono state sviluppate delle NP con Mag-Alg-PEG-FA-DOX, per cui è stato coniugato il PEG con Alg e FA. Mag sta per magnetite. Il diametro di queste NP è di circa 97 nm. Questo tipo di NP sono state sintetizzate per poter esaminare la risposta di cellule tumorali che sovra esprimono il recettore del folato. Il test è stato eseguito *in vitro* sulle linee cellulari di MDA-MB 231 e MCF-7 ed è stato visto che le NP dopo 24h di incubazione hanno espresso una

importante citotossicità nei confronti di tutte e due le linee, con 5µg/ml di DOX, con l'applicazione di un campo magnetico 0,5 Tesla (0,5 T). L'emolisi in tutte le concentrazioni non ha superato il 2% fino ad una quantità di NP di 2mg/ml; per cui si ha una biocompatibilità molto buona (Angelopoulou et al., 2019).

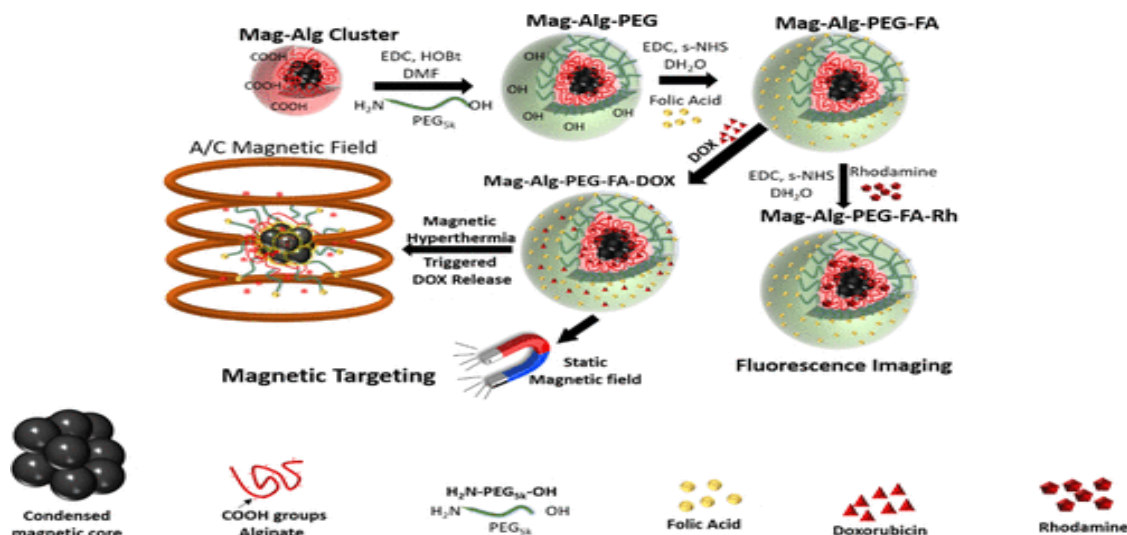


Fig. Vengono rappresentati i vari tipi di Mag-Alg-PEG, tra cui anche le Mag-Alg-PEG-FA-DOX. Il nucleo delle NP è condensato, cioè sono presenti più NP di magnetite che formano un unico nucleo (Angelopoulou et al., 2019)

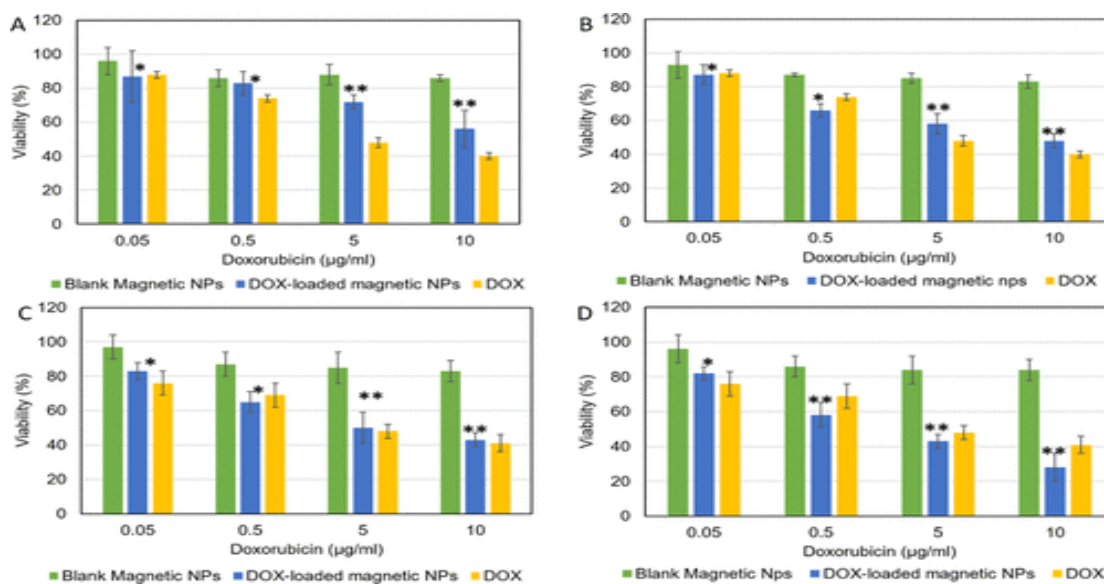


Fig. Vitalità di cellule tumorali MDA-MB 231 e MCF-7, anche qui vengono messi a confronto la Free DOX con la DOX caricata sulle NP, A-C in assenza e B-D in presenza di un campo magnetico (Angelopoulou et al., 2019)



Esperimenti anche in vivo hanno indicato un trattamento efficace per l'eliminazione dei carcinomi epatocellulari HepG2 trapiantati nella sottocute dei murini nudi BALB/c, questa tecnica di trapianto nello specifico viene chiamata xenotrapianto. Il test è durato 21 giorni. Le NP che sono state impiegate sono le SPION-4 con il magnete esterno. Esse sono strutturate come delle SPION rivestite con Alg e caricate con DOX, a formare SPION-Alg-DOX. La variazione del peso corporeo dei topi curati, come indicazione degli effetti collaterali dei farmaci, è stato un fattore vitale per valutare la tossicità dei sistemi di somministrazione dei farmaci per via endovenosa. A questo proposito in topi hanno mostrato un leggero calo di peso che è stato ripristinato dopo soli 2 giorni. Sono stati misurati anche i volumi tumorali e il peso tumorale dei tumori sottocutanei HepG2 asportati. I volumi del tumore dei topi trattati con SPION-4 caricato con DOX sono diminuiti in modo più evidente rispetto agli altri gruppi, ciò ha indicato che SPION-4 caricato con DOX è in grado di essere trasportato nelle posizioni tumorali designate e rilasciare rapidamente DOX con efficacia farmacologica nell'indurre la morte delle cellule del tumore. In vitro l'effetto citotossico più importante si è visto in 24h di incubazione.

L'introduzione di legami disolfuro (S-S o legame SS o ponte disolfuro) in SPION-4 ha notevolmente aumentato le sue capacità di rilascio, portando così ad elevate concentrazioni di DOX nel citoplasma e nel nucleo, sia in vitro che in vivo. In vitro l'effetto citotossico più importante si è visto in 24h di incubazione valutato tramite il test MTT; in più per determinare il tasso di assorbimento di NP intracellulare è stata fatta una colorazione blu di Prussia con osservazione al microscopio.

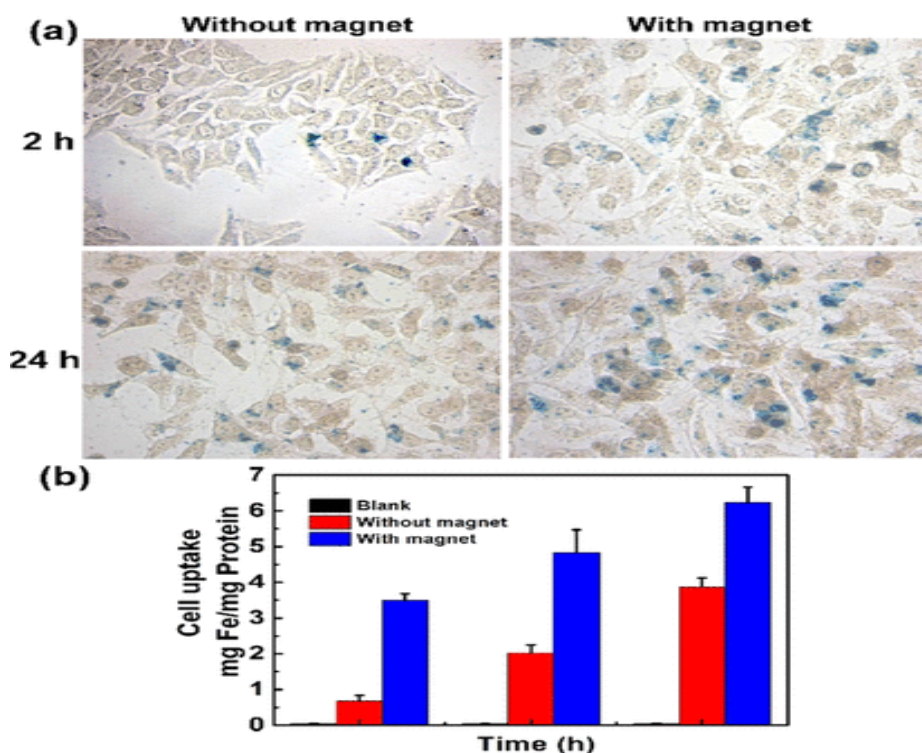


Fig. (a) osservazione al microscopio, reazione cromatica tra ferro intracellulare e blu di Prussia, tutto questo nelle HepG2, sia con l'azione del magnete e senza il magnete. La concentrazione della DOX è stata di 2µg/ml. Tutto questo per valutare il tasso di assorbimento intracellulare. (b) Un piccolo grafico sotto dove è stato rappresentato come varia l'assorbimento cellulare in funzione del tempo, con e senza campo magnetico esterno. (Peng & YiLiu et al. 2021)

I risultati hanno rivelato che il gruppo con magnete (SPION-4) ha mostrato la migliore efficacia terapeutica anche in vivo e non ha mostrato effetti collaterali evidenti sulle cellule del fegato sane. Inoltre è stato visto come le concentrazioni di DOX nei tessuti cardiaci sani, erano notevolmente inferiori rispetto a quelle che si hanno con la DOX libera, motivo per cui è stata anche ridotta la cardiotoxicità (Peng e YiLiu et al., 23 aprile 2021).

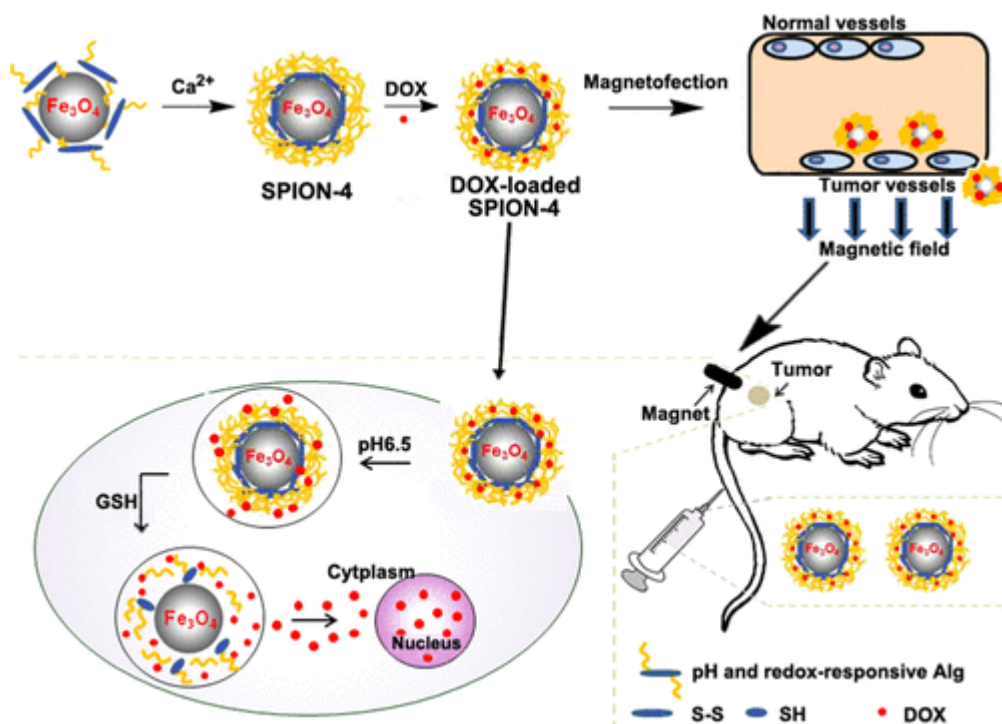


Fig. Schema in cui vengono mostrate che l'iniezione è stata fatta sulla coda, si nota che anche qui le NP vengono interiorizzate nelle cellule tumorali per endocitosi, il PH di rilascio farmaco è pari a 5 - 5,5. Si può osservare che le NP entrano nei vasi del tumore. (Peng & YiLiu et al., 2021)

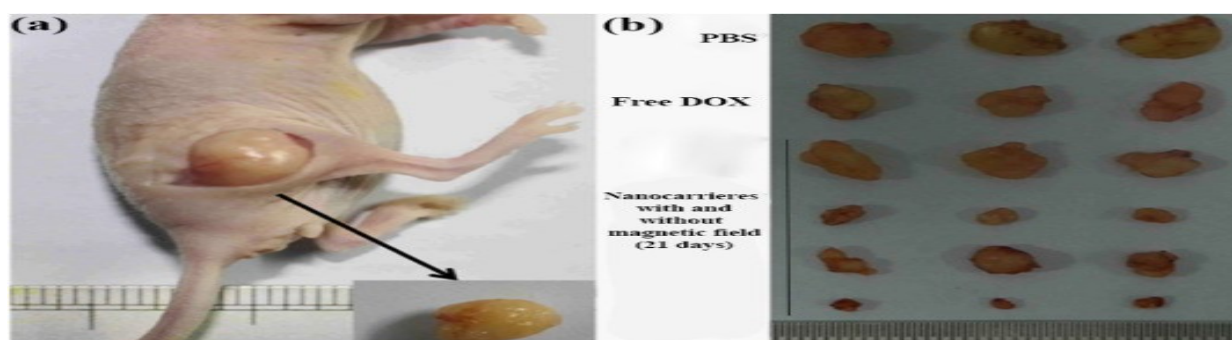


Fig. Vengono riportate le varie riduzioni dimensionali dei cancri al fegato nei murini, in particolare si può notare dall'immagine alla destra del lettore che nel caso di somministrazione della DOX in forma libera (free DOX), le dimensioni delle masse tumorali, si riducono in maniera molto contenuta; invece le dimensioni dei tumori solidi trattati con

l'utilizzo di NC con campi magnetici sono state ridotte in modo molto più importante (Peng & YiLiu et al., 2021)

In un altro studio, è stato fatto l'innesto di FA sullo SPION rivestito di Alg ed elevato carico di DOX, con l'applicazione di un campo magnetico alternato si potrebbe generare calore sufficiente sia per un'efficace terapia ipertermica che per il rilascio di DOX dal guscio di alginato per la chemioterapia. Inoltre, alle NP è stato attaccato il fattore folato (FA, o acido folico) per aiutare il sistema a entrare e rimanere dentro cellule tumorali per un tempo più lungo, in questo modo sono state sintetizzate  $Fe_3O_4$ -FA-Alg-DOX. Queste NP hanno la possibilità di raggiungere una  $T = 42^\circ C$  in 15 min (15'), sotto l'azione di un campo magnetico alternato di frequenza di 178 KHz. Le 2 prove sono state fatte su linee cellulari di Hep-G2, LU-1 e HeLa; di cui LU-1 si riferisce ad un adenocarcinoma polmonare primario di una paziente di 60 anni. Nei test in vitro e in vivo, è stata anche valutate le risposte anche delle  $Fe_3O_4$ -Alg-DOX e DOX free, successivamente sono state messe a confronto con quella delle  $Fe_3O_4$ -FA-Alg-DOX. In questo caso è stato utilizzato il test XTT; quest'ultimo si basa come il test MTT sulla riduzione del sale di partenza in formazano. Per lo studio in vitro, l'ambiente della cappa sterile è stata impostata a  $T = 37^\circ C$ , per favorire il rilascio della DOX, è stato mantenuto il  $pH = 5$ . La durata dell'incubazione per coltivare e far moltiplicare le cellule tumorali è stata di 48h. Dopo questo lasso di tempo sono stati determinati i valori di vitalità per le diverse linee cellulari con l'XTT. Dai risultati si è visto che le  $Fe_3O_4$ -FA-Alg-DOX hanno dimostrato un alta tossicità. L'esperimento in vivo è stato fatto sui topi di razza BALB/c, in cui la soluzione di cellule cancerose è stata iniettata nella pelle della coscia destra. La sperimentazione è stata condotta secondo le linee guida del National Institute of Health (NIH), sia per la cura che per l'utilizzo di questi animali. I topi portatori di LU-1 sono stati suddivisi in 4 gruppi, di cui un gruppo di controllo che è servito come riferimento, gli altri 3 gruppi invece sono stati utilizzati per determinare la citotossicità in vivo. In questi ultimi 3 gruppi è stato iniettato 20 $\mu$ L di soluzione di  $Fe_3O_4$ -FA-Alg-DOX e  $Fe_3O_4$ -Alg-DOX. Dopo 30' è stato generato un campo magnetico in AC da una bobina con 10 spire, dal diametro di 30 mm. La sua frequenza è stata di 178KHz, l'intensità di 80 Oe (80 Oersted), ovvero con una  $\vec{B} = 0,008 T$ , a sua volta che corrisponde a  $\vec{H} = 6366,2 A/m$ . Il campo è stato applicato quando il tumore ha raggiunto una dimensione di  $6 \times 6 mm^2$  ( $36 mm^2$ ) per 40'. Il processo di sperimentazione è stato ripetuto più volte ed ogni 3 giorni (3 gg), i topi sono stati pesati e i tumori sono stati misurati con un calibro. Il peso dei gruppi di topi non ha subito significative variazioni nemmeno in questo caso. Dopo 8 cicli di trattamento tutte le masse tumorali nei topi si sono ridotte in dimensioni, soprattutto nelle  $Fe_3O_4$ -FA-Alg-DOX. Anche in questo caso, questa efficacia si presuppone che sia dovuta al folato (FA) innestato nelle NP. Per cui da questi risultati si è potuto notare l'efficacia delle  $Fe_3O_4$ -FA-Alg-DOX anche in vivo soprattutto sul carcinoma polmonare LU-1. (Phuong Thu Ha & Thi Thu Huong et al., 2019).





Fig. Variazione del peso corporeo dei topi BALB/c; come si può notare dal grafico non ci sono state variazioni importanti (Phuong Thu Ha & Thi Thu Huong Le et al; 2019).

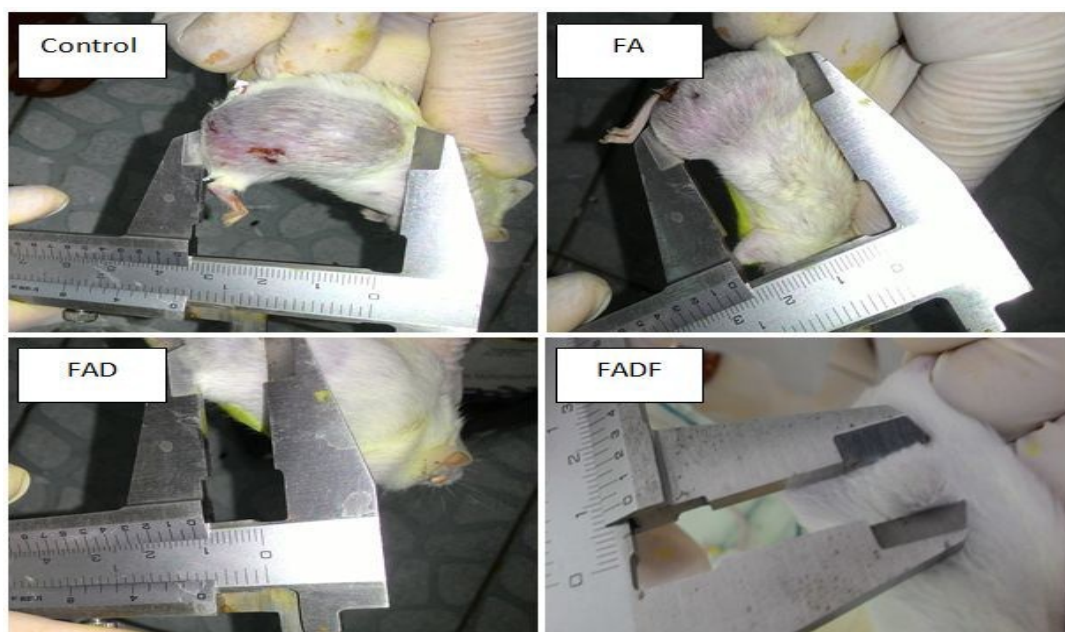


Fig. Variazione della dimensione del tumore costituito da cellule LU-1, il tutto è stato misurato con un calibro; sono state valutate le  $Fe_3O_4$ -Alg-DOX (FAD) e  $Fe_3O_4$ -FA-Alg-DOX (FADF) (Phuong Thu Ha & Thi Thu Huong et al; 2019).

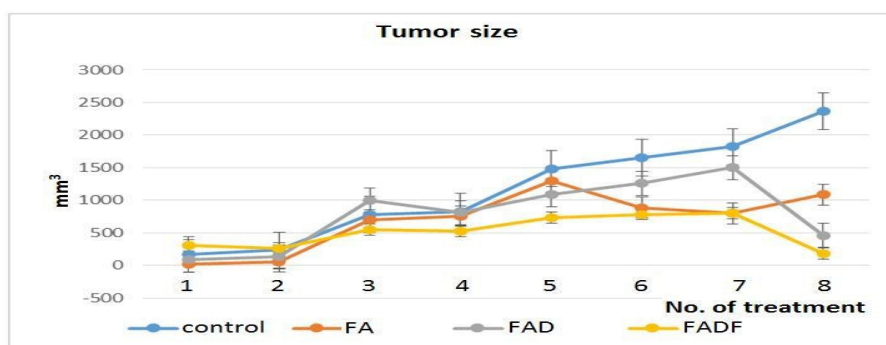


Fig. Cambio delle dimensioni del tumore durante i trattamenti in vivo soprattutto da parte delle FADF (Phuong Thu Ha & Thi Thu Huong et al; 2019).

Sono state sintetizzate NP con una nuova nanostruttura nucleo/guscio/corona; il nucleo come al solito è fatto di magnetite, in questo caso si ha una struttura multi-shell del nucleo. Il rivestimento (o guscio) è formato da una doppia struttura di Alg e fosfato di calcio (CaP) caricato con DOX. In più nel guscio è stato innestato l'acido arginilglicilaspartico (RGD), quest'ultimo va a formare la corona e svolge la funzione di ligando per il target cellulare. La NP risultante in questa sintesi è  $Fe_3O_4$ -CaP-Alg-RGD. Di per se la Np risulta biocompatibile; il ligando RGD ha come bersaglio i recettori  $\alpha_v\beta_3$  che si trovano sulle membrane delle cellule tumorali. L'incubazione per la semina cellulare nella cappa sterile è durata per 24h. È stato fatto il test in vitro sulla linea cellulare del carcinoma della vescica umano T-24. È stato visto

una migliore citotossicità nei confronti delle T-24, ciò anche in questo caso, non è solo dovuto all'applicazione di un campo magnetico per far aggregare meglio le NP alle cellule tumorali locali, bensì è dovuto anche al ligando RGD che è stato utilizzato nel test. (Yu-Pu Wang et al., 2017)

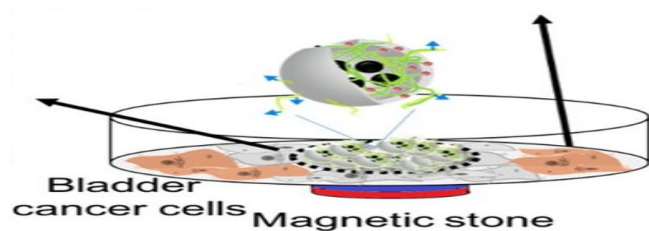


Fig. NP con una struttura multicore-shell; le sfere al centro è il nucleo multi-core, all'esterno si vede il rivestimento in Alg con gli ioni Ca, all'esterno del guscio di Alg ci sono i ligandi di RGD rappresentati con le frecce azzurre. Sotto c'è la coltura cellulare dove viene fatto il test di vitalità, sotto ancora c'è il magnete. (Yu-Pu Wang et al., 2017)

### 7.3. RISULTATI DI LABORATORIO E DESCRIZIONE DELLE NP RIVESTITE CON ACIDO IALURONICO

I ricercatori hanno sviluppato un nuovo NC magnetico core-shell basato su NP  $Fe_3O_4$  funzionalizzate con ammine, acido ialuronico (HA) innestato con diidrazide di acido adipico (HA-ADH) e caricato con DOX. La doxorubicina è stata caricata su questo nanocarrier grazie al collegamento idrazone acido-labile di HA-ADH. In più questo complesso agisce anche come doppio guscio. Ne risulta SPION-HA-ADH-DOX. Sono state utilizzate le HeLa. I risultati del test in vitro hanno suggerito un elevato assorbimento cellulare rispetto alle altre NP che non sono rivestite con HA; di conseguenza è venuta fuori una citotossicità molto buona. In particolare le NP ibride risultanti hanno le caratteristiche di buona disperdibilità in acqua e un accumulo specifico nelle cellule HeLa, in quanto HA-ADH ha anche la funzione di riconoscimento biologico specifico da parte dell'acido ialuronico. Il rilascio cumulativo in vitro di DOX dalle NP ibride risultanti è stato significativamente accelerato a un pH leggermente acido di 5,0-6,0. (Xuefei Huang et al., 2012). L'efficacia antitumorale in vivo nei topi BALB/c nudi, ha ulteriormente confermato l'effetto. È stato anche visto che le SPION-HA, per via della loro alta specificità, potrebbero essere utilizzate anche come strumento di imaging mirato con RM, al fine di visualizzare il cancro e nel mentre guidare il processo di terapia del drug delivery. Questo è dovuto anche alla coercitività nulla di queste NP che suggerisce proprio che il loro potenziale SPM può anche essere utilizzato per tale scopo. Ovviamente le NP sono state stabili. Infatti le loro dimensioni idrodinamiche sono rimaste sempre si 120 nm anche dopo 2 settimane, sempre grazie all'HA. In pratica questo vuol dire che anche a distanza di tempo non si sono aggregate. Il rilascio di DOX, può essere ancora più maggiore in presenza dell'enzima ialuronidasi (HAasi), ovviamente il motivo viene attribuito alla degradazione dell'HA ad opera della presenza di questo enzima. L'iniezione endovenosa (iniezione E.V.) è stata fatta sulla coda dei topi portatori di cellule HeLa depositate sul fianco destro e sono state iniettate 6,92 mg/ml di soluzione di NP-HA-

DOX. L'efficacia antitumorale in vivo dei topi ha ulteriormente confermato l'effetto. Anche questo è stato visto per la linea cellulare HeLa. (Faquan Yu & Ming Wu et al., 2019).

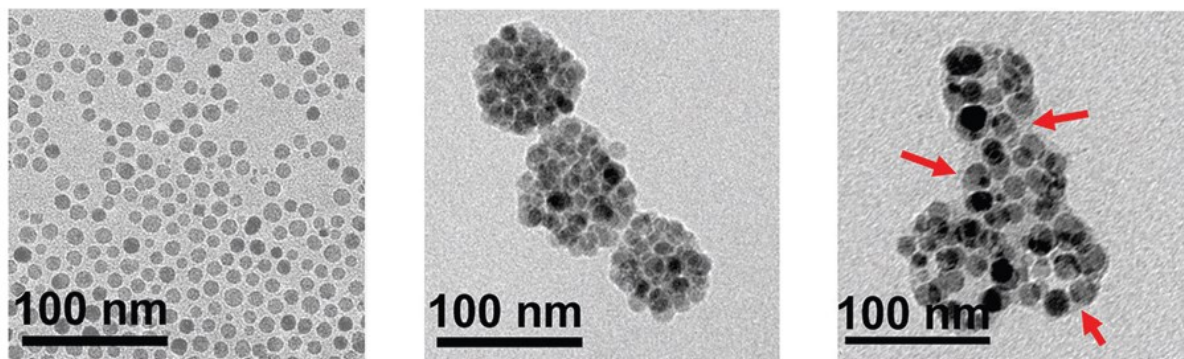


Fig. Immagini TEM che rappresentano la distribuzione delle NP, l'ingrandimento in questo caso è stato fatto a 100 nm. Alla sinistra del lettore si può osservare le IONP ovvero NP a ossidi di ferro; al centro ci sono i nanocarrier raccolti in dei gruppi che sono stati caricati con DOX; a destra invece ci sono i nanocarrier rivestiti con HA e caricati con DOX. (Faquan Yu & Ming Wu et al., 2019).

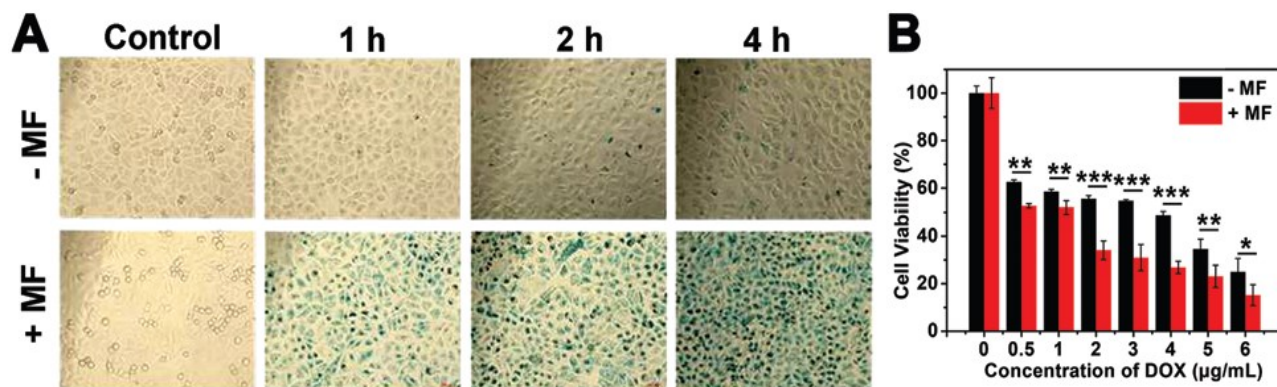


Fig A. Utilizzo del Blu di Prussia per visualizzare la quantità di NP-HA-DOX che sono state assorbite dalle cellule HeLa sia in presenza di campo magnetico (+MF) che in sua assenza (-MF). Fig B. Andamento della vitalità delle cellule tumorali HeLa in base alle concentrazioni DOX espresse in µg/ml caricate sulle NP-HA, con (+MF) e senza l'applicazione di un campo magnetico (-MF). L'andamento della vitalità con l'applicazione del MF è rappresentata dai rettangoli rossi in verticale, mentre l'andamento della vitalità senza campo magnetico è rappresentato dai rettangoli neri (Faquan Yu & Ming Wu et al., 2019).

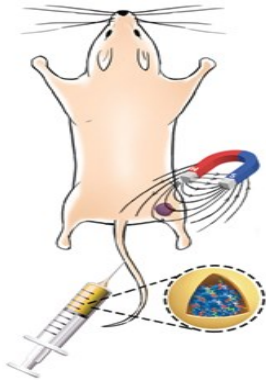


Fig. Illustrazione schematica dell'iniezione nella coda del topo BALB/c di NP-HA-DOX e il tumore che sta nella sottocute del fianco destro del topo con applicazione del campo magnetico; si nota NC in basso a destra al topo (Faquan Yu & Ming Wu et al., 2019).

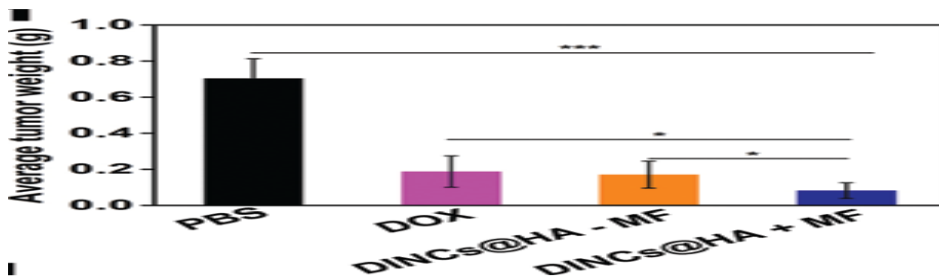


Fig. Variazione del peso del tumore sottoposto a trattamento con PBS, DOX free, NP-HA-DOX (-MF) e NP-HA-DOX (+MF); si può notare come la dimensione del tumore sia sempre più diminuita con l'applicazione anche qui di NC (Faquan Yu & Ming Wu et al., 2019).

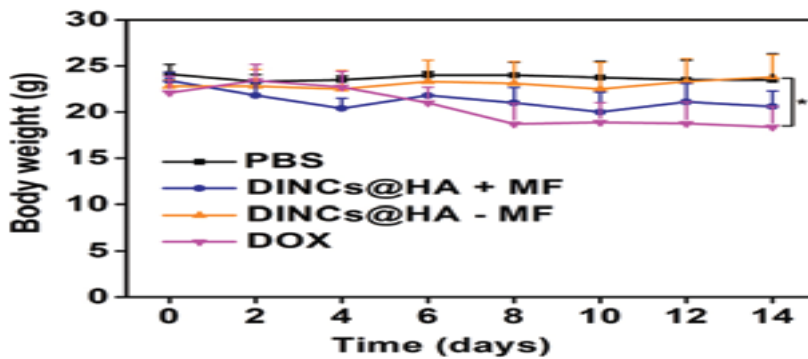


Fig. Variazione del peso corporeo nei topi in funzione del tempo e dei tipi di drug delivery utilizzati (Faquan Yu & Ming Wu et al., 2019).



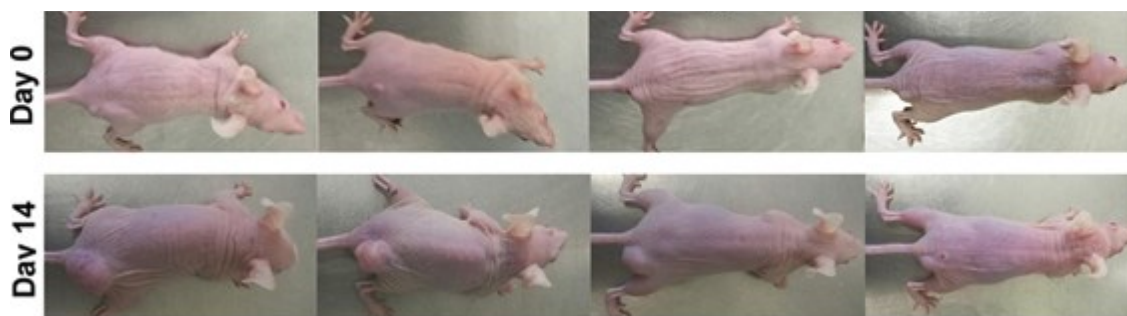


Fig. Variazione della massa tumorale nella sottocute sul fianco destro del topo: il 14esimo giorno, dalla terza figura alla quarta procedendo da sinistra a destra, si può notare la variazione del volume tumorale dopo le iniezioni delle soluzioni di NP. Dalla prima alla seconda figura sono presenti rispettivamente le variazioni dei volumi tumorali prima dell'iniezione della DOX free e dopo l'iniezione della DOX free. Al giorno 0 è ovvio che non si vede nessun tipo di accrescimento (Faquan Yu & Ming Wu et al., 2019).

#### 7.4. RISULTATI E RICERCHE DI NP RIVESTITE CON DESTRANO

Uno studio del 2019 ha riportato un nanocarrier caricato con entrambi i farmaci Cetuximab (CET o Erbitux® o C225) e DOX, sempre a base di magnetite rivestita di destrano (DEX o dextrane), per distruggere le cellule del tumore al polmone (A549). Per cui in questa sintesi vengono formate NP-DOX-CET. Cetuximab migliora il target per i recettori EGFR delle cellule tumorali. La prova in laboratorio è stata fatta in vitro sulla linea cellulare NSCLC A549. Nei risultati di citotossicità in vitro si è potuto notare una diminuzione significativa del tasso di vitalità delle cellule tumorali sottoposte a test con le NP-DOX-CET rispetto alle NP-DOX.

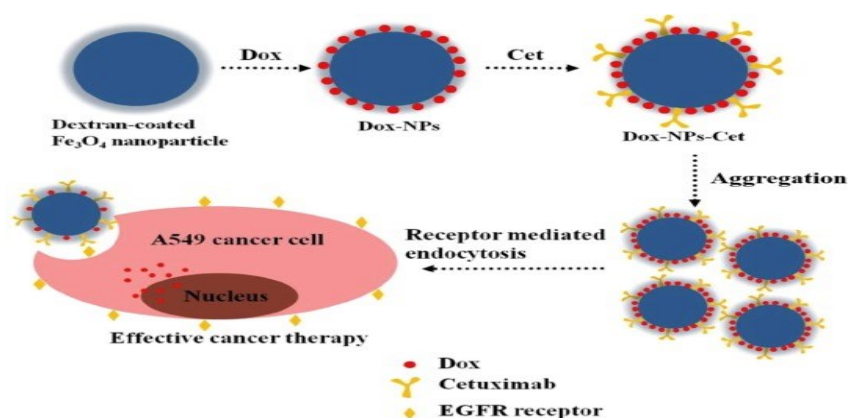


Fig. Viene mostrato la struttura principale delle NP-DOX-CET (Le Ma & Mingwei Chen et al., 2019)

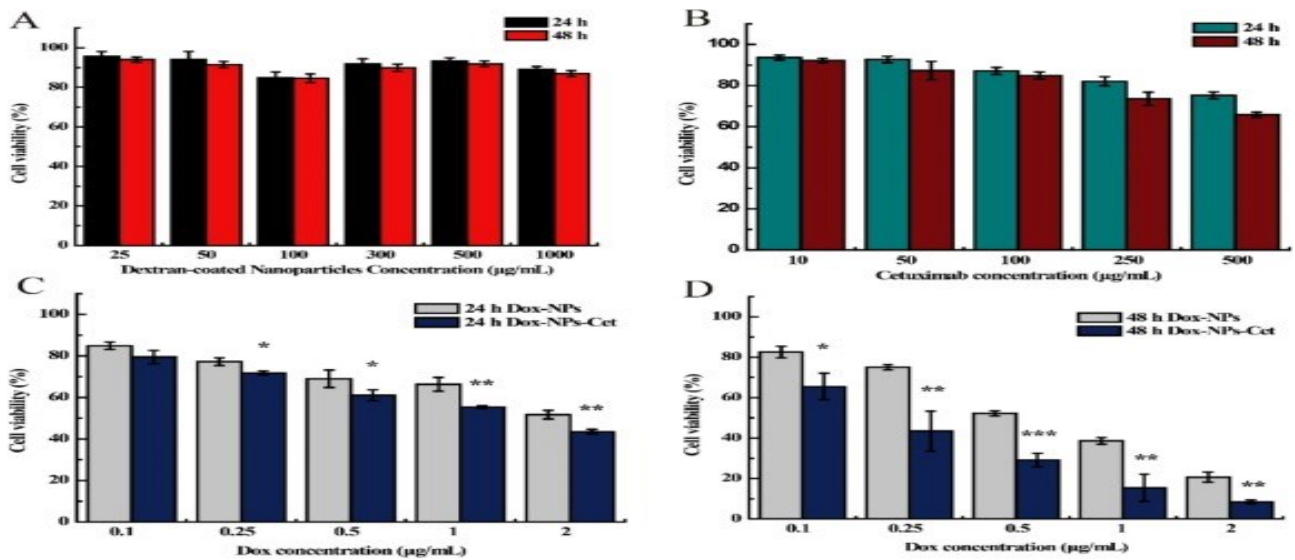


Fig. Vengono riportati i tassi di vitalità delle cellule NSCLC A549 in vitro, si può notare anche a concentrazioni variabili di DOX che le NP-DOX-CET si sono dimostrate più efficienti nella citotossicità rispetto alle NP-DOX. (Le Ma & Mingwei Chen et al., 2019)

## 7.5. RISULTATI DELLE RICERCHE E DESCRIZIONE DELLE NP INCAPSULATE CON DERIVATI DI CELLULOSA:

Nel 2017 sono stati utilizzati idrogel a base di derivato di cellulosa basati sul complesso di inclusione tra  $\alpha$ -ciclodestrina e NP caricate con idrossicamptotecina (HCPT). Quest'ultimo è un altro farmaco antitumorale. Sono stati ricoperti da carbossimetilcellulosa (CMC) ed è stato anche aggiunto l'acido betulinico (BA); tutto quanto è stato preparato in un mezzo acquoso. La  $T$  di transizione sol-gel è stata decisa dalla concentrazione tra le NP e l' $\alpha$ -ciclodestrina ( $\alpha - CD$ ). La transizione da sol-gel reversibile è legata ad un valore specifico di  $T_{sol-gel}$ , ovvero la temperatura alla quale si può passare dallo stato di sol a quello di gel. Se viene indicata  $T_{gel-sol}$ , ci si sta riferendo alla  $T$  necessaria per effettuare il passaggio inverso a quello precedente. Ecco per cui spiegato anche il motivo del fatto che gli idrogel sono termosensibili. Il complesso CMC-BA svolge la funzione di profarmaco, con il 29,5% di BA. Gli idrogel sono state preparate con reazioni specifiche di inclusione tra  $\alpha - CD$  e le catene PEG di CMC-BA. Queste reazioni avvengono all'esterno delle NP. L'idrogel che si ottiene è formato da una struttura porosa, indispensabile per un idrogel per permettere la diffusione dei farmaci. La sintesi viene molto condizionata dalla concentrazione delle  $\alpha$ -CD, infatti si è visto che all'aumentare della concentrazione di  $\alpha$ -CD il raggiungimento della fase di gel diventa più complicato, per cui aumenta il tempo di gelificazione ed anche la  $T_{sol-gel}$  aumenta. I test in vitro e in vivo sono stati fatti su cellule originarie di un carcinoma di Lewis al polmone di un topo C57BL a sua volta, portatore di un tumore derivante da un impianto di questo carcinoma (cellule Lewis Lung Carcinoma LLC). Tutti e 2 i test sono stati eseguiti per 3 volte. Per il test in vitro si è visto che con un aumento della  $T$  di incubazione da 25°C a 37°C, gli idrogel hanno mostrato un'accelerazione del loro tasso di rilascio.

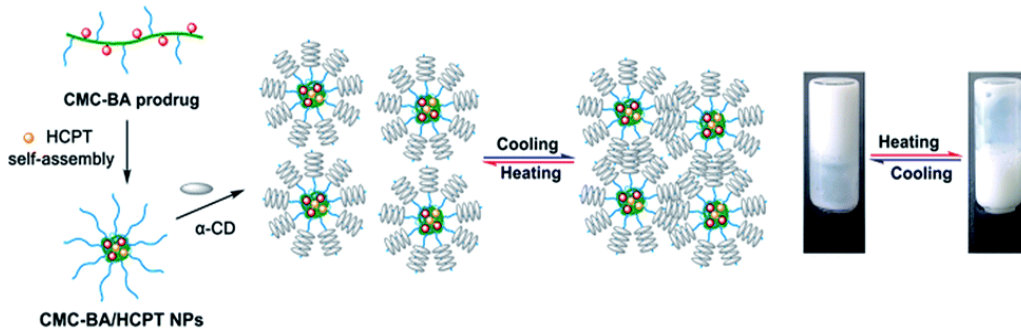


Fig. Schema dell'idrogel termosensibile costituito da NP CMC-BA / HCPT e α-CD. (Lin Dai et al., 2017)

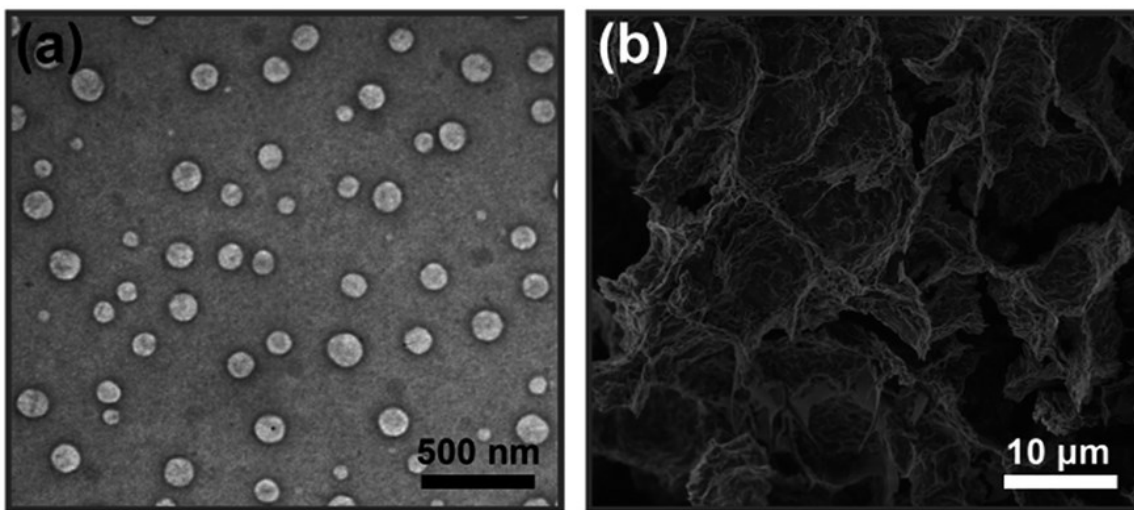


Fig. (a) immagine al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di NP CMC-BA / HCPT e (b) immagine al microscopio elettronico a scansione (SEM) dell'idrogel CMC-BA / HCPT che è stato sottoposto a crioessiccamento (o liofilizzazione). Vengono riportate le 2 immagini per far capire le differenze in 3D di una MNP rispetto a un idrogel. (Lin Dai et al., 2017)

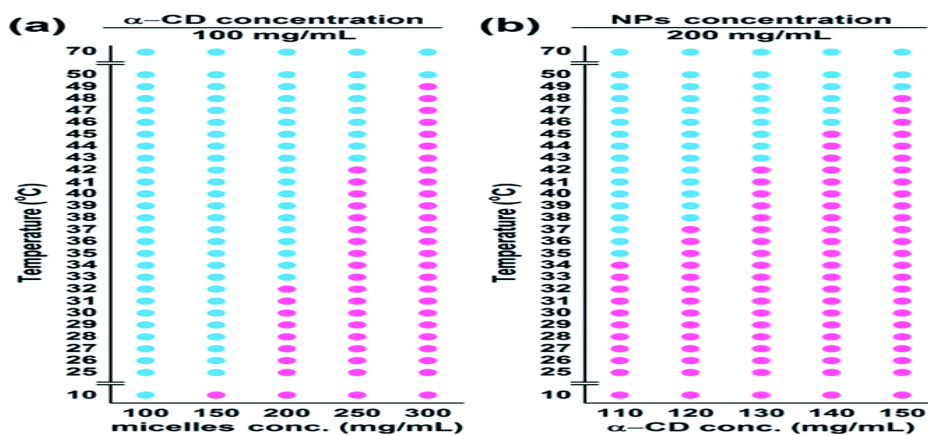


Fig. Comportamento della transizione sol-gel termosensibile, si nota come varia in base alla T (Lin Dai et al., 2017)



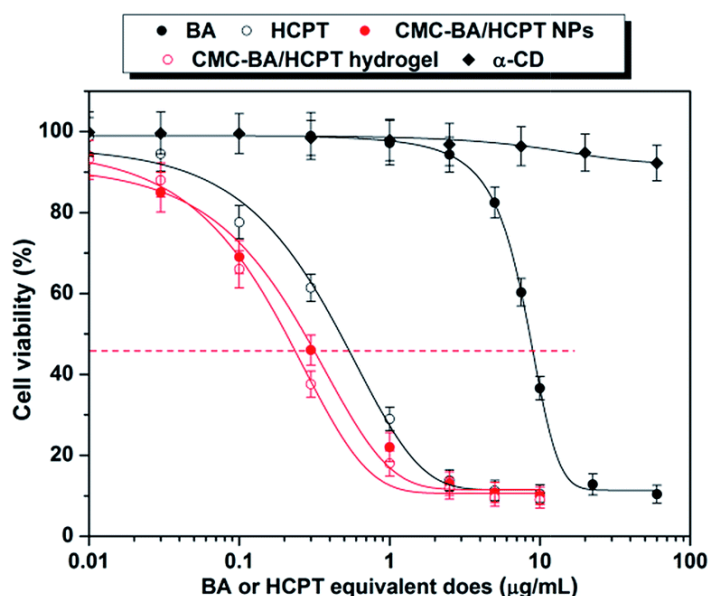


Fig. Viene riportato il grafico della vitalità cellulare espressa dalle cellule tumorali dopo il rilascio dei vari tipi drug delivery. Soprattutto quello che interessa di più è l'andamento della vitalità cellulare espresso dopo che sono state somministrate le CMC-BA/HCPT-NPs; infatti si nota bene che gradualmente il livello di vitalità (%) cala a picco in corrispondenza di una quantità HCPT  $\geq 2\mu\text{g/ml}$ . Si ricorda che tutto questo è stato testato sulle cellule di LLC (Lin Dai et al., 2017).

Per quanto riguarda il test in vivo, le cellule LLC sono state iniettate sempre per xenotrapianto nella regione del fianco ascellare, sempre nella sottocute. I topi C57BL/6 femmina di età compresa tra 6 e 7 settimane sono stati divisi in 6 gruppi casuali. Dopo che è stata fatta l'iniezione. Per quanto riguarda la somministrazione delle sole  $\alpha$ -CD non ha mostrato nessun effetto terapeutico, quello fatto con BA-HCPT in forma libera ha avuto un certo grado di efficacia, ma solo per pochi giorni; subito dopo il tumore ha ricominciato a crescere in modo incontrollato. È stato visto che i topi trattati con le CMC-BA/HCPT-NPs e con l'idrogel senza NP ovvero il CMC-BA/HCPT, hanno mostrato un tasso di sopravvivenza più alto inibendo la crescita tumorale. In più non sono stati riscontrati segni di tossicità sistemica nel comportamento generale, nell'appetito e nel peso corporeo monitorati. I motivi per cui questi 2 drug delivery si sono mostrati determinanti in questo esperimento sono dati dal fatto che le CMC-BA/HCPT-NPs hanno dimensioni appropriate con  $D \sim 150 \text{ nm}$  che contribuisce a portare all'accumulo nel sito del tumore; viene migliorata la scarsa solubilità del farmaco; questo tipo di NP con idrogel e gli idrogel senza NP hanno un migliore rilascio del farmaco. (Lin Dai et al., 2017)

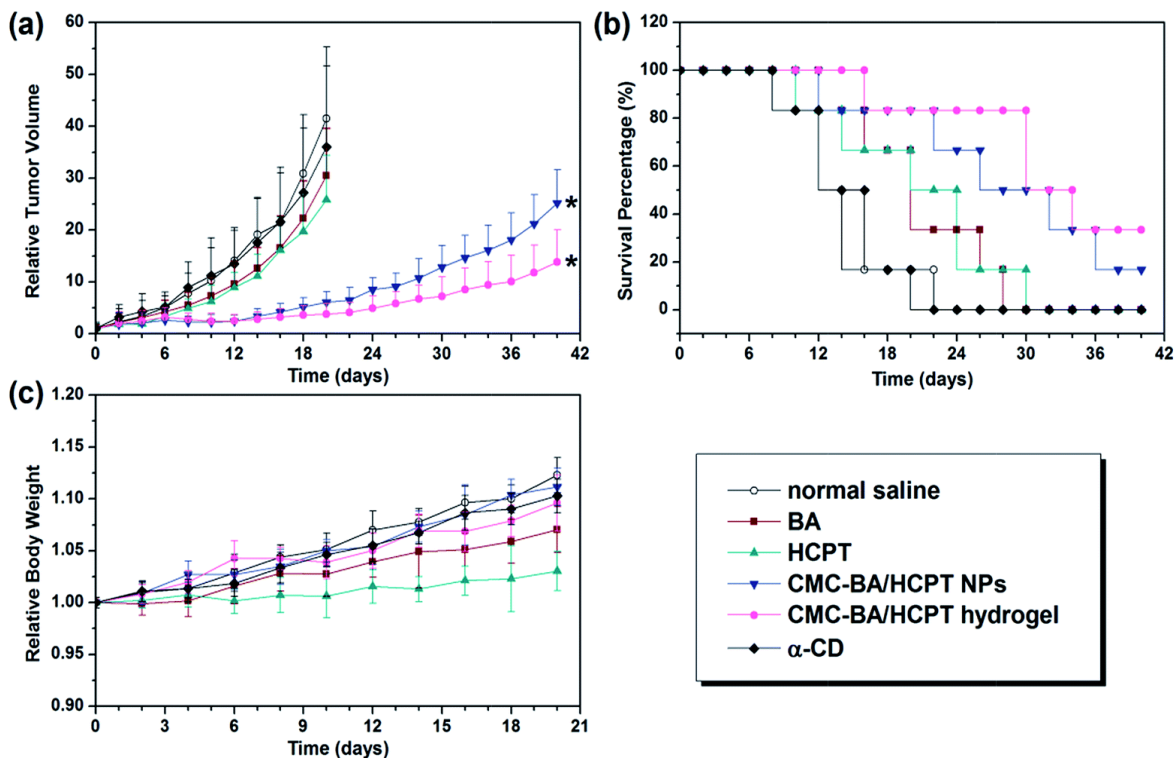


Fig. Attività antitumorale in vivo dei campioni nel modello murino sottocutaneo di LLC. (a) Volumi tumorali dei topi durante il trattamento con gruppi diversi. (b) Sopravvivenza dei topi sottoposti a trattamenti diversi. (c) I pesi degli animali sono stati registrati una volta alla settimana ed espressi nell'arco dei 20 giorni di osservazione. (Lin Dai et al., 2017)

Nel 2018 Khan et al. ha sviluppato un tipo di MNP, in cui si sfrutta il potenziale inibitorio del farmaco LCS-1. Di per sé è un inibitore dell'enzima superossido dismutasi 1 (SOD-1), in questo modo contribuisce ad indurre l'apoptosi di cellule tumorali. In questo caso è stata presa in considerazione la linea cellulare di cancro colon retto di un maschio adulto HCT116 (colon rectal cancer HCT116 o CRC-HCT116). Anche in questa prova, lo sviluppo di NC è motivato dal fatto che l'inibitore LCS-1 in forma libera, ha una bassa solubilità in acqua; per cui è stato testato questo tipo di NC per tentare di superare i limiti di LCS-1 in forma libera. Nella struttura di NC, non può mancare il nucleo di magnetite rivestito più gusci polimerici: aminocellulosa (AMC), PAMAM e con l'innesto della catena paraben-PEG (pPEG); in tutto questo è stato caricato in ultimo LCS-1 mediante legami idrogeno e interazioni  $\pi$ - $\pi$ . Qui AMC e altri polimeri applicati possono migliorare il tempo di circolazione sanguigna di LCS-1-NC grazie alla loro eccellente idrofilicità. NC, ancora una volta sono stati sintetizzati per co-precipitazione, hanno mostrato in  $D=8-10$  nm. LCS-1-NC ha mostrato un rilascio prolungato con circa l'85% del farmaco rilasciato in 24h. Sia NC vuoto rivestito con corona e quello non rivestito con corona, hanno mostrato biocompatibilità con le cellule sane del rene embrionale umano HEK 293, grazie principalmente allo strato di AMC. Il test sulla biocompatibilità è stato eseguito per 3 volte, gli stessi risultati sono riproducibili.

L'analisi qualitativa dell'assorbimento cellulare di NCs caricate con FITC (Isotiocianato di Fluoresceina), una sostanza fluorescente verde, utilizzando cellule HCT 116 è stata studiata mediante microscopia confocale.

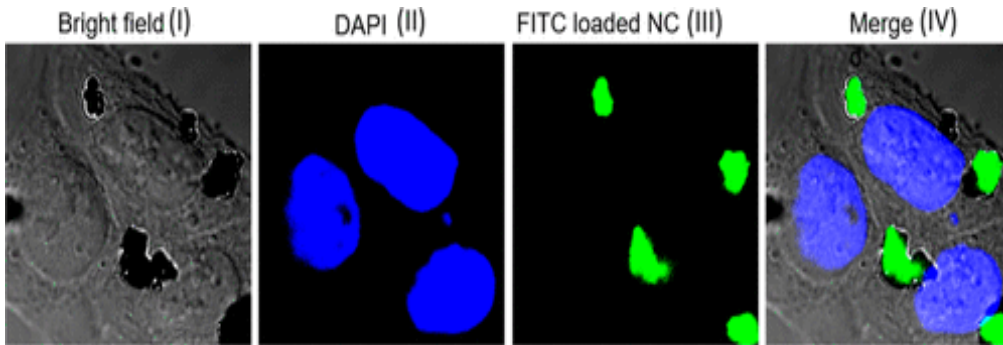


Fig. Queste sono le immagini della microscopia confocale, la colorazione verde è dovuta dal FITC, questa sostanza fluorescente in questa rilevazione, rappresenta le NC presenti all'interno delle cellule; i nuclei sono colorati con blu DAPI sono i nuclei delle cellule. (Khan et al., 2018)

Questi risultati hanno confermato che NC preparati possono essere sufficientemente assorbiti dalle cellule HCT 116. Inoltre il test MTT ha mostrato una tossicità significativa nei confronti della linea cellulare colon rectal cancer (CRC) carente di BLM sottoposta a trattamento di NC-LSC-1.

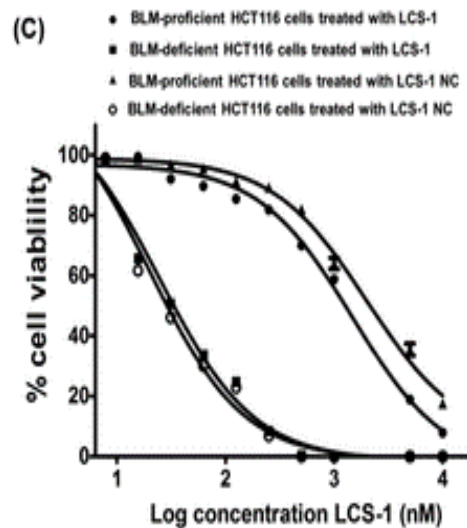


Fig. Andamento della vitalità cellulare nelle HCT 116 carenti e non carenti di BLM in base sia alle concentrazioni sia anche ai vari tipi di drug delivery. Si nota come le HCT 116 carenti di BLM siano più sensibili alla tossicità (Khan et al., 2018).

## 7.6. RISULTATI DELLE RICERCHE E DESCRIZIONE DELLE NP RIVESTITE CON AMIDO:

In uno studio del 2016 condotto da Saikia et al., la superficie delle NP di  $Fe_3O_4$  è stata decorata con amido amminato e ZnO incorporato e caricate con CUR come farmaco modello. L'amido amminato/ZnO contribuisce al rilascio della CUR. In più è stato innestato FA con l'obiettivo di migliorare il target tumorale, l'assorbimento cellulare e generare significative ROS ovvero Reactive Oxygen Species. La citotossicità delle NP caricate con il farmaco è

stata analizzata mediante test MTT in linfociti umani, linee cellulari HepG2 e MCF7. L'efficienza di assorbimento cellulare e la generazione di specie reattive dell'ossigeno con le NP caricate con il farmaco sono state stimate nelle linee cellulari HepG2. La capacità di assorbimento delle NP marcate con FITC è stata valutata mediante microscopio a fluorescenza. Lo studio sulla vitalità cellulare è stato effettuato utilizzando il test MTT convenzionale. Le MNP sono state preparate mantenendo fissa la concentrazione di genipina (3%) e variando le concentrazioni di ZnO dallo 0 allo 0,5%. È stato notato che l'efficienza di incapsulamento del farmaco aumentava marginalmente con l'incorporazione di ZnO nel sistema. Ciò potrebbe essere attribuito alla crescente interazione tra i gruppi idrossilici superficiali di ZnO e la curcumina. L'inserimento di acido folico non ha influenzato molto l'efficienza di incapsulamento del farmaco. I dati TEM hanno mostrato che il diametro medio delle NP è di 30 nm.

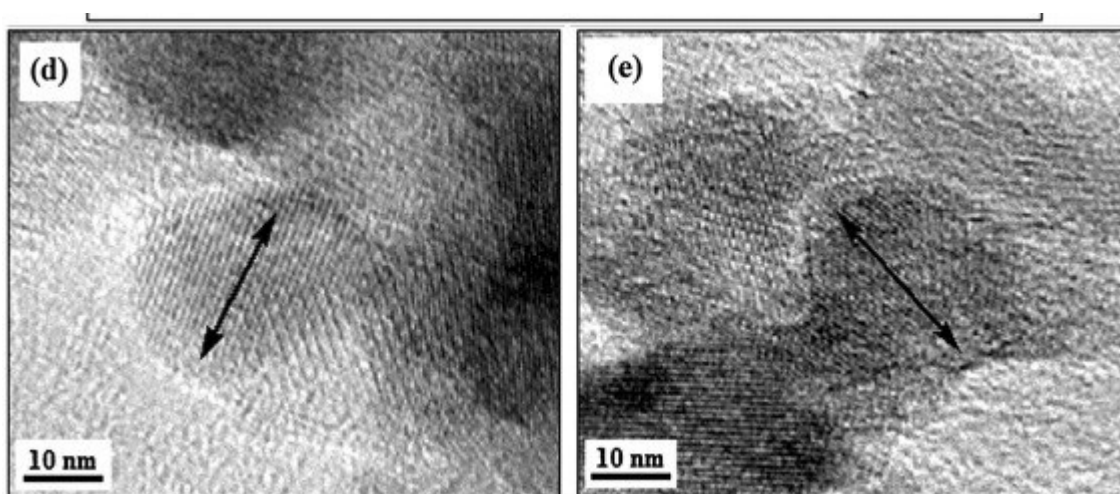


Fig. TEM delle NP rivestite con amido/ZnO (Saikia et al., 2017)

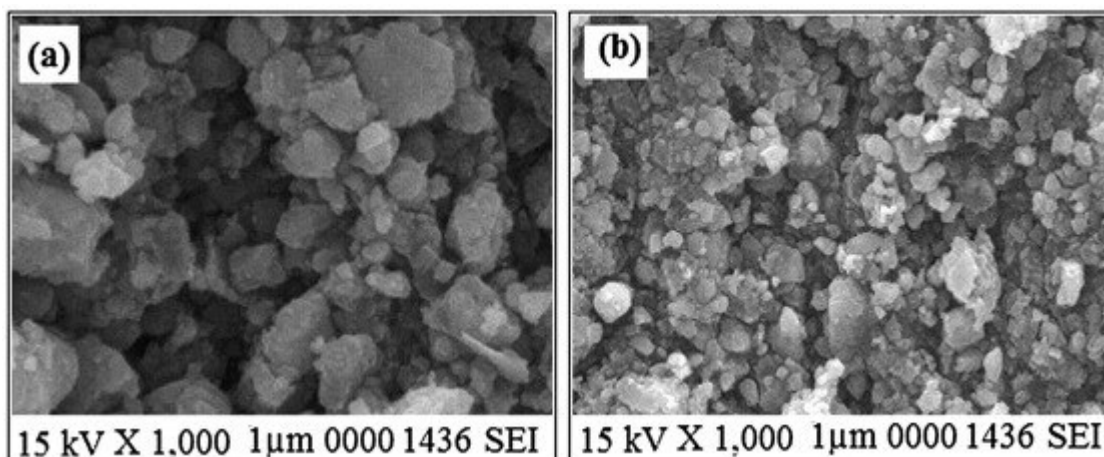


Fig. Immagini SEM di NP rivestite con amido/ZnO (Saikia et al., 2017)

Si è inoltre visto che il rigonfiamento dipende dal tempo, pH e concentrazioni di ZnO. È stato migliore per un pH =5 in quanto a pH sempre più basso le cariche positive generate sull'amido amminato causate dalla protonazione dei gruppi amminici facilitavano la repulsione tra le

catene polimeriche e quindi aumentavano il rigonfiamento. In più con l'aumentare del tempo aumenta anche il rigonfiamento e diminuisce con l'aumento della concentrazione di ZnO. Questo ultimo fattore, può essere dovuto alla limitazione della penetrazione delle molecole d'acqua nella matrice polimerica a causa della presenza di ZnO. Inoltre la reticolazione ha portato alla formazione di particelle di dimensioni compatte a causa dell'interconnessione delle catene polimeriche limitando la penetrazione delle molecole d'acqua; per cui può essere un altro fattore che entra in gioco nel rigonfiamento. Il rilascio del farmaco è stato ovviamente condizionato dal rigonfiamento. Per l'aspetto tossicologico i linfociti umani non hanno dimostrato nessuna tossicità significativa da parte delle NP caricate con ZnO, per cui il sistema di drug delivery è biocompatibile.

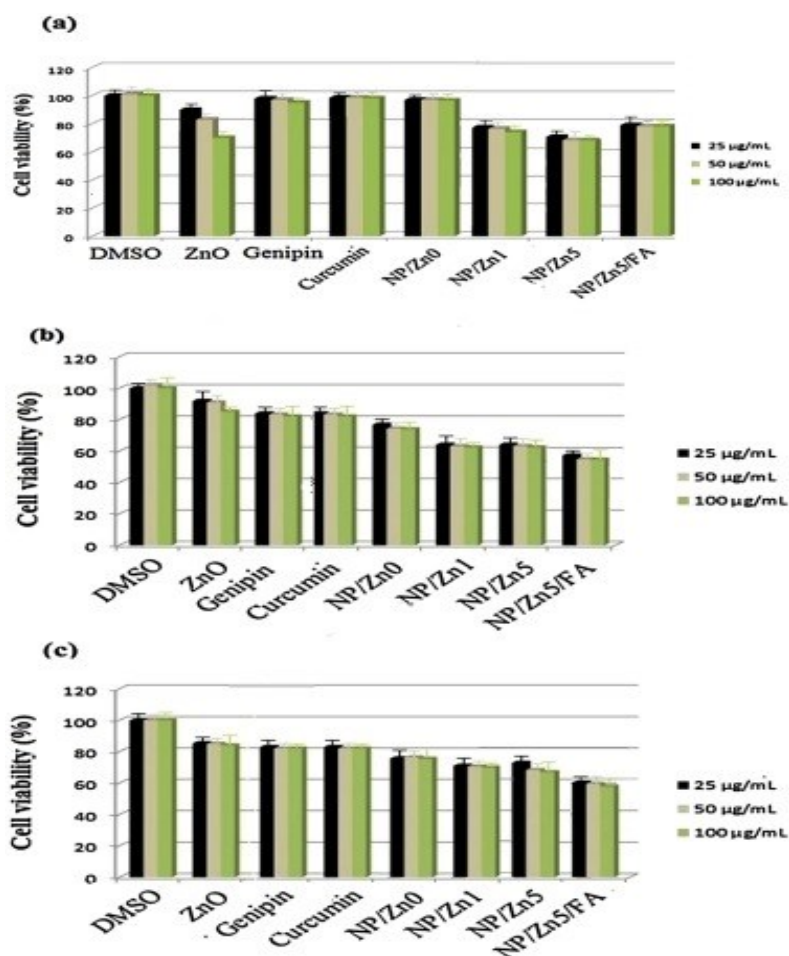


Fig. Studio della vitalità cellulare con il test MTT su: (a) linfociti umani, (b) cellule MCF-7, (c) cellule Hep-G2. Si può notare che c'è una diminuzione della vitalità delle cellule tumorali discreta. Le NP-CUR hanno mostrato una vitalità cellulare del 58% (con NP/Zn5/FA). La tossicità delle NP-CUR è stata superiore a quella della CUR libera, suggerendo una migliore internalizzazione della curcumina presente nelle NP nelle cellule rispetto che a quella in forma libera. Di per sé stessa, la tossicità è stata ampiamente influenzata da ZnO e genipina, oltre che dalla CUR. I risultati hanno suggerito che i sistemi sintetizzati, possono essere ancora studiati anche in vivo in laboratorio. (Saikia et al., 2017).

Sempre nel 2016 è stato sintetizzato un nuovo MNC in cui le particelle di  $Fe_3O_4$  sono state rivestite con amido-g- poli (metil metacrilato-co-PEG-acrilammide). Poli (metil metacrilato-co-PEG-acrilammide), si può anche scrivere nella sua forma abbreviata: poli (MMA-co-PEG-Am). Esso è un co-polimero biocompatibile tanto quanto lo è l'amido.

La superficie del nanocarrier è stata quindi modificata mediante idrazina per rendere il NC sensibile al pH. È stata caricata la DOX che è stata fatta reagire con il collegamento idrazina sulla superficie del NC per formare un legame idrazone. Il legame di idrazone può essere rotto in mezzo acido. Per via della presenza di numerosi gruppi di idrazina, sul NC è stata caricata una grande quantità di DOX. La somministrazione anche qui è stata fatta in vitro su cellule HeLa. Questo tipo di NC prendono il nome di NP@SPHP. Già solo la forte biocompatibilità di queste NP riduce l'interazione non specifica con le membrane plasmatiche. Sempre per una questione di gruppi idrossilici, in questo caso presenti nell'amido, viene migliorata la solubilità del NC in mezzo acquoso; questo vuol dire che queste MNP possono essere più stabili nel circolo sanguigno. L'aumento della capacità di carico dell'amido per il trasporto del farmaco è dovuta alla possibilità che ha questo polisaccaride naturale di ricevere innesti di polimeri in più punti, queste catene polimeriche che possono contenere le molecole del farmaco.

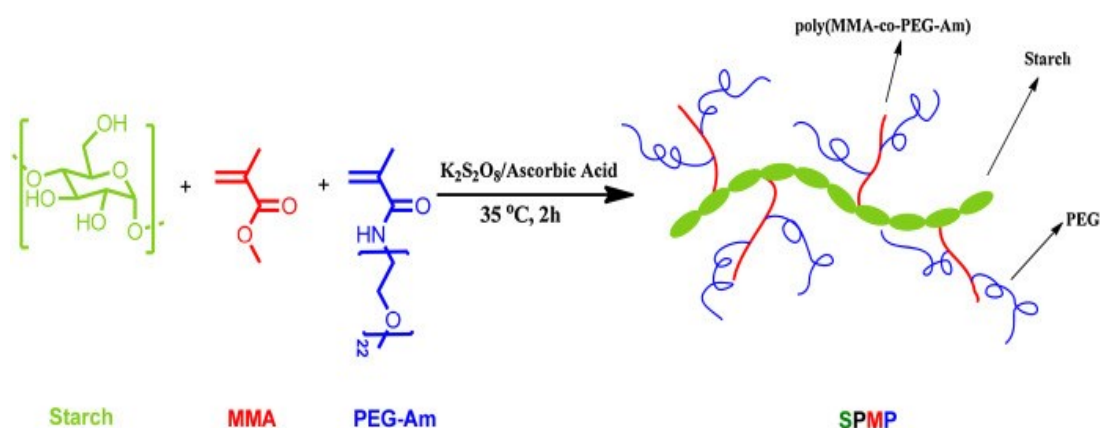


Fig. Sintesi dell'amido- g- poli(MMA-co-PEG-Am), starch sta per amido ed SPMP è il nome finale che si dà a tutto il polimero sintetizzato (Zohreh et al., 2016).

Gli SPMP non sono solo utili per immobilizzare farmaci, bensì anche per immobilizzare gli enzimi, proteine e reagenti di marcatura. Di solito per la sintesi della MNP finale il polimero SPMP può essere rivestito attorno alle MNP, a formare le MNP@SPMP. Ciò viene reso possibile dall'attacco covalente del SPMP alla superficie di MNP@NH<sub>2</sub> attraverso la reazione di amidazione tra i gruppi amminici e alcuni gruppi metilestere del polimero SPMP. Successivamente, i gruppi esterei su MNP@SPMP vengono fatti reagire con idrazina per produrre il nanocarrier magnetico desiderato (MNP@SPHP). Solo alla fine viene caricata la DOX.



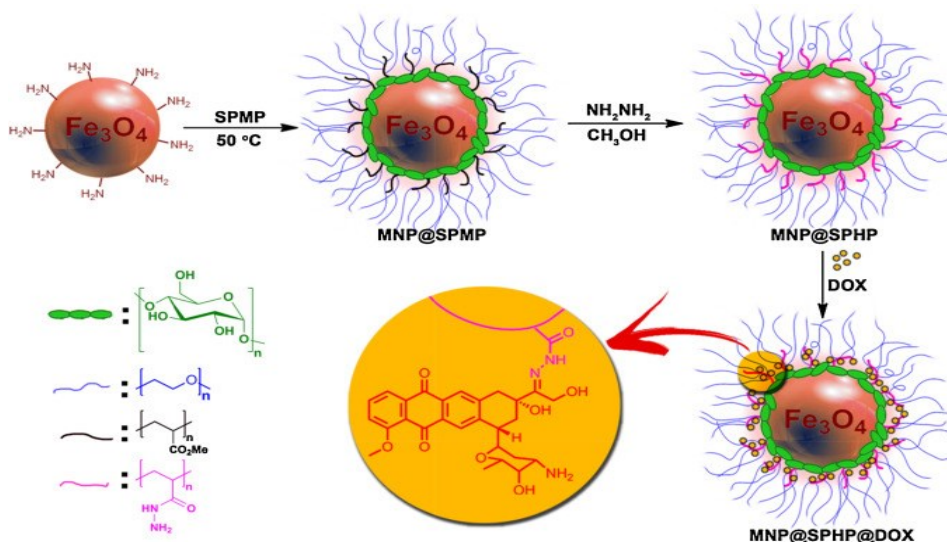


Fig. In basso alla sinistra del lettore sono rappresentati i principali polimeri che subentrano nella sintesi; in alto a sinistra viene rappresentata la  $MNP@NH_2$ ; lungo le frecce viene riportato in breve, la sequenza dei vari incapsulamenti ed innesti con caricatura finale della DOX. (Zohreh et al., 2016).

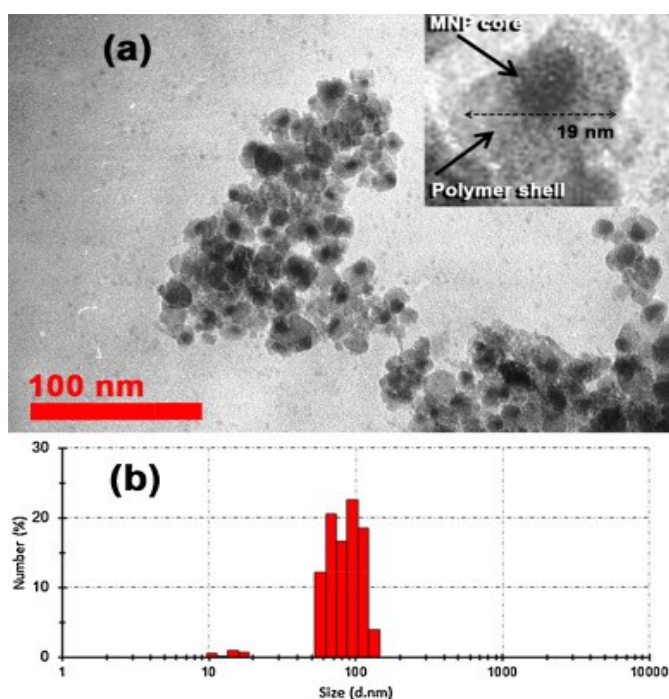


Fig. (a) di sopra viene fatta vedere un'immagine TEM con  $MNP@SPHP$  di circa 19 nm, (b) di sotto è stato tracciato un grafico della distribuzione dimensionale delle NP tramite DLS, per cui risulta che le  $MNP@SPHP$  hanno un diametro medio di 93 nm. (Zohreh et al., 2016).

Per il test MTT è stata utilizzata la DOX libera come controllo positivo. È stato osservato che le varie concentrazioni di  $MNP@SPHP$  non presentano una tossicità significativa e hanno mostrato una biocompatibilità soddisfacente anche alle concentrazioni più elevate. L'aumento della concentrazione di  $MNP@SPHP@DOX$  a 50  $\mu\text{g/ml}$  diminuisce la vitalità cellulare a meno del 30% rispetto ad una quantità a 25  $\mu\text{g/ml}$ . Si vuole ricordare che tutto



questo è stato visto per la linea cellulare HeLa. I risultati mostrano che MNP@SPHP@DOX hanno un'eccellente tossicità.

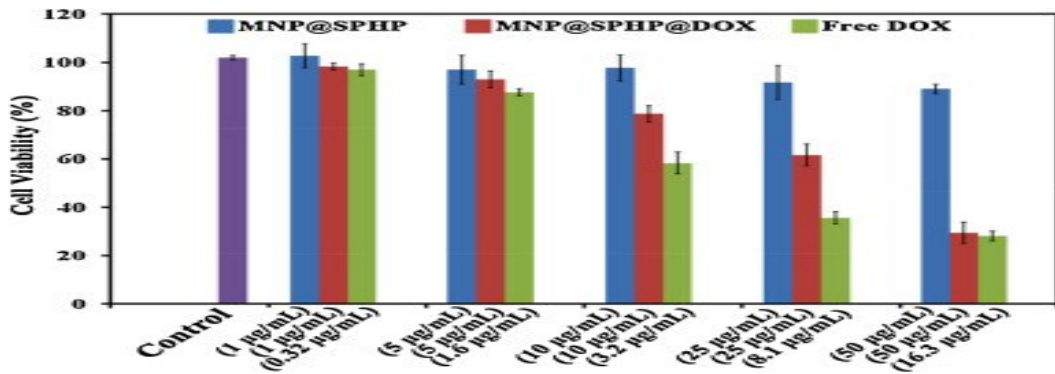


Fig. Risultati in vitro di citotossicità nei confronti delle HeLa, nel giro di 24h (Zohreh et al., 2016).

### 7.7. RIASSUNTO DI ALCUNI RISULTATI IN VITRO E IN VIVO DELLE MNP CON ALTRI TIPI DI NUCLEI, GUSCI E FORME

Gli HNT sono nanomateriali relativamente sicuri e biocompatibili con natura a base di nanoargilla (halloysite). Nel 2018 Pierre Dramou, Hua He et al. hanno utilizzato gli HNT modificati per produrre un NC magnetico sicuro per il rilascio del farmaco camptotecina (CPT). MNP di  $Fe_3O_4$  sono state sintetizzate sulla superficie di halloysite sempre mediante il metodo della co-precipitazione. Halloysite è costituita da materiali a base di alluminosilicato con una formula molecolare di  $Al_2Si_2O_5(OH)_4 \cdot nH_2O$ , che fornisce uno spazio vuoto per il caricamento dei farmaci. Inoltre, sono meno dannosi dei nanotubi di carbonio. Halloysite è stata rivestita con oligosaccaridi di CS solubili in acqua (COS). La formulazione è biocompatibile ed anche qui, i nanocompositi hanno dimostrato un comportamento di rilascio del farmaco prolungato rispetto alla CPT libera. La CPT è stata caricata nella superficie interna del nanotubo tramite legame idrogeno dopo il rivestimento e dopo la sua coniugazione con questo NC è stato visto che la CPT ha avuto un miglioramento dell'effetto citotossico nei confronti delle cellule Caco-2 in vitro. La linea cellulare Caco-2 è un adenocarcinoma del colon retto di un uomo di 72 anni.

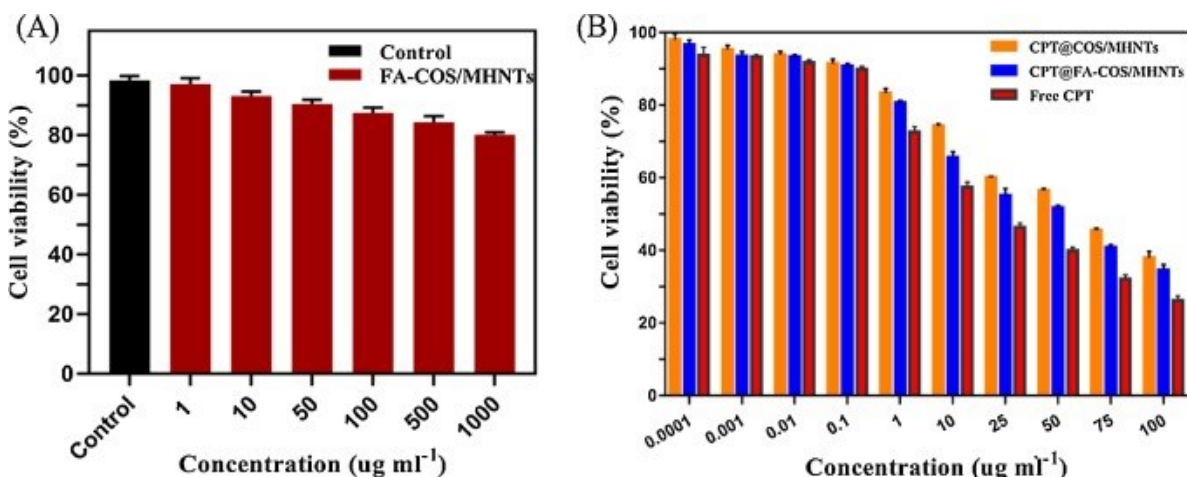


Fig. Citotossicità di FA-COS/MHNT senza CPT caricato (A) e CPT libero, CPT@COS/MHNT e CPT@FA-COS/MHNT (B) contro le cellule Caco-2; MHNT sta per magnetic halloysite nanotube (Pierre Dramou, Hua He et al., 2018).

Per il PDAC, è stato segnalato che numerosi nanoveicoli, tra cui liposomi, micelle, NP polimeriche e NP metalliche, sono utilizzati come piattaforme terapeutiche. Tuttavia, la stabilità del plasma e gli effetti collaterali delle NP metalliche limitano la loro applicazione clinica. In questo contesto, le NP polimeriche e i lipidi biodegradabili sono suggeriti come promettenti metodi di somministrazione. Sono stati sviluppati in laboratorio, delle micelle polimeriche basate su linker sensibili agli stimoli, per il targeting di specifici oncogeni. Sono state utilizzate numerose micelle polimeriche e risultano essere possibili alternative come metodi di consegna farmaci. Esempi di nanovettori che hanno dato prova di un possibile risultato positivo in laboratorio sono state le PM decorate con frammenti di anticorpi Fab' mirati al fattore tissutale umano (TF o tissutal factor) oppure anche chiamati Fab' anti-TF, il tutto caricato con un chemioterapico a base di platino, ha dimostrato di aumentare il legame cellulare e l'internalizzazione di 15 volte, entro 1 ora e una rapida internalizzazione cellulare rispetto alle micelle non bersaglio, portando a una citotossicità in vitro superiore. È stato introdotto un complesso attivo di oxaliplatino, cioè (1,2-diaminocicloesano) platino(II), con l'acronimo di DACHPt. Esso in altre situazioni ha mostrato una forte attività terapeutica contro diversi modelli di cancro e continua ad essere in fase di sperimentazione. Questo complesso di oxaliplatino è stato autoassemblato in micelle DACHPt/m insieme al co-polimero poli(etilenglicole)- *b* -poli (acido glutammico), in acronimo PEG- *b* -P(Glu). Più precisamente, i 2 co-polimeri a blocchi, metossi- PEG- *b* -P(Glu) ovvero MeO-PEG-*b*-P(Glu) e maleimide-PEG- *b* -P(Glu) ovvero Mal-PEG-*b*-P(Glu); sono stati aggiunti alla soluzione acquosa di DACHPt per preparare le micelle caricate con DACHPt funzionalizzate con maleimide (Mal-DACHPt/m). Durante questo processo i legami covalenti coordinati si sono formati tra gli atomi di platino e i gruppi carbossilato dell'acido poli(glutammico), con DACHPt nel nucleo e porzioni maleimmidiche nel guscio. La proporzione maleimmidica sul guscio delle micelle è stata controllata per ottimizzare la coniugazione dei Fab' anti-TF. L'introduzione di questi Fab' è possibile attraverso la reazione tiolo-maleimide. In questo modo, abbiamo preparato Mal-DACHPt/m con diversa densità di maleimide sulla superficie di micelle; infatti essa può presentarsi in quantità di 20% e 50%. Il diametro di questi Mal-DACHPt/m era di circa 30 nm con distribuzione stretta, come determinato mediante misurazioni di diffusione dinamica della luce (DLS) paragonabile a quelle delle MeO-DACHPt. Inoltre la coniugazione degli anticorpi mediante la chimica tiolo-maleimide può essere fatta in acqua senza modificare il pH, per cui in fase di preparazione, impedisce perdite di farmaco dovute al pH acido.

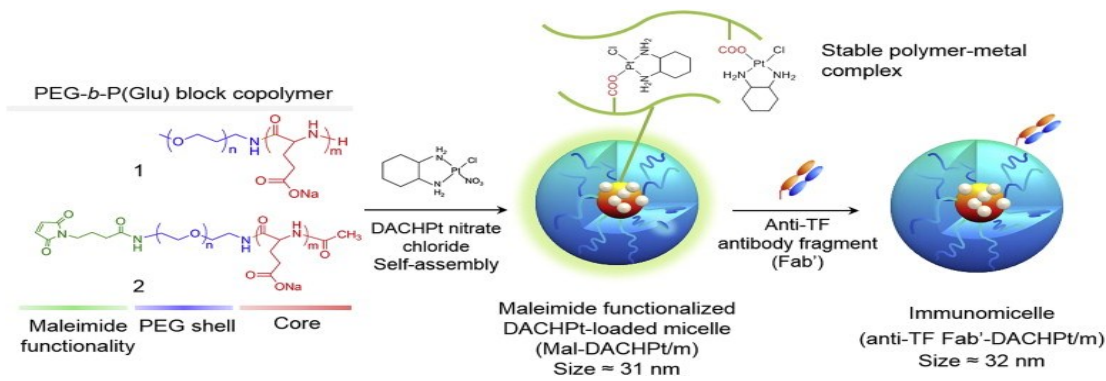


Fig. Schema semplificato della sintesi di queste IM; a sinistra del lettore si può notare i 2 polimeri che si auto assemblano insieme alla DACHPt per formare le immunomicelle. Al centro in verde si nota la superficie di maleimide; a destra del lettore si nota la IM finale con i Fab' anti-TF (Kazunori\_Kataoka et al., 2014)

Per confermare l'internalizzazione cellulare dell'anti-TF Fab' DACHPt/m nelle cellule BxPC3, è stata eseguita la valutazione al microscopio confocale a scansione laser (CLSM) con anti-TF Fab' - DACHPt/m e DACHPt/m marcati con fluorescenza. Dopo 1 ora di incubazione, il segnale di fluorescenza dell'anti-TF Fab' - DACHPt/m è stato chiaramente osservato nelle cellule BxPC3. La quantificazione dell'intensità fluorescente indicava chiaramente il rapido legame e l'internalizzazione dell'anti-TF Fab'-DACHPt/m contro le cellule BxPC3. Colorando gli endosomi e i lisosomi tardivi delle cellule cancerogene con LysoTracker Green (verde) è stata confermata la localizzazione dell'anti-TF Fab'-DACHPt/m (rosso) suggerendo che l'anti-TF Fab' ha promosso l'assorbimento cellulare.

**C**

**anti-TF Fab'-DACHPt/m**

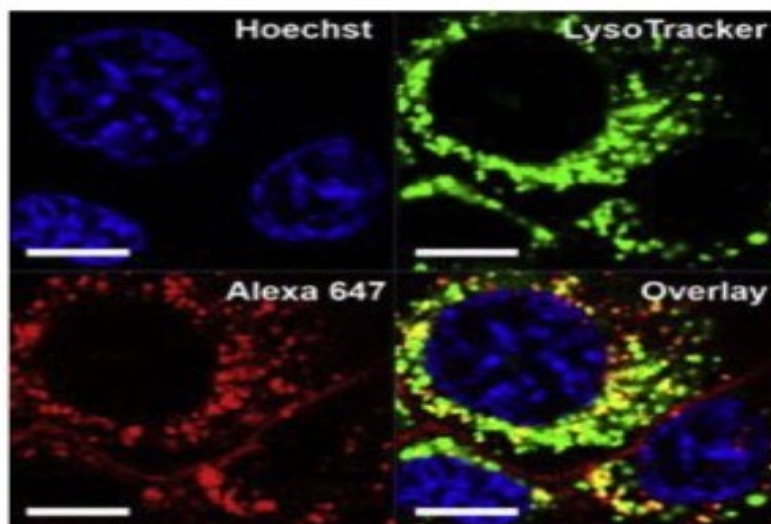


Fig. Immagini al CLSM per valutare l'assorbimento cellulare delle immunomicelle; in alto a destra in ogni quadrante sono scritti, i nomi dei coloranti fluorescenti utilizzati (Kazunori Kataoka et al., 2014)

La citotossicità in vitro dell'anti-TF Fab'-DACHPt/m è stata studiata nelle cellule BxPC3 esponendole all'anti-TF Fab'-DACHPt/m, DACHPt/m e oxaliplatino, che è il derivato clinicamente approvato del DACHPt, per 3 ore seguita da post-incubazione per 48 ore. Il tutto è stato esaminato con test CCK-8. Il valore IC50 di DACHPt/m è stato superiore a quello dell'oxaliplatino, poiché l'oxaliplatino libero viene rapidamente trasportato e attivato all'interno delle cellule, mentre i DACHPt/m vengono gradualmente internalizzati dall'endocitosi e rilasciano in modo prolungato complessi Pt citotossici. Tuttavia, il valore IC50 all'anti-TF Fab'-DACHPt/m è risultato pari a 25 paragonabile a quello dell'oxaliplatino (IC50 = 23), cioè circa 6 volte inferiore a quello del DACHPt/m (IC50 = 126). L'anti-TF Fab' non ha mostrato alcuna citotossicità in vitro contro le cellule BxPC3 nelle condizioni testate, indicando che la citotossicità dell'anti-TF Fab'-DACHPt/m può essere attribuita esclusivamente al rilascio intracellulare potenziato del DACHPt. Di conseguenza, questi risultati supportano che l'introduzione di Fab' anti-TF sulla superficie di DACHPt/m può contribuire al sostanziale miglioramento della citotossicità in vitro attraverso la combinazione dell'assorbimento cellulare promosso da cellule tumorali che sovra esprimono TF e il successivo rilascio intracellulare efficiente di DACHPt tramite endocitosi.

Come ultimo passaggio è stata valutata l'attività antitumorale in vivo su xenotrapianti sottocutanei di BxPC3 in topi BALB/c nu/nu di 6 settimane, femmine. Quando il volume medio del tumore ha raggiunto i 100  $mm^3$  ad un gruppo di topi è stato iniettato per via E.V. dalla vena della coda, 3 volte ogni quattro giorni, la soluzione con le IM e all'altro gruppo di topi è stato iniettato oxaliplatino in forma libera. In particolare, l'anti-TF Fab'-DACHPt/m ha soppresso la crescita dei tumori per circa 40 giorni superando DACHPt/m. Anche se gli xenotrapianti BxPC3 presentano le caratteristiche del cancro pancreatico intrattabile, tra cui scarsa vascolarizzazione e fibrosi spessa, che impediscono l'accesso degli agenti terapeutici, PM con dimensioni inferiori a 50 nm hanno mostrato una penetrazione e un accumulo facilitati in questo modello di tumore. Sia DACHPt/m che anti-TF Fab'-DACHPt/m hanno mostrato un accumulo simile nei tessuti tumorali, indicando che la migliore efficacia antitumorale di anti-TF Fab'-DACHPt/m non è il risultato di un maggiore accumulo di tumore. Bensì, è ragionevole supporre che l'efficacia antitumorale prolungata ottenuta dall'anti-TF Fab'-DACHPt/m sia attribuita all'assorbimento cellulare facilitato dal TF-targeting e al conseguente miglioramento della citotossicità contro le cellule BxPC3. Inoltre, al dosaggio valutato, il DACHPt/m e l'anti-TF Fab'-DACHPt/m non erano tossici secondo il profilo del peso corporeo. Sia DACHPt/m che anti-TF Fab'-DACHPt/m a 3 mg/kg hanno mostrato un effetto antitumorale potenziato rispetto a oxaliplatino a 8 mg/kg.

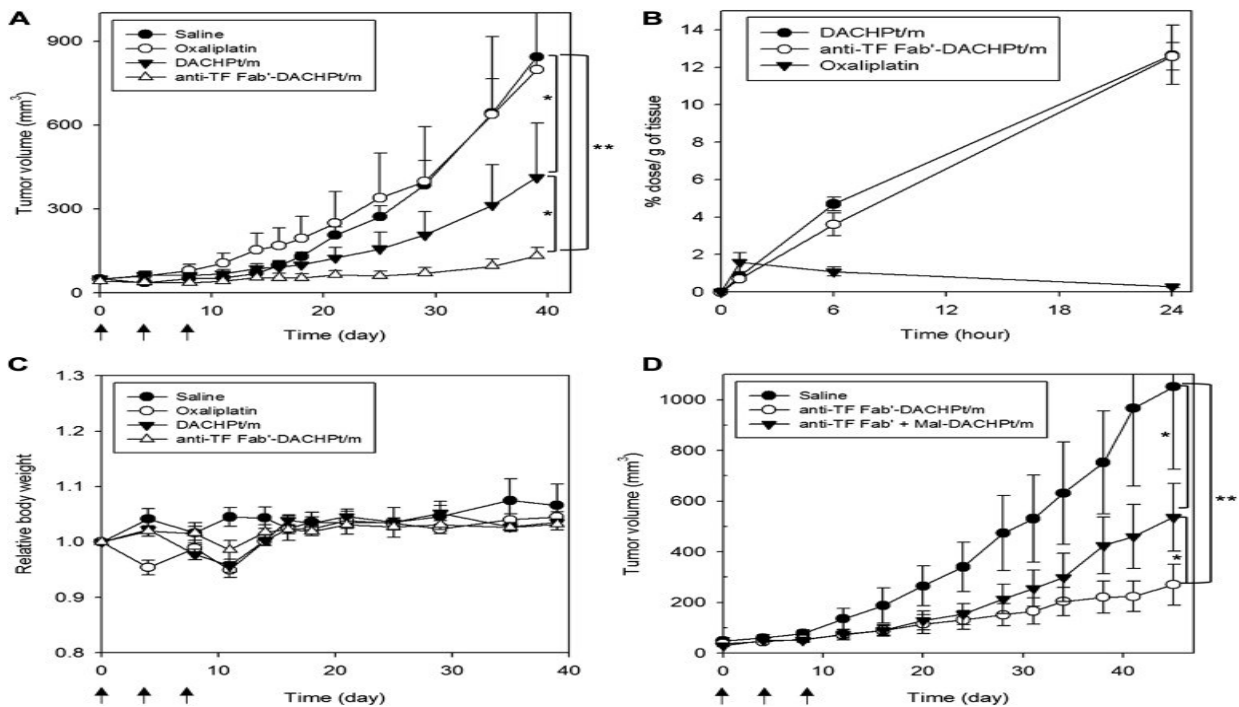


Fig. (A) risultati di contenimento del volume tumorale di cellule BxPC3 in base ai giorni passati e nanocarriers applicati; (B) % della dose di farmaco su g di tessuto tumorale; (C) variazione del peso corporeo dei topi dopo l'applicazione dei vari drug delivery; (D) altro grafico sulla variazione del volume del tumore in base ai giorni e tipi di drug delivery di anti-TF Fab'-DACHPt/m e anti-TF Fab'-Mal-DACHPt/m. (Kazunori\_Kataoka et al., 2014)

Tutto questo per concludere che queste immunomicelle potrebbero essere una possibile alternativa di drug delivery ancora più efficiente rispetto alla chemio libera tradizionale (o sistemica) per la terapia del tumore al pancreas. Inoltre i chemioterapici a base di platino sono farmaci chiave per molte terapie cliniche antitumorali, per cui queste IM possono anche essere prese in considerazione per altri studi futuri su altre forme di cancro. Questa strategia di coniugazione uno a uno del frammento Fab' dell'anticorpo alla superficie micellare mediante accoppiamento maleimide-tiolo è applicabile a un'ampia varietà di anticorpi, compresi gli anticorpi diretti contro il tumore clinicamente approvati, senza modifiche sostanziali nella struttura e la dimensione delle micelle madri (Kazunori\_Kataoka et al., 2014).

Un altro esempio di drug delivery sintetizzato in laboratorio risale al 2016 in cui sono stati sintetizzati dei polimerisomi con autoassemblamento e formazione di un co-polimero di blocco poli(acido lattico)-azobenzene-poli(etilenglicole) (PLA-azobenzene-PEG) reattivo all'ipossia che si autoassembla per formare questi polimerisomi in un mezzo acquoso. I polimerisomi non hanno rilasciato nessun contenuto incapsulato per 50 minuti in condizioni normossiche (senza ipossia). Tuttavia in condizioni di ipossia, il 90% del colorante incapsulato veniva rilasciato entro 50 minuti. In questo tipo di NC è stato incapsulato la combinazione di farmaci antitumorali gemcitabina (GEM) ed erlotinib. Abbiamo utilizzato colture di BxPC-3 per dimostrare il rilascio mediato dai polimerisomi. Il saggio della vitalità cellulare sui 96 pozzetti è stato valutato dopo 72h. I risultati sulla vitalità cellulare sono riportati nel diagramma di sotto (Sanku Mallik et al., 2016).

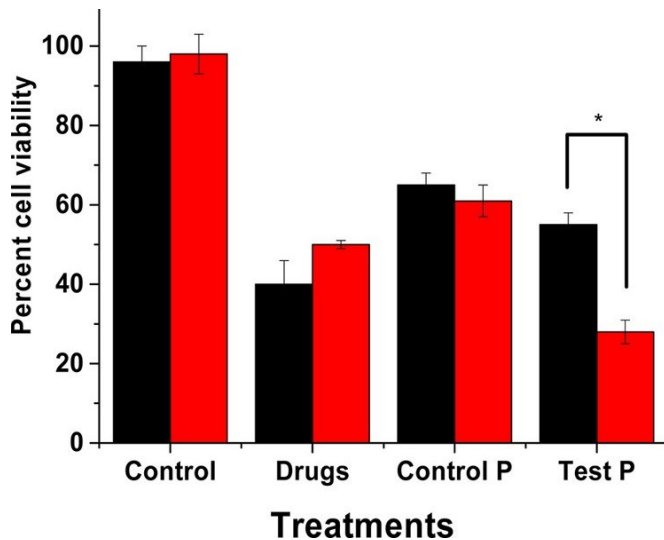


Fig. Vitalità delle cellule BxPC-3 in colture sferoidali dopo il trattamento con il controllo (polimerisomi reattivi all'ipossia senza alcun farmaco), farmaci antitumorali in forma libera (GEM e Erlotinib), polimerisomi incapsulati con farmaci preparati da PLLA<sub>5000</sub> – PEG<sub>2000</sub> (Controllo P) e i NC sensibili all'ipossia (Test P) in condizioni normossiche (barre nere) e ipossiche (barre rosse); tutto il test è stato fatto in vitro (Sanku Mallik et al., 2016).

In uno studio nel 2016, Faquan Yu et al. hanno sviluppato un idrogel sensibile al doppio stimolo del pH/riduzione, basato su NP rivestite di Alg tiolato (Alg-SH) e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> tiolato/amminato. Come per tutti i casi di idrogel, le MNP funzionalizzate, come reticolante, collegavano le catene polimeriche tramite un legame disolfuro e interazioni elettrostatiche. DOX è stato caricato attraverso legami idrogeno e interazioni elettrostatiche. Il nanogel magnetico (MNG, magnetic nanogel) ottenuto ha una dimensione di 122,7 ± 20,3 nm. I test di citotossicità in vitro hanno illustrato chiaramente l'effettiva selettività nell'uccisione delle cellule di cancro della cervice uterina umano (HeLa) con IC<sub>50</sub> di 1,01 µg/ml e delle cellule di epatoma murino (H22) con IC<sub>50</sub> di 1,57 µg/ml ma con citotossicità significativamente bassa per il cercopiteco aethiops cellule renali normali (Vero). Il test in vivo contro le cellule tumorali HeLa e HepG2 hanno rivelato che questi nanogel hanno un'efficacia terapeutica maggiore rispetto al DOX libero e possono ridurre efficacemente le dimensioni del tumore.

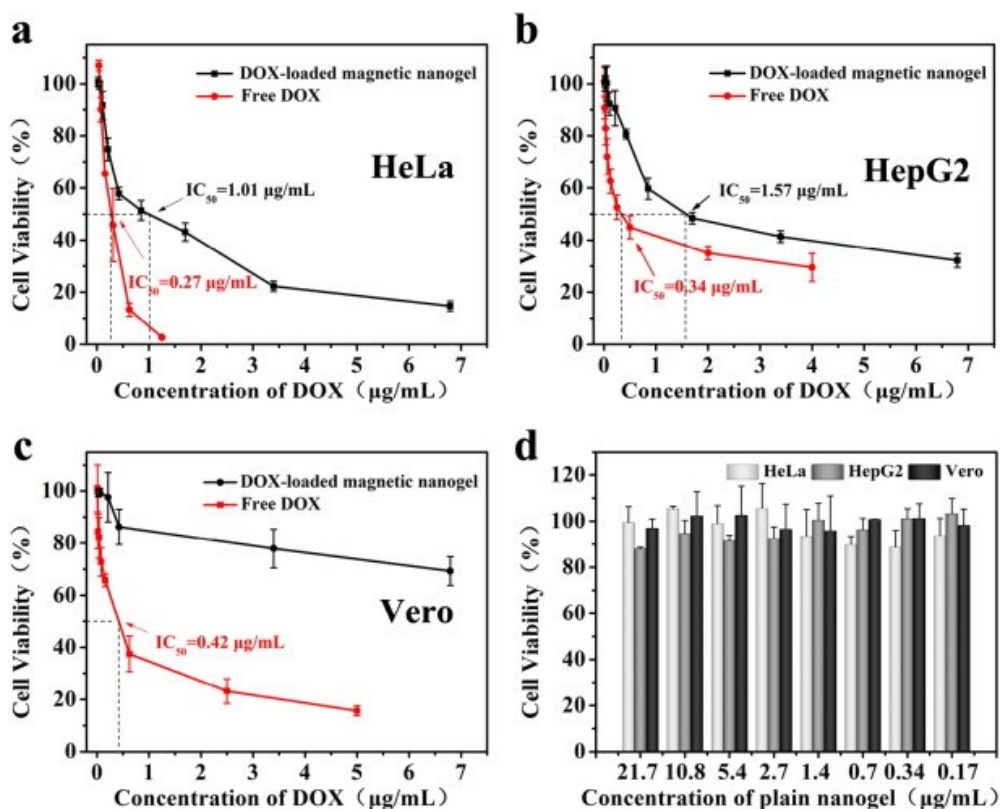


Fig. Vitalità cellulare delle cellule HeLa (a), HepG2 (b) e Vero (c) dopo 48 ore di incubazione applicata al nanogel magnetico caricato con DOX e free DOX per confronto e (d) vitalità cellulare sotto nanogel semplice; tutto quanto in vitro (Faquan Yu et al., 2016).

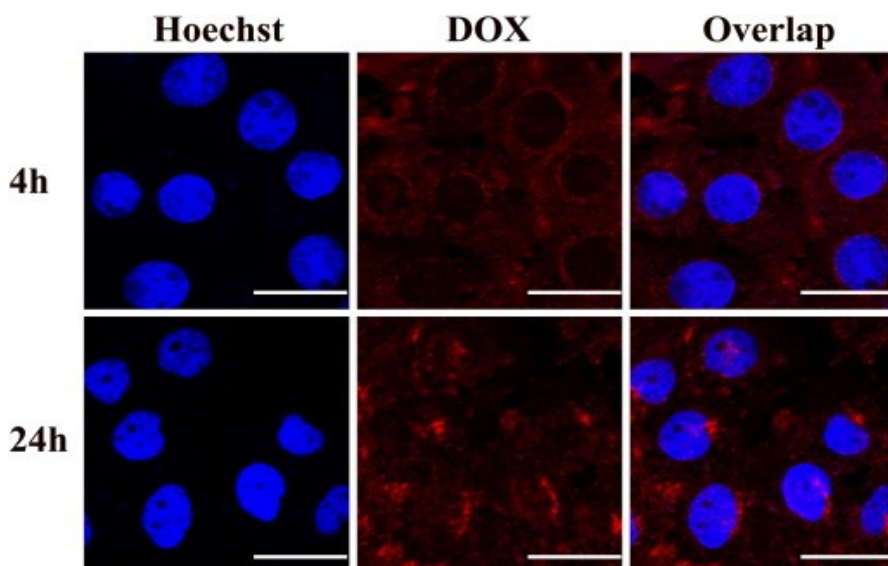


Fig. Immagini CLSM rappresentative di cellule HeLa trattate con nanogel magnetico caricato con DOX per la rispettiva incubazione di 24 ore. Il blu è il nucleo cellulare trattato con Hoechst; il rosso è la fluorescenza di DOX; l'ultima colonna è la loro sovrapposizione. L'intensità della fluorescenza della DOX aumentava e l'accumulo di DOX nei nuclei delle cellule. L'osservazione ha indicato un rapido rilascio di DOX dal nanogel; tutto in vitro (Faquan Yu et al., 2016).



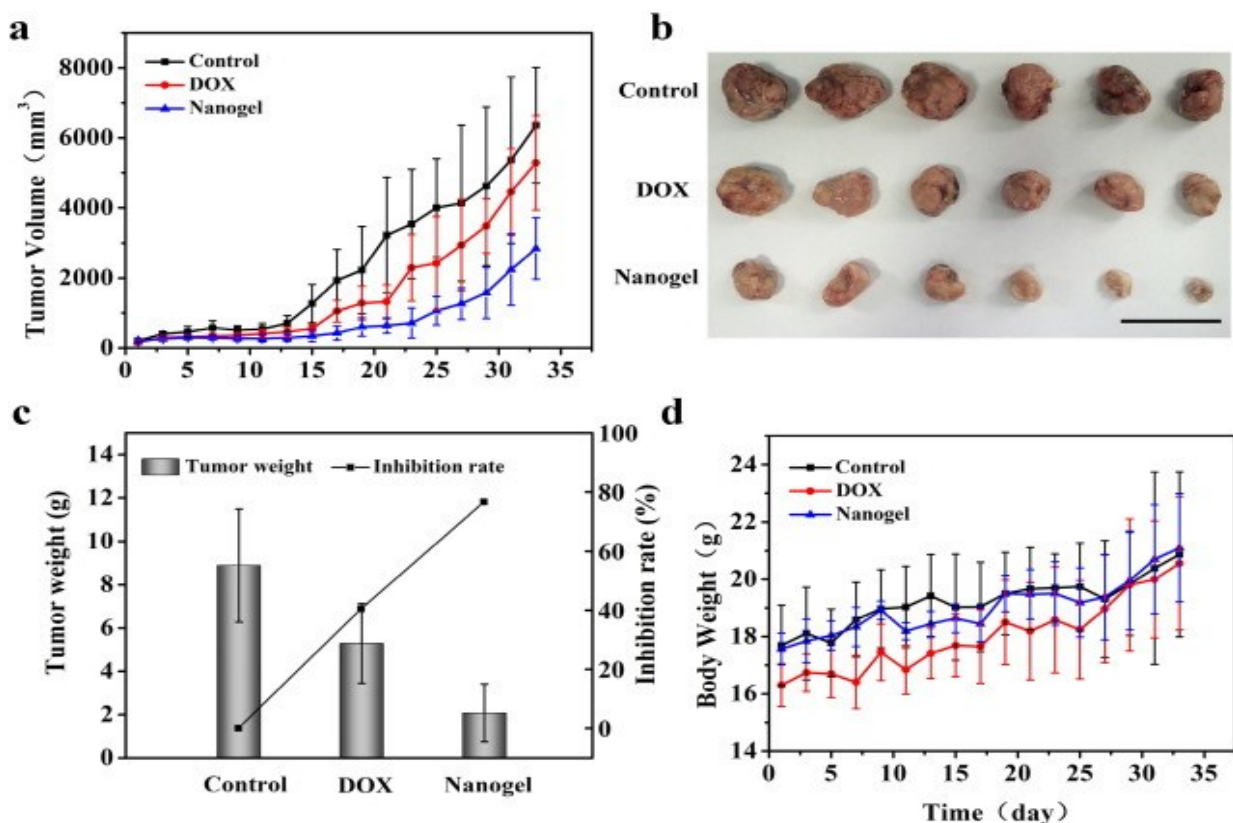


Fig. L'efficacia antitumorale in vivo del nanogel nei topi BABL/c che ospitano il tumore H22. (a) il volume del tumore durante il regime di trattamento, (b) i tumori rappresentativi sottoposti a diversi trattamenti, la barra della scala è 5 cm, (c) il peso del tumore all'endpoint sperimentale e il tasso di inibizione della crescita del tumore, (d) la variazione del peso corporeo durante il trattamento. La variazione del peso corporeo viene solitamente presa come indice per valutare la tossicità sistemica. Durante l'intero periodo dello studio in vivo, non si sono verificati cambiamenti evidenti del peso corporeo in tutti i gruppi di trattamento rispetto al gruppo con soluzione salina; ciò implica che il nanogel esprimerebbe solo una contenuta tossicità sistemica (Faquan Yu et al., 2016).

Sono state utilizzate anche PM per il drug delivery del DOX nei confronti delle cellule di epatoma umano (BEL-7402). In questo caso la PM utilizza destrano innestato con poli (acido lattico-glicolico) funzionalizzato con peptide A54 (A54-DEX-PLGA) allo scopo per l'appuntamento di caricare DOX sulla NP di magnetite. Il diametro delle MP è di circa 50 nm ed esse oltre che alla DOX, possono incapsulare l'ossido di ferro superparamagnetico (SPIO) come agente di contrasto per la risonanza magnetica. L'efficienza di incapsulamento del farmaco è stata di circa l'80% e il rilascio di DOX in vitro è stato prolungato fino a 72 ore. I risultati della RM in vitro hanno dimostrato la capacità di legame specifica delle micelle A54-Dex-PLGA/DOX/SPIO alle cellule BEL-7402. Gli esperimenti di imaging RM in vivo utilizzando un modello di impianto di queste stesse cellule, hanno ulteriormente convalidato l'effetto di targeting delle micelle caricate con DOX/SPIO. Gli esperimenti in vivo hanno confermato la tossicità contro le cellule BEL-7402 (JQ. Situ, XJ. Wang, XL. Zhu *et al.* 2016).

## 7.8. RIASSUNTO DI ALCUNI RISULTATI DI NP PER TERAPIA FOTOTERMICA ED IPERtermia MAGNETICA

I nanovettori magnetici basati su HA, in combinazione con altri materiali, possono essere utilizzati anche per la chemioterapia antitumorale combinata. È stato sintetizzato un tipo di NC magnetico in grado di effettuare trattamenti fototermici con chemioterapia e ipertermia. A questo scopo,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  rivestito di polidopamina (PDA) è stato preparato e rivestito con il guscio di HA. DOX è stato caricato come farmaco modello e il rilascio in vitro è stato misurato in risposta a pH, glutatione (GSH) e stimoli luminosi. I test di citotossicità in vitro hanno inoltre confermato che la combinazione di chemioterapia e terapia fototermica è più efficace nell'uccidere le cellule tumorali rispetto a qualsiasi altro trattamento da solo. Questi nanocompositi possiedono un diametro medio di 120 nm. Il rilascio del farmaco potrebbe essere innescato dal pH, dalla concentrazione di GSH ed anche dall'irradiazione luminosa. Valutazioni in vitro dimostrano che la terapia di combinazione di NP FPCH-DOX riduce la vitalità cellulare al 16,2%, inferiore a quella della chemioterapia individuale (55,3%). La risonanza magnetica in vivo indica che l'accumulo tumorale di NP fornisce un contrasto MRI migliorato e l'imaging termico in vivo ha verificato effetto di conversione fototermica localizzato grazie alle NP nei tessuti tumorali. Tutto questo è un altro strumento promettente per la teranostica del cancro altamente efficiente, però è anche da precisare che questa prova è stata fatta solo sulle HeLa (Lin et al., 2019).

Altre opzioni per indurre effetti fototermici nei portatori magnetici includono l'utilizzo di un guscio a base di carbonio. Il ferrocene è un premateriale per realizzare questi gusci di carbonio. In uno studio, NP di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  con gusci di carbonio porosi sono state fabbricate e la loro superficie in ultimo è stata ricoperta con HA. La struttura porosa del carbonio può aumentare la capacità di carico dei farmaci. In studi simili, ossido di grafene (GO) modificato con HA (GO-HA) sono stati utilizzati per indurre l'effetto magnetotermico ovvero ipertermia magnetica, anche con DOX e paclitaxel (PTX). Questi nanovettori hanno mostrato buone prestazioni nell'uccidere cellule MDA-MB-231, ovvero cellule epiteliali di un adenocarcinoma della ghiandola mammaria isolate da una donna di 40 anni e BT-474 è la linea cellulare epiteliale di un carcinoma duttale della mammella prelevata da una donna di 60 anni (Nilkamal Pramanik et al., 31 maggio 2019).

È stato anche dimostrato sempre con test in vitro, che nanocompositi di magnetite con GO, ovvero un materiale prodotto dall'ossidazione della grafite, innestati con polimeri beta-ciclodestrina-acido ialuronico (CHDA), il tutto abbreviato con CHDA-MGO, presentano una buona propensione alla terapia chemio-fototermica nei confronti della linea cellulare dell'epatocarcinoma umano BEL-7402, con carico DOX. Anche questo può essere un approccio di chemio-fototermia guidata da immagini a RM dei tumori dove si visualizzano le diverse concentrazioni di  $Fe$ . (Andando Liang et al., 2019)

In più è stata effettuata l'imaging RM in vivo sui topi, con una RM con  $\vec{B} = 1\text{T}$  ed è possibile vedere dopo le 24h un effetto oscurante sull'immagine rispetto a quella rilevata prima dell'iniezione. Sempre sia in vitro che in vivo è stata testata la terapia chemio-fototermica che può realizzare l'inibizione della crescita del tumore e l'ablazione del tumore solido (Fan Wu et al., 2019).

## 8. INTRODUZIONE ALLA MODELLAZIONE MATEMATICA DELLA TFD DELLE MNP PER TUMORI

Fino ad ora è stato descritto come sono state classificate le NP, sono state definite le SPION, sono stati forniti i risultati sulla citotossicità di queste NP sia in vivo che in vitro o in certi casi solo in vitro e nono in vivo. Sono stati fatti dei cenni teorici generali riguardo alla tesi suddetta con importanza anche per l'MHT sempre in generale. In più poco prima di questo paragrafo abbiamo anche illustrato la ML e come è stata di aiuto per la comunità scientifica per descrivere l'MHT per le NP, sia nel caso della sintesi per co-precipitazione che nel caso della termo-decomposizione. A questo proposito è stato fatto presente come varia la SPA, un parametro importante per quantificare il potere calorifico emesso dalle NP sotto l'effetto del campo magnetico esterno applicato. È stato fatto presente le differenze che ci possono essere nelle interazioni magnetiche delle NP per quei nanocorpi che sono stati sintetizzati con le 2 tecniche già scritte poche righe sopra. Nel paragrafo della ML abbiamo anche riportato le immagini delle linee di campi magnetici che sono state osservate tramite questa tecnica microscopica, in più abbiamo anche osservato immagini di MNP al microscopio TEM con diversi ingrandimenti. Tuttavia nonostante le esaustive descrizioni riportate sull'argomento per analizzarlo sotto l'aspetto conformazionale, di materiali utilizzati per la sintesi delle MNP stesse, dei risultati ottenuti tramite la sintesi di queste MNP, di loro proprietà intrinseche caratteristiche e di MHT. Siamo arrivati a modellizzare MHT dal punto di vista del comportamento delle MNP in laboratorio ma non ci siamo soffermati sulla loro descrizione dal punto di vista della modellazione matematica del loro trasporto di calore ottimale nei tumori. Per cui non è stata descritta la termodinamica di queste MNP quando si trova all'interno del corpo umano per svolgere la loro funzione teranostica. In più manca anche la descrizione matematica della fluidodinamica delle MNP all'interno dei vasi sanguigni. In questa sessione si proverà a fornire un'interpretazione matematica di tutti questi fenomeni che avvengono all'interno di un modello di vasi sanguigni umani e si fornirà tramite dei grafici anche gli andamenti delle temperature durante l'azione delle NP.

La velocità delle NP nei vasi è in generale eterogenea. Le particelle più vicine alle pareti dei vasi sono più lente delle altre. Ciò è dovuto alla forza di attrito tra le particelle e la membrana del vaso in un processo noto come adesione. Il tipico meccanismo di trasporto dello stravasamento consiste nel trasporto di NP nell'interstizio tumorale attraverso i pori dei vasi. I pori sono ad esempio dell'ordine di 20-200 nm di diametro per il cervello e il tumore periferico secondo l'analisi eseguita nel 2009 da Sarin et al., mediante tecniche di microscopia elettronica. Tuttavia, il trasporto delle NP dipende dal rapporto tra la dimensione delle particelle e la dimensione dei pori della parete del vaso (Stylianopoulos et al., 2018 ). Le NP con diametro inferiore a 10 nm possono essere facilmente filtrate dal sistema renale e possono essere catturate da milza e fegato se la loro dimensione è superiore a 200 nm. Si stima quindi che il diametro ottimale delle NP sia compreso tra 20 e 200 nm, come discusso da Thomas et al., nel 2013. Qui studiamo il trasporto di MNP sferiche di 80 nm di diametro in tumori vascolarizzati 3D. Il tumore, che viene identificato con un dominio tridimensionale  $\Omega$ , si presume che comprenda due regioni, vale a dire i vasi tumorali  $\Omega_v$  e l'interstizio tumorale  $\Omega_t$ . Pertanto, le pareti dei vasi svolgono il ruolo di interfaccia tra questi due compartimenti, che qui è indicato con  $\Gamma = \partial\Omega_v \cap \partial\Omega_t$ . Per una comprensione della modellazione matematica che è stata fatta vengono riportate le definizioni di gradiente e divergenza in generale:

- Il gradiente di una funzione  $f$  è un vettore che ha come componenti le derivate parziali di quella  $f$  lungo i 3 assi dello spazio  $x,y,z$ ; viene indicato con il simbolo  $\nabla f$ ; il simbolo  $\nabla$  si legge "nabla". In un sistema di riferimento cartesiano  $\nabla f$  con  $f(x, y, z)$  viene

espresso in questo modo:  $\nabla f = \frac{\partial f}{\partial x} \cdot \hat{x} + \frac{\partial f}{\partial y} \cdot \hat{y} + \frac{\partial f}{\partial z} \cdot \hat{z}$  dove  $\hat{x}$ ,  $\hat{y}$ ,  $\hat{z}$  sono i versori lungo gli assi.

- Divergenza è un campo scalare che misura la tendenza di un campo vettoriale a convergere o divergere rispetto ad un punto dello spazio. In coordinate cartesiane tale quantità  $\nabla \cdot f$  (o  $\text{div } f$ ) è la somma delle derivate parziali; ovvero  $\nabla \cdot f = \frac{\partial f_x}{\partial x} + \frac{\partial f_y}{\partial y} + \frac{\partial f_z}{\partial z}$ , dove  $f = (f_x, f_y, f_z)$ .
- Il Laplaciano si indica con il simbolo  $\nabla^2 f$  dove in coordinate cartesiane con assi (x, y, z) si ha  $\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2}$ . In uno spazio euclideo l'operatore di Laplace applicato alla funzione è la divergenza del  $\nabla f$ :  $\nabla^2 f = \nabla \cdot \nabla f$ .

Successivamente illustriamo le ipotesi di modellazione matematica per descrivere il trasporto di fluidi, il rilascio di NP e la convezione-diffusione del calore nel contesto dell'ipertermia delle neoplasie. Si suppone che sangue e calore possano essere scambiati tra i vasi e l'interstizio del tumore. È da tenere in considerazione che un trattamento efficace e sicuro dell'ipertermia richiede che la temperatura del tumore rientri in un determinato intervallo target, generalmente stimato tra 42 °C e 44 °C, per una determinata durata target, in genere da 0,5 ore a 2 ore. Uno studio clinico ancora più recente riporta che la temperatura ipertermica (Hyperthermic Temperature HT) deve essere maggiore di quella 41°C e deve essere mantenuto per una durata ipertermica superiore a 60 minuti (Ademaj et al., 2022). Altri studio rileva che circa il 90% delle cellule può essere sradicato con una HT superiore a 43 °C (Bhuyan et al., 1977), allo stesso tempo però si è anche scoperto che una HT superiore a 43,5 °C - 44°C, aumenta i livelli generali di citotossicità nel corpo (Overgaard et al., 1991). In generale, non ci si può aspettare che i parametri termometrici abbiano singoli valori fissi, piuttosto possiamo sapere che gli effetti di un trattamento di ipertermia variano.

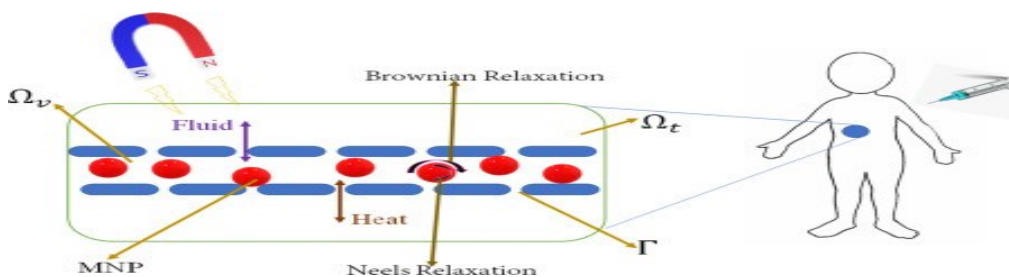


Fig. 4.1 uno schema del trattamento del cancro con ipertermia utilizzando MNP (Penta et al., 2022)

## 8.1. FLUSSO DEL FLUIDO

Consideriamo il sangue come un fluido viscoso incompressibile modellato secondo il seguente problema di Stokes:

$$\mu \nabla^2 u_v = \nabla p_v \quad \text{in } \Omega_v \quad (2a)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{u}_v = 0 \text{ in } \Omega_v \text{ (2b)}$$

Dove  $\mathbf{u}_v$  e  $p_v$  sono la velocità del sangue e la pressione nei capillari, mentre  $\mu$  è la viscosità del sangue.

Assumiamo che l'interstizio tumorale sia un mezzo poroso isotropo, in modo che il flusso del fluido interstiziale tumorale possa essere descritto dalla legge di Darcy:

$$\mathbf{u}_t = -\kappa \nabla p_t \text{ in } \Omega_t \text{ (3a)}$$

$$\nabla \cdot \mathbf{u}_t = 0 \text{ in } \Omega_t \text{ (3b)}$$

Qui,  $\mathbf{u}_t$  e  $p_t$  sono la velocità e la pressione del fluido nell'interstizio tumorale, ovvero lo spazio privo di struttura anatomica propria, situato fra i diversi elementi cellulari di un organo. Esso è considerato un tessuto vero e proprio (tessuto interstiziale); riveste una grande importanza fisiologica in quanto permette gli scambi metabolici, la nutrizione, la diffusione di sostanze tossiche e di farmaci all'interno nelle cellule di un determinato tessuto dell'organismo.  $\kappa$  è la conduttività del tessuto.

Il fluido viene fornito in modo continuo attraverso la membrana dei vasi sanguigni e il flusso dipende dalle differenze di pressione tra le due regioni; la condizione di continuità del flusso attraverso l'interfaccia  $\Gamma$  (gamma maiuscolo) è la seguente:

$$\mathbf{u}_t \cdot \mathbf{n} = \mathbf{u}_v \cdot \mathbf{n} = L_p (p_v - p_t) \text{ in } \Gamma \text{ (4)}$$

La relazione di sopra è nota anche come legge di Starling nella letteratura biofisica, e in generale afferma che il flusso del fluido è proporzionale alla differenza tra la pressione interstiziale e vascolare, nonché alla differenza tra le pressioni oncotiche in quei compartimenti. Il valore della pressione oncotica o colloidale-osmotica, esprime la forza con cui le proteine del plasma attirano l'acqua da altri tessuti dell'organismo. Questo concetto di pressione può essere in clinica, in quanto nei casi di carenza di concentrazione di queste proteine, per esempio nel caso di un reale stato di denutrizione di un soggetto, l'acqua si accumula nei tessuti provocando dei caratteristici gonfiori chiamati edemi, ovvero accumulo di liquidi negli spazi interstiziali dell'organismo. Tuttavia, seguendo Penta et al. (2015), stiamo qui trascurando il contributo della pressione colloidale-osmotica, considerato questo salto di pressione spesso trascurabile per la maggior parte dei tipi di tumore. Specifichiamo le componenti tangenziali del fluido che scorre nei vasi mediante una condizione di Beavers e Joseph che tiene conto dello scivolamento su una superficie porosa come discusso ad esempio da (Shipley e Chapman, 2010, Penta et al., 2015)

$$\mathbf{u}_v \cdot \boldsymbol{\tau}_v = -\sqrt{\frac{\kappa}{\varphi}} [(\mathbf{n} \cdot \nabla) \mathbf{u}_v] \cdot \boldsymbol{\tau}_v \text{ in } \Gamma \text{ (5)}$$

Dove  $L_p$  è la permeabilità della membrana in quanto la membrana plasmatica delle cellule ha una permeabilità selettiva tra il citoplasma interno alle cellule e l'ambiente extracellulare,  $\boldsymbol{\tau}_v$  denota entrambi i vettori unitari tangenti alla parete dei vasi,  $\varphi$  è un parametro non dimensionale che codifica le proprietà strutturali della membrana,  $\mathbf{n}$  è il vettore di modulo unitario di uscita normale alla parete dei vasi, ovvero un versore perpendicolare alla parete dei vasi.

## 8.2. AVVEZIONE, DIFFUSIONE E ADESIONE DELLE MNP

La concentrazione di MNP  $c_v$  che viene somministrato per via intravascolare è governato dalla seguente equazione di continuità di avvezione-diffusione di massa NP:

$$\frac{\partial c_v}{\partial t} + \nabla \cdot (c_v \mathbf{u}_v - D_v \nabla c_v) = 0 \quad \text{in } \Omega_v \quad (6)$$

dove il parametro  $D_v$  ( $L^2 \cdot T^{-1}$ ) è la diffusività delle NP intesa come diffusività della materia, dal punto di vista matematico quest'ultima rappresenta il potenziale scalare della velocità delle NP nel mezzo in cui si trovano. Il potenziale scalare del campo vettoriale  $\mathbf{u}_v$  è un campo scalare il cui gradiente è uguale al campo vettoriale. Di per sé stessa la diffusione delle MNP rappresenta il trasporto della loro massa in fase solida all'interno del vaso. Il trasporto di massa nei vasi è influenzato dalla dimensione e dalla forma delle particelle (Hossain et al., 2013). Di per sé l'avvezione in fluidodinamica è il trasporto di massa che avviene per azione del moto del fluido preso sotto analisi.

L'adesione tra NP di diverse dimensioni e forme e la parete dei vasi è stata discussa da (Decuzzi e Ferrari 2006). La probabilità di adesione dipende direttamente dalla densità dei recettori e dei ligandi e dall'area di interazione tra la particella e il substrato. I recettori sono delle proteine della membrana plasmatica delle cellule in grado di riconoscere specifiche molecole o ligandi che provengono da altri tessuti. I recettori, inoltre instaurano diversi tipi di legami molto specifici con queste sostanze. Gli Autori di quest'ultimo lavoro hanno riscontrato che le NP a forma di ellisse (NP oblate) aderiscono alla parete dei vasi più delle particelle sferiche. La dimensione e la forma ottimale che devono avere le NP sono influenzate dal rapporto tra la densità dei recettori ( $\rho_r$ ) e lo sforzo di taglio dei vasi ( $\theta$ ), ovvero  $\zeta = \frac{\rho_r}{\theta}$ . Lo sforzo di taglio  $\theta$  è lo sforzo tangenziale applicato alla superficie di un corpo fluido o liquido; la distinzione tra un solido ed un fluido può essere fatta in base alla capacità del corpo a resistere alla deformazione indotta da  $\theta$ . È risaputo che i fluidi tendono a deformarsi sempre sotto l'azione anche di  $\theta$  piccoli, i solidi possono resistere di più agli sforzi di taglio. C'è una relazione di proporzionalità tra sforzo e deformazione. Dal punto di vista matematico possiamo dire che  $\theta = \frac{dF_t}{dA}$  dove  $F_t$  rappresenta la componente tangenziale della forza applicata su un punto della superficie ed  $A$  è l'area della superficie. Per cui  $\theta$  si può esprimere come  $\frac{N}{m^2}$ . Per quanto riguarda il fluido, il suo passaggio lungo una superficie, esprime una forza di resistenza e l'intensità di questo tipo di forza dipende dalla viscosità del fluido, motivo per cui viene anche chiamata resistenza viscosa. Quest'ultimo tipo di forza dà luogo ad uno sforzo di taglio per i fluidi che nella maggior parte dei casi viene espressa in questo modo:  $\theta = \mu \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial y}$ , dove  $\frac{\partial \mathbf{u}}{\partial y}$  è il gradiente velocità  $|\xi|$  (o velocità di taglio) con direzione perpendicolare alle superfici solide con unità di misura di  $\frac{1}{s}$ . Anche in un fluido,  $\theta$  viene espresso in  $\frac{N}{m^2}$ . Qui, ci concentriamo sulle NP sferiche per semplicità, lasciamo stare le NP e assumiamo che la loro dimensione sia maggiore della dimensione dei pori dei vasi, in modo da tenere



esplicitamente conto dell'adesione tra le particelle e la parete dei vasi. Modelliamo quest'ultimo meccanismo mediante la seguente condizione di interfaccia:

$$(c_v \mathbf{u}_v - D_v \nabla c_v) \cdot \mathbf{n} = \Pi c_v \quad \text{in } \Gamma \quad (7)$$

Seguendo l'analisi effettuata da Nabil e Zunino (2016), assumiamo che:

$$\Pi = z |\xi| \frac{p_d}{2}, \quad (8)$$

Dove  $z$  è la probabilità di adesione,  $|\xi|$  è la velocità di taglio sulla parete, e  $p_d$  è il diametro della particella. La densità delle NP  $\Psi$  aderenti alla parete dei vasi è calcolata da:

$$\frac{d\Psi}{dt} = \Pi c_v \quad \text{in } \Omega v \quad (9)$$

### 8.3. CONVEZIONE E DIFFUSIONE DEL CALORE

Il calore generato all'interno dei vasi tumorali e nell'interstizio tumorale è dovuto al campo magnetico applicato dopo l'iniezione delle NP. Il campo provoca la rotazione e le vibrazioni delle particelle attorno a sé stesse e attorno al campo.

Utilizziamo la formula di rilassamento Browniano e di Néel per identificare il tasso o velocità di assorbimento  $\alpha$  che è direttamente correlato alla distribuzione del calore nel tessuto tumorale.

Il trasporto del calore sia nei vasi che nello spazio interstiziale del tumore viene quindi descritto da un sistema accoppiato di equazioni di convezione-diffusione del calore. Partiamo dal presupposto che esista una fonte di calore volumetrica nei vasi sanguigni proporzionale alla concentrazione di NP  $c_v$  e la densità di quelli aderenti alle pareti  $\psi$ , con costante di proporzionalità data dal tasso di assorbimento  $\alpha$ . Inoltre, teniamo conto del calore scambiato tra i vasi e la ripartizione (o compartimento) interstiziale. Infine, consideriamo anche l'influenza di un dato volume di sorgente nello spazio interstiziale per catturare completamente il calore generato dalle MNP sotto l'influenza del campo magnetico. In questo caso poiché i problemi del trasporto del farmaco legati al calore e ai vasi sanguigni sono disaccoppiati, assumiamo che tale fonte sia proporzionale alla velocità di assorbimento  $\alpha$  e ad una determinata funzione  $R$ . A sua volta la  $R$  è correlata alla concentrazione media di NP che successivamente generano calore all'intero del tessuto. Le equazioni risultanti possono essere scritte come:

$$\gamma_t \rho_t \left[ \frac{\partial T_t}{\partial t} + \nabla \cdot (T_t \mathbf{u}_t - \frac{K_t}{\gamma_t \rho_t} \nabla T_t) \right] = \alpha \cdot R \quad \text{in } \Omega t \quad (10.a)$$

$$\gamma_v \rho_v \left[ \frac{\partial T_v}{\partial t} + \nabla \cdot (T_v \mathbf{u}_v - \frac{K_v}{\gamma_v \rho_v} \nabla T_v) \right] = \alpha \cdot (\psi + c_v) \quad \text{in } \Omega v \quad (10.b)$$

Dove  $K_v$  e  $K_t$ , sono rispettivamente la conduttività (o conducibilità) termica dei vasi e degli interstizi tumorali,  $\gamma_v$  e  $\gamma_t$  le capacità termiche specifiche e  $\rho_v$ ,  $\rho_t$  le densità dei compartimenti dei vasi e degli interstizi del tumore. Per quanto riguarda la capacità termica specifica  $\gamma$  di una sostanza è l'energia necessaria per aumentare di 1K la T di quella sostanza. Dove Q è il calore scambiato tra il corpo e l'ambiente circostante mentre  $\Delta T$  è la variazione di temperatura che ne consegue da questo scambio. La capacità termica può essere calcolata in questo modo :  $\gamma = \frac{Q}{\Delta T}$ .

Il parametro  $\psi = \frac{\Psi}{L}$  rappresenta la concentrazione effettiva di particelle per adesione. Il modello può essere derivato per una determinata funzione generica  $R$ , per cui ne specificheremo la forma funzionale quando introdurremo la soluzione del modello.

Il calore può essere scambiato tra il tumore e i vasi in modo tale che il flusso di calore attraverso la membrana sia proporzionale alla differenza tra le temperature nei due compartimenti  $T_v$  e  $T_t$ , come segue:

$$(T_v \mathbf{u}_v - \frac{K_v}{\gamma_v \rho_v} \nabla T_v) \cdot \mathbf{n} = \beta \frac{\beta}{\gamma_v \rho_v} (T_v - T_t) \quad \text{on } \Gamma \quad (11.a)$$

$$(T_t \mathbf{u}_t - \frac{K_t}{\gamma_t \rho_t} \nabla T_t) \cdot \mathbf{n} = \frac{\beta}{\gamma_t \rho_t} (T_v - T_t) \quad \text{on } \Gamma \quad (11.b)$$

Dove  $\beta$  è il coefficiente di scambio termico convettivo. Questa grandezza è l'espressione dell'attitudine di un conduttore termico ad essere percorso da corrente termica per mezzo di scambio convettivo. Viene espresso in  $\frac{W}{m^2 \cdot K}$ , a livello matematico è definito come  $\beta = \frac{q}{\Delta T}$ , dove q è il flusso termico scambiato ovvero il calore scambiato nell'unità di tempo e di superficie ( $J/m^2 \cdot s$ ).

Il calore generato dalle NP dipende fortemente da  $\alpha$ , che dipende dalla dimensione, dalla forma, dal materiale delle particelle, nonché dalle proprietà del campo magnetico, ovvero dall'intensità e dalla frequenza. Secondo Avolio et al. (2021), il parametro  $\alpha$  è definito come:

$$\alpha = \frac{\mu_0^2 \pi f H_0^2 M_d^2 V}{3 \rho_n K_B T} \cdot \frac{2\pi f \tau_{eff}}{1 + (2\pi f \tau_{eff})^2}, \quad (12)$$

Dove  $\mu_0$  è la permeabilità magnetica delle MNP ossia una grandezza che in questo specifico caso esprime l'attitudine della magnetite delle NP a magnetizzarsi in presenza di un campo magnetico, si misura in  $\frac{H}{m}$  dove H in questo caso è l'unità di misura Henry,  $M_d$  è la magnetizzazione delle NP,  $K_B$  è la costante di Boltzmann,  $T$  è la temperatura,  $f$  è la frequenza del campo,  $H_0$  è l'intensità del campo, V è il volume delle NP,  $\rho_n$  è la loro densità e  $\tau_{eff}$  è il tempo di rilassamento complessivo.  $\tau_{eff}$  che a sua volta può essere definito come:

$$\frac{1}{\tau_{eff}} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B} \quad \text{con } \tau_N = \tau_0 e^\delta, \quad \delta = \frac{K_i \cdot V}{k_B \cdot T}; \quad \tau_B = \frac{3\eta \cdot V_H}{K_B \cdot T} \quad (14)$$

$\tau_N$  e  $\tau_B$  sono rispettivamente i tempi di rilassamento di Néel e Brown. Affinché  $\tau_{eff}$  possa essere espresso come somma di altri 2 contributi di rilassamento, è necessario che  $\tau_N$  e  $\tau_B$  siano processi indipendenti. Qui,  $\tau_0 \sim 10^{-9} - 10^{-11}$  s è la costante di tempo di Larmor (s) e contribuisce a caratterizzare la precessione di Larmor degli atomi; la precessione è il cambiamento della direzione dell'asse di rotazione di un corpo che sta effettuando un movimento rotatorio;  $k_i$  è la costante di anisotropia magnetica,  $\eta$  è la viscosità del liquido vettore delle NP, come al solito  $p_d$  è il diametro delle NP e  $V_H$  è il volume idrodinamico che entra in gioco per via del sistema vascolare, calcolato da Torres et al. (2019) utilizzando la relazione:

$$V_H = \frac{\pi (p_d + \varphi)^3}{6}, \text{ dove } \varphi = 2\text{nm} \quad (15)$$

#### 8.4. CONFRONTO TRA MODELLO SVILUPPATO DI RECENTE E QUELLO DI PENTA ED AL SARIRI DEL 2022

Al Sariri e Penta (2022) hanno discusso il trattamento del cancro con ipertermia utilizzando MNP che possono stravasare attraverso le pareti dei vasi. Al suo interno è stata poi studiata la concentrazione delle NP in entrambe le regioni del tessuto tumorale mediante equazioni di avvezione-diffusione. Gli autori presumevano che le particelle potessero essere assorbite dall'interstizio tumorale dopo essere state rilasciate per via intravascolare.

$$\partial c_v / \partial t + \nabla \cdot (c_v \mathbf{u}_v - D_v \nabla c_v) = 0 \text{ in } \Omega_v \quad (16a)$$

$$\partial c_t / \partial t + \nabla \cdot (c_t \mathbf{u}_t - D_t \nabla c_t) = -\Lambda c_t \text{ in } \Omega_t \quad (16b)$$

dove il parametro  $\Lambda$  denotava il tasso di assorbimento nell'interstizio tumorale. Inoltre, hanno tenuto conto del trasporto transvascolare delle NP attraverso le seguenti condizioni di interfaccia:

$$(c_v \mathbf{u}_v - D_v \nabla c_v) \cdot \mathbf{n} = (c_t \mathbf{u}_t - D_t \nabla c_t) \cdot \mathbf{n} = L_c (c_v - c_t) \text{ on } \Gamma, \quad (17)$$

Dove  $L_c$  rappresenta la permeabilità diffusiva delle membrane dei vasi. L'equazione differenziale che governa il trasporto del calore in Al Sariri e Penta (2022) è analoga a quella descritta dal sistema (10a) – (10b) con condizioni di interfaccia (11a) – (11b). Il tasso di assorbimento  $\alpha$  è stato considerato come un unico parametro costante e il suo valore è stato preso da Cervadoro et al. (2013). Inoltre, la fonte di calore del sistema (10a) – (10b) non dipendeva dalla densità delle particelle aderenti  $\Psi$ , poiché è stato considerato il trasporto di piccole NP e quindi anche ignorato l'adesione delle NP.

## 9. CONCLUSIONI

Queste ricerche hanno fatto grandi progressi negli studi in laboratori di ricerca sia in vitro che in vivo. Il nanovettore viene solitamente iniettato nell'arteria, in questo modo il drug delivery raggiunge il tessuto tumorale e quindi diretto al bersaglio con un potente magnete esterno. La maggior parte delle NP testate finora sono state analizzate tramite test MTT e in vivo in genere su topi BALB/c; eccetto certi casi in cui gli esperimenti sono stati fatti in vivo su altre specie di topi. I risultati che sono stati annotati in questa tesi, soprattutto quelli in vivo sono stati molto promettenti. In breve tra i test in vivo più sorprendenti ci sono: quelli fatti con lo xenotrapianto nella sottocute dei topi di cellule di carcinoma epatocellulare (Hepatocellular Carcinoma, HCC) Hep-G2, le A549 del NSCLC ovvero tumore del polmone non a piccole cellule, le MCF-7 del tumore al seno, le HeLa del tumore al collo dell'utero e le BxPC-3 dell'adenocarcinoma duttale pancreatico. In questi 4 casi di cancro, nei test in vivo è stato visto che le linee cellulari sottoposte all'azione delle NP, hanno dimostrato una diminuzione della loro vitalità cellulare rispetto che alle forme libere delle chemioterapie. Buona parte dei test di emolisi hanno confermato che le NP testate non danneggiano i globuli rossi; poi anche il peso corporeo dei murini non ha subito importanti variazioni. Per quanto riguarda i test in vitro, le varie NP spesso hanno dimostrato una buona citotossicità nei confronti anche di altre linee cellulari cancerogene, per esempio le Caco-2, HT-29, HT 116 che in sostanza sono 3 tipi di cellule di origine cancerogena del colon retto e le T-24 ovvero le cellule del tumore alla prostata. In più sempre per i test in vitro le NP vuote, ovvero senza caricamento dei farmaci non hanno dimostrato un'importante tossicità per queste linee cellulari. Per cui in questo caso i test in vitro possono essere idonei per nuovi test in vivo. Per quanto riguarda i test in vivo, quello che si può esporre è che si sono dimostrati dei possibili candidati per lo sviluppo eventuali nuove terapie future. Per quanto riguarda l'aspetto termofluidodinamico, si può notare la buona macro analisi che è stata fatta di tutto il problema, con i vari parametri e grandezze che entrano in gioco. Tuttavia, al di là di queste considerazioni, ci sono altri aspetti di cui tenere conto. Punto primo, dal punto di vista dei risultati che sono stati scritti, bisogna precisare che la comunità scientifica ha riferito che questi risultati in vivo per i vari tipi di tumori impiantati nella sottocute dei murini erano guariti, però fino ad ora, per lo meno nei risultati che sono stati presi in considerazione in questa tesi, non è stato provato che queste cellule tumorali possono guarire in locus al diretto organo d'interesse. Per cui in teoria, ancora ad oggi, non si può sostenere che queste NP siano del tutto applicabili in contesti reali di clinica per il rilascio di chemioterapici e sviluppo di ipertermia magnetica combinata. C'è anche da tener presente che tutti questi risultati risalgono ad un periodo di pubblicazioni che vanno dal 2012 al 2021, ovvero 9 anni, per cui è anche vero che i risultati più recenti, quelli dal 2021 al 2024 non sono stati riportati in questa tesi. Inoltre si ritiene giusto anche ricordare che sono stati presi in considerazione alcuni risultati, ovviamente non tutti, per cui non sarebbe sbagliato, continuare ad approfondire tutta questa parte. In più per quanto riguarda la parte di TFD manca la parte di tutto lo studio fatto sull'adimensionalizzazione delle grandezze che entrano in gioco nelle equazioni, l'omogeneizzazione asintotica (periodica) e l'omogeneizzazione in simmetria radiale. In più si dovrebbe anche prendere in considerazione il fattore tortuosità dei percorsi vascolari che portano i nutrienti ai vari tumori. Anche qui non sarebbe sbagliato approfondire in modo ulteriore questi aspetti. Per concludere, i risultati si sono dimostrati più che soddisfacenti. La descrizione delle NP è stata

abbastanza esaustiva dal punto di vista delle funzioni dei vari componenti di questi NC, la microscopia di Lorentz insieme alla TEM si sono rivelate dei potenti strumenti di analisi per valutare le dimensioni delle MNP. Inoltre, la ML è stata utile per descrivere anche le linee di campi magnetici generati dai vari aggregati delle MNP. Il tutto contribuisce allo studio di questi particolari sistemi di rilascio farmaci. La modellizzazione matematica che li accomuna è stata ben impostata, si è visto la possibilità di testare NP in carbonio, e GO su cellule cancerogene valutando il loro potenziale fototermico. Quest'ultima proprietà consiste nella possibilità di irradiare la superficie di queste NP con il conseguente assorbimento e generazione di calore grazie alle proprietà dei materiali di cui sono costituite. Con quest'ultimo principio fisico che si sfrutta si può parlare di terapia fototermica fatta sui tumori. Visto il suo sviluppo molto recente, anche quest'ultima frontiera di ricerca potrebbe essere ulteriormente approfondita con altri studi.

## 10. BIBLIOGRAFIA:

<https://www.cnr.it/it/comunicato-stampa/5020/nanoparticelle-anticancro-la-nuova-frontiera-teranostica>

<https://labtestsonline.it/ito-tests/her2.html>

<https://www.atcc.org/>

<https://www.airc.it/>

<https://www.humanitas.it/>

<https://www.imem.cnr.it/AdR/4/227/Materiali-Magnetici-e-Multiferroici/Nanoparticelle-magnetiche-e-applicazioni-biomediche>

<https://www.imem.cnr.it/AdR/6/201/Caratterizzazione-Strutturale-e-di-Superficie/Microscopia-elettronica-in-trasmissione>

<https://www.hielscher.com/it/disperse.htm>

<https://www.imem.cnr.it/AdR/6/201/Caratterizzazione-Strutturale-e-di-Superficie/Microscopia-elettronica-in-trasmissione>

<https://www.electricity-magnetism.org/it/magnetometro-a-gradiente-alternato-agfm/>

<https://www.ism.cnr.it/it/tempism/analisi/magnetismo-e-trasporto/magnetometria-a-campione-vibrante-vsm.html>

Appunti del Prof. Valerio D'Alessandro: *Termofluidodinamica dei sistemi biologici anno accademico 2023/2024, DIISM, Dipartimento di ingegneria industriale e scienze matematiche*

Ali Pourjavadi, Sakineh Alipour, Mohadeseh Doroudian, *Polysaccharide-modified magnetic drug nanocarriers: Structures and applications in cancer chemotherapy*, Journal of Drug Delivery Science and Technology, Volume 91, 2024, 105140, ISSN 1773-2247

Yongling Ding, Hong Yin, Rui Chen, Ru Bai, Chunying Chen, Xiaojuan Hao, Shirley Shen, Kangning Sun, Futian Liu, *Carboxymethyl chitosan based nanocomposites containing chemically bonded quantum dots and magnetic nanoparticles*, Applied Surface Science, Volume 433, 2018, Pages 188-196, ISSN 0169-4332

*Antitumor Effects of pH-/Reduction-Responsive Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Alginate Magnetic Nanoparticles Loaded with Doxorubicin on Subcutaneous Tumor Models of Hepatocellular Carcinoma Xenografts in BALB/c Nude Mice*, Na Peng, Clairissa D. Corpstein, Yanlong Wang, Mingyue Yang, Chenghuan Hua, Tao Zou, Yang Cheng, Kui Wu, Yi Liu, 2021, ACS Applied Nano Materials, volume 4, pag 3707-3716, <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c00181>

Sorasitthiyankarn, F.N.; Muangnoi, C.; Thaweeseest, W.; Ratnatilaka Na Bhuket, P.; Jantaratana P.; Rojsitthisak P.; Rojsitthisak P. *Polyethylene Glycol-Chitosan Oligosaccharide-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: A Novel Drug Delivery System for Curcumin Diglutamic Acid*. *Biomolecules* 2020, 10, 73. <https://doi.org/10.3390/biom10010073>

*Doxorubicin release by magnetic inductive heating and in vivo hyperthermia-chemotherapy combined cancer treatment of multifunctional magnetic nanoparticles*, Phuong Thu Ha, Thi Thu Huong Le, Thuc Quang Bui, Hong Nam Pham, Anh Son Ho and Linh Toan Nguyend; DOI: 10.1039/C9NJ00111E

Qinlu Zhang, Qian Liu, Menghan Du, Alphons Vermorcken, Yali Cui, Lixia Zhang, Lili Guo, Le Ma, Mingwei Chen, *Cetuximab and Doxorubicin loaded dextran-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles as novel targeted nanocarriers for non-small cell lung cancer*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, Volume 481, 2019, Pages 122-128, ISSN 0304-8853



Lin Dai, Rui Liu, Rui and Hu, Li-Qiu Hu, Jun-Hui Wang and Chuan-Ling Si, *Self-assembled PEG–carboxymethylcellulose nanoparticles/ $\alpha$ -cyclodextrin hydrogels for injectable and thermosensitive drug delivery*, Journal RSC Adv., 2017, volume 7, issue 5, pages 2905-2912, Publisher: The Royal Society of Chemistry, doi: 10.1039/C6RA25793C

Anuradha Gupta, Anas Ahmad, Hardeep Singh, Sharanjeet Kaur, K M, Neethu K M, Md. Ansari Meraj, Govindasamy Jayamurugan and Rehan Khan, *Nanocarrier Composed of Magnetite Core Coated with Three Polymeric Shells Mediates LCS-1 Delivery for Synthetic Lethal Therapy of BLM-Defective Colorectal Cancer Cells*, Journal of Biomacromolecules, volume 19, number 3, pages 803-815, year 2018, doi: 10.1021/acs.biomac.7b01607, <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01607>

Chinmayee Saikia, Monoj K. Das, Anand Ramteke, Tarun K. Maji, *Evaluation of folic acid tagged aminated starch/ZnO coated iron oxide nanoparticles as targeted curcumin delivery system*, Carbohydrate Polymers, Volume 157, 2017, Pages 391-399, ISSN 0144-8617

Nasrin Zohreh, Seyed Hassan Hosseini, Ali Pourjavadi, *Hydrazine-modified starch coated magnetic nanoparticles as an effective pH-responsive nanocarrier for doxorubicin delivery*, Journal of Industrial and Engineering Chemistry, Volume 39, 2016, Pages 203-209, ISSN 1226-086X

Jinyan Lin, Yang Li, Yanxiu Li, Hongjie Wu, Fei Yu, Shuifan Zhou, Liya Xie, Fanghong Luo, Changjian Lin, and Zhenqing Hou, *Drug/Dye-Loaded, Multifunctional PEG–Chitosan–Iron Oxide Nanocomposites for Methotrexate Synergistically Self-Targeted Cancer Therapy and Dual Model Imaging*, ACS Applied Materials & Interfaces, volume 7, number 22, pages 11908-11920, 2015, doi:10.1021/acsami.5b01685, <https://doi.org/10.1021/acsami.5b01685>

Varsha Sundaresan, Jyothi U. Menon, Maham Rahimi, Kytai T. Nguyen, Aniket S. Wadajkar, *Dual-responsive polymer-coated iron oxide nanoparticles for drug delivery and imaging applications*, International Journal of Pharmaceutics, Volume 466, Issues 1–2, 2014, Pages 1-7, ISSN 0378-5173

Yanbing Cao, Juan Min, Dongye Zheng, Jiong Li, Yanan Xue, Faquan Yu, Ming Wu, *Vehicle-saving theranostic probes based on hydrophobic iron oxide nanoclusters using doxorubicin as a phase transfer agent for MRI and chemotherapy*, 2019, volume 55, pages 9015-9018, publisher: "The Royal Society of Chemistry", doi:10.1039/C9CC03868J, <http://dx.doi.org/10.1039/C9CC03868J>

Jooyeon Ahn, Yutaka Miura, Naoki Yamada, Tsukasa Chida, Xueying Liu, Ahram Kim, Ryuta Sato, Ryo Tsumura, Yoshikatsu Koga, Masahiro Yasunaga, Nobuhiro Nishiyama, Yasuhiro Matsumura, Horacio Cabral, Kazunori Kataoka, *Antibody fragment-conjugated polymeric micelles incorporating platinum drugs for targeted therapy of pancreatic cancer*, *Biomaterials*, Volume 39, 2015, Pages 23-30, ISSN 0142-9612, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.069>

Meifang Song, Yanan Xue, Lidi Chen, Xiaoyang Xia, Yang Zhou, Lei Liu, Bo Yu, Sihui Long, Shiwen Huang, Faquan Yu, *Acid and reduction stimulated logic “and” - type combinational release mode achieved in DOX-loaded superparamagnetic nanogel*, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 65, 2016, Pages 354-363, ISSN 0928-4931, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.02>

Jun-Qing Situ, Xiao-Juan Wang, Xiu-Liang Zhu, Xiao-Ling Xu, Xu-Qi Kang, Jing-Bo Hu, Chen-Ying Lu, Xiao-Ying Ying, Ri-Sheng Yu, Jian You, Yong-Zhong Du, 2016, *Multifunctional SPIO/DOX-loaded A54 Homing Peptide Functionalized Dextran-g-PLGA Micelles for Tumor Therapy and MR Imaging*, *Scientific Reports* 6,35910 (2016), Volume 1, <https://doi.org/10.1038/srep35910>

Nilkamal Pramanik, Aditya Gupta, Yashwardhan Ghanwatkar, Ram I. Mahato, *Recent advances in drug delivery and targeting for the treatment of pancreatic cancer*, *Journal of Controlled Release*, Volume 366,2024, Pages 231-260, ISSN 0168-3659

*Lorentz microscopy sheds light on the role of dipolar interactions in magnetic hyperthermia*, M. Campanini, R. Cipriana, E. Bedognib, A. Megab, V. Chiesa, F. Casolia, C. de Julián Fernández, E. Rotunnoa, F. Rossia, A. Secchib, F. Bigib, G. Salviatia , C. Magénc , V. Grilloa and F. Albertini, 2015, <https://doi.org/10.1039/C5NR00273G>

Tahani Al Sariri, Radostin D. Simitev, Raimondo Penta, *Optimal heat transport induced by magnetic nanoparticle delivery in vascularised tumours*, *Journal of Theoretical Biology*, Volume 561, 2022, ISSN 0022-5193, <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2022.111372>