



1506
UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI URBINO
CARLO BO

Università degli Studi di Urbino Carlo Bo

Dipartimento di Scienze Biomolecolari

Dottorato di ricerca in:

Metodologie Biochimiche e Farmacologiche

Ciclo XXVIII

Nanoparticelle di chitosano e ciclodestrine modificate per il rilascio *in vitro* di antiossidanti in cheratinociti umani

SSD BIO/10

RELATRICE

Chiar.ma Prof.ssa

LAURA CHIARANTINI

DOTTORANDA

Dott.ssa

GIUSI GIADA PICCERI

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

La fortuna siamo noi

G&G

INDICE

	Pag.
1. INTRODUZIONE	5
1.1.Nanotecnologie: applicazioni biomedicali e diagnostiche	5
1.2.Nanotossicologia	8
1.2.1. Progressi della nanotossicologia	9
1.2.2. Standardizzazione dei NMs e linee guida occupazionali	13
1.3.Nanomateriali utilizzati nel <i>drug delivery</i>	14
1.3.1. Carrier lipidici	15
1.3.2. Nanosospensioni e nanocristalli	18
1.3.3. Dendrimeri	18
1.3.4. Nanostrutture di carbonio	19
1.3.5. Globuli rossi	20
1.3.6. Nanoparticelle	21
1.4.Un nuovo sistema di <i>drug delivery</i> per targeting dermico: NPs di chitosano e ciclodestrine modificate caricate con Glutatione e Idebenone	25
1.4.1. Glutatione (GSH)	30
1.4.2. Idebenone (IDE)	33
2. SCOPO DELLA TESI	41
2.1.Prima fase: preparazione del <i>carrier</i>	41

2.2. Seconda fase: funzionalità in sistemi <i>cell free</i>	42
2.3. Terza fase: attività <i>in vitro</i> in cheratinociti umani	42
3. MATERIALI E METODI	43
3.1. Prima fase: preparazione del <i>carrier</i>	43
3.1.1. Nanomateriali	43
3.1.2. Preparazione di NP di GSH caricate con IDE (CS-GSH/SBE- β -CD-IDE) e NP di controllo CS-GSH/(SBE- β -CD)	43
3.1.3. Caratterizzazione chimico-fisica delle NPs	45
3.1.4. Caratterizzazione morfologica delle NPs	46
3.1. Seconda fase: funzionalità in sistemi <i>cell free</i>	47
3.2.1. Rilascio in sistemi <i>cell free</i>	48
3.2.2. Determinazione analitica di IDE e GSH	48
3.2.3. Attività antiossidante delle NPs	49
3.3. Terza fase: attività <i>in vitro</i> in cheratinociti umani	50
3.3.1. Linee cellulari	50
3.3.2. Studi di citotossicità: Saggio MTT	51
3.3.3. Attività antiossidante delle NPs in cheratinociti umani	53
3.3.3.1. Protocollo di colorazione con DCFH-DA	54
3.3.4. Valutazione del danno mitocondriale indotto	55
3.3.4.1. Protocollo di colorazione con JC-1	56
3.3.5. Determinazione del contenuto tiolico intracellulare	58
3.3.5.1. Protocollo per il dosaggio tiolico: saggio di Ellman	59
3.4. Analisi statistica dei dati	60

4. RISULTATI	61
4.1. Prima fase: preparazione del <i>carrier</i>	61
4.1.1. Caratterizzazione chimico-fisica delle NPs	61
4.1.2. Caratterizzazione morfologica delle NPs	63
4.2. Seconda fase: funzionalità in sistemi <i>cell free</i>	64
4.2.1. Rilascio in sistemi <i>cell free</i>	64
4.2.2. Attività antiossidante delle NPs	64
4.3. Terza fase: attività <i>in vitro</i> in cheratinociti umani	65
4.3.1. Citotossicità in cheratinociti umani (HaCaT e NCTC 2544)	65
4.3.2. Attività antiossidante delle NPs in cheratinociti umani	71
4.3.3. Valutazione del danno mitocondriale in cellule NCTC 2544	75
4.3.4. Valutazione del contenuto tiolico in cellule NCTC 2544	78
4.4. Criticità del progetto sperimentale	80
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE	85
6. BIBLIOGRAFIA	90

Nanoparticelle di chitosano e ciclodestrine modificate per il rilascio *in vitro* di antiossidanti in cheratinociti umani

1. INTRODUZIONE

1.1. Nanotecnologie: applicazioni biomedicali e diagnostiche

Nel corso degli ultimi vent'anni, i progressi sulla sintesi e la caratterizzazione di materiali su scala nanometrica hanno fornito agli scienziati informazioni utili per la gestione e la fabbricazione di prodotti dotati di proprietà straordinarie legate proprio alle loro dimensioni, ciò ha aperto una nuova frontiera per il miglioramento delle tecnologie nel campo delle nanoscienze [Marquis B.J. et al., 2009].

Le "Nanoscienze" sono un campo interdisciplinare che studia i fenomeni e le manipolazioni di materiali in scala atomica, molecolare e macromolecolare, con proprietà che differiscono in modo significativo di quelli in scala maggiore (Figura 1) [Zhang L. and Webster T.J., 2009].

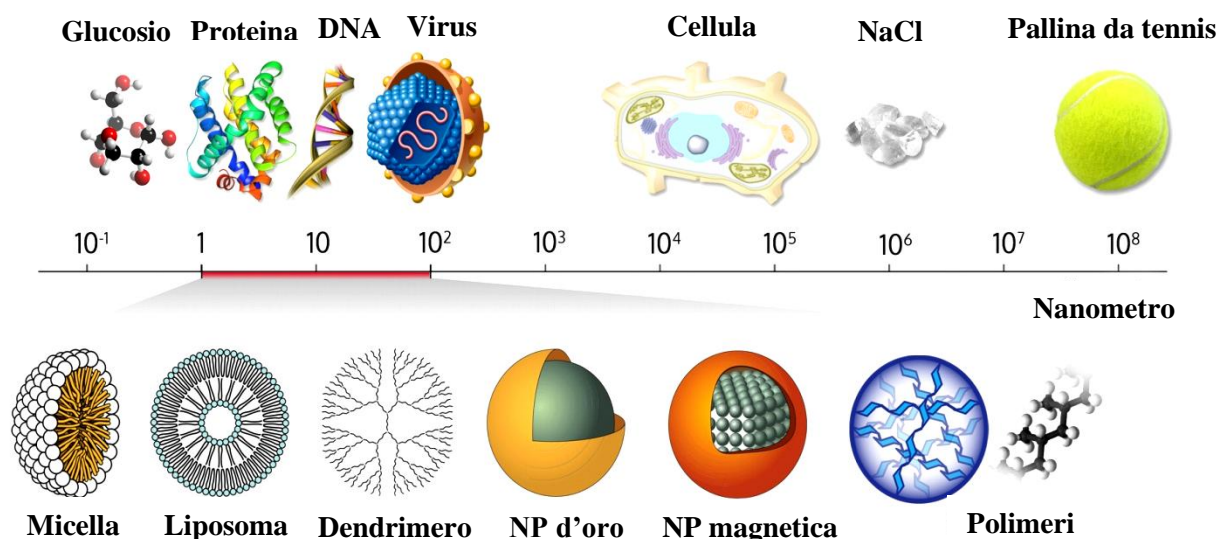


Fig. 1. Scala nanometrica riferita al diametro (nm) di diverse forme di materia. NP=nano particella.
<http://www.wichlab.com>

Per nanotecnologie si intende la progettazione, la produzione e l'applicazione di materiali di dimensioni comprese tra 0,1 nm e 100 nm, tali dimensioni possono essere utilizzate per la

realizzazione di materiali, strutture e dispositivi [Hoyt V.M. and Mason E., 2008; The Royal Society, 2004]. Il settore dei nanomateriali (NMs), attualmente, è il più avanzato, sia per le conoscenze scientifiche che per le applicazioni commerciali.

In particolare i NMs, sviluppati attraverso le nanotecnologie, per uso biomedicale rappresentano un campo di ricerca interdisciplinare di notevole interesse, in quanto hanno consentito di poter lavorare nella stessa scala dimensionale di molecole organiche, processi biologici e meccanismi cellulari; per questa ragione, la medicina ha guardato alle nanotecnologie come una possibile soluzione per la diagnosi e il trattamento di molte patologie [Morigi V. et al., 2012].

L'aspetto che più affascina gli scienziati è che grazie alla loro nanodimensione i NMs potrebbero essere in grado di attraversare le barriere biologiche, penetrare le membrane plasmatiche, nucleari e mitocondriali, e proprio per questo motivo sono altamente ricercati per le possibili applicazioni in campo biomedicale, come strumenti per la somministrazione mirata di farmaci (*drug-delivery*), la terapia oncologica, le tecniche di *imaging* o come sensori biologici [Schnackenberg L.K., 2012].

Per quanto riguarda l'utilizzo di NMs come *carriers* di molecole, essi devono possedere precise caratteristiche che sono fondamentali per il loro impiego, come: essere biocompatibili, farmaco-compatibili, biodegradabili, devono essere inoltre dotati di proprietà meccaniche tali da renderne semplice e riproducibile la progettazione [Sahoo Sk et al., 2003; Wickline SA et al., 2006].

L'avvento di protocolli e metodi per la sintesi, funzionalizzazione, e l'uso di nanoparticelle (NPs) sottoforma di *nanocarriers* ha consentito la realizzazione di un'ampia gamma di sistemi in grado di veicolare e somministrare agenti terapeutici, acidi nucleici o agenti di contrasto utilizzati nell'*imaging*.

In particolare i *nanocarriers* hanno fornito una strategia per superare il problema del *delivey* di agenti idrofobici [Zhang L. et al., 2005], ovvero molecole biologicamente attive ma scarsamente solubili in acqua, per le quali l'uso di solventi organici può indurre di per se tossicità negli organismi viventi.

L'uso di NPs come veicoli per il *drug delivery*, non solo permette di risolvere il problema della solubilità degli agenti attivi, ma è anche un modo per proteggere le molecole idrofobiche dall'ambiente esterno, finché l'agente non è rilasciato dalle NPs, ciò contribuisce anche ad aumentare la stabilità dell'agente attivo legato alle NPs finché questo non viene rilasciato [Ibrahim N.K. et al., 2002; Sethi M. et al., 2003; Koo S.H. et al., 2005; Karve S. et al., 2012].

Infine, i nanocarriers favoriscono la veicolazione dell'agente attivo in specifici siti bersaglio (*targeting*) [Au J.L. et al., 2001], con un rilascio che può essere controllato nel tempo [Karve S. et al., 2012], minimizzando gli effetti collaterali dovuti ad una più lunga permanenza del farmaco in circolo [Mortins O. et al., 2012]. Tutto ciò si traduce con una riduzione della *clearance*, un aumento dell'indice terapeutico, nonché un abbassamento della dose minima richiesta per garantire l'efficacia [Fetterly G.J. et al., 2003].

1.2. Nanotossicologia

I NMs oggi disponibili si presentano in una miriade di forme diverse, le esclusive proprietà chimico-fisiche associate ai NMs ingegnerizzati, tra cui le dimensioni, la composizione, la morfologia, la porosità, la chimica di superficie, la reattività differenziale, rendono i NMs particolarmente interessanti per l'utilizzo in applicazioni commerciali e scientifiche [Salata O.V. et al., 2004; Kessler R. et al., 2011].

Le stime attuali suggeriscono che sono stati progettati e fabbricati oltre 1600 prodotti di consumo contenenti NMs, immessi nel mercato in applicazioni che riguardano il settore energetico, elettronico, medicale, industriale, e di ricerca [Hussain S.M. et al., 2015].

Tuttavia se da un lato il numero delle NPs continua ad aumentare, dall'altro gli studi per valutare la loro potenziale tossicità non sono sufficienti [Lewinski N. et al., 2008]. Bisogna tenere presente che le proprietà chimico-fisiche conferiscono alla materia un'attività biologica unica nel suo genere, che non può essere direttamente predetta dalle proprietà dei composti e dalle sostanze chimiche che costituiscono il materiale grezzo, in quanto variano in relazione alla dimensione della materia stessa [Oberdorster G. et al., 2005]; pertanto è di estrema importanza valutare e mantenere sempre il delicato equilibrio che sussiste tra efficacia e tossicità dei NMs, prima che essi vengano introdotti in prodotti o tecnologie di consumo [Hussain S.M. et al., 2015].

Il settore della nanotossicologia si è sviluppato proprio in risposta alla mancanza di dati scientifici sull'aspetto tossicologico di diversi materiali su scala nanometrica. La nanotossicologia, ormai in vigore da oltre un decennio [Oberdörster G. et al., 2005a], ha lo scopo di studiare le possibilità che insorgano effetti dannosi a seguito di esposizione ai NMs [Dick C.A et al., 2002]; nonché di comprendere i principi di interazione dell'interfaccia nano-bio e il rapporto che sussiste tra le proprietà chimico-fisiche dei NMs e i loro profili tossicologici [Chen C. et al., 2013].

Nell'arco di questo periodo, il campo della nanotecnologia è cresciuto enormemente, compiendo notevoli progressi nel chiarire i potenziali rischi per la salute, associati all'esposizione ai NMs in un ambiente fisiologico [Nel A. et al., 2006; Love, S. A. et al., 2012].

Negli studi tossicologici condotti sui NMs vengono in genere prese in considerazione la dimensione, la forma e la dose utilizzata relazionandoli ad un effetto biologico, cercando di capire se fosse possibile elaborare un profilo tossicologico specifico per le differenti proprietà [Oberdorster G. et al., 2005]. In studi recenti, sono state osservate delle reazioni cellulari

associate a esposizione ai NMs, che risultano essere differenti in relazione ai diversi parametri chimico fisici dei NMs stessi [Sharifi S. et al., 2012; Podila R. et al 2013].

Negli ultimi dieci anni un flusso costante di pubblicazioni ha riportato come molti NMs possano indurre effettivamente citotossicità, stress ossidativo, e risposta infiammatoria, ma dalla letteratura emergono anche molte incertezze e opinioni contrastanti in merito [Clift Martin J.D. et al.; 2008 Linkov I. et al., 2008].

Pertanto è naturale che sia ancora molto dibattuto il problema di trovare procedure standard per definire il singolo NM e studiare la possibilità che esso generi un effetto tossico.

1.2.1 Progressi della nanotossicologia

Nel 2005, l'*International Life Sciences Institute Research Foundation/Risk Science Institute* (ILSI) ha istituito un'assemblea di un gruppo di ricercatori esperti, con lo scopo di valutare lo stato attuale sulle conoscenze tossicologiche dei NMs, per redigere delle linee guida che favoriscano la progressione di questo nuovo campo di ricerca. [Oberdorster et al., 2005a].

Questo gruppo di lavoro il cui compito primario era quello di effettuare uno *screening* per l'identificazione del rischio a seguito di esposizione ai NMs, ha valutato il potenziale tossicologico di semplici nano-costrutti costituiti da ossidi di metalli e strutture di carbonio [Braydich-Stolle L. et al., 2005; Hussain S.M. et al., 2005; Oberdorster et al., 2005b].

Sempre nel 2005 vennero concordate e identificate le vie principali di esposizione ai NMs, la via orale, cutanea, aerea e parenterale [Oberdorster G. et al., 2005a].

A causa del fatto che i NMs possiedono proprietà chimico-fisiche distinte rispetto ai loro omologhi costituiti da una massa maggiore si è cercato di sviluppare tutta una serie di procedure di caratterizzazione avanzata, con lo scopo di valutare con precisione tutti i parametri necessari per definirne gli aspetti tossicologici.

La nanotossicologia ha contribuito a guidare questa caratterizzazione rivoluzionaria attraverso la richiesta di procedure standard che consentissero la valutazione approfondita dei NMs prima dell'inserimento in applicazioni nanotecnologiche [Bouwmeester H. et al, 2013, Warheit D.B. 2013].

Nelle procedure standard di caratterizzazione dei NMs i parametri che vengono valutati includono la dimensione, la morfologia, la carica superficiale, la porosità, la composizione e la struttura [Murdock R.C. et al, 2008; Richman E. K. and Hutchison J. E. 2009; Sapsford K.E. et al., 2011]. Altri parametri critici che possono essere accertati comprendono il grado di agglomerazione e di distribuzione delle dimensioni in quanto sono degli aspetti che possono

influenzare le interazioni cellulari. Esistono diverse classi di apparecchiature fondamentali per caratterizzare i NMs, tra cui la microscopia, la spettroscopia, e la spettrometria. D'altra parte diverse tecniche di caratterizzazione e di misurazione dei NMs sono al centro di una serie di lavori in corso di revisione [Baer D. et al., 2010; Lin P.C. et al., 2013.; Sayes C.M., and Warheit D.B. 2009].

La caratterizzazione completa dei NMs comprende anche la valutazione del tipo e del grado di interazione che sussiste con il sistema cellulare circostante, tale interazione è comunemente chiamata "interfaccia nano-cellula". A tal proposito, vari studi sperimentali eseguiti in prove *in vitro* hanno preso in esame tutta una serie di aspetti importanti per questo tipo di valutazione, ovvero l'efficienza di deposizione dei NMs, il grado di internalizzazione, il grado di agglomerazione intracellulare, l'espressione di proteine di superficie, parametri che sono stati fortemente correlati a citotossicità, stress ossidativo e modulazione genica [Wu Y.L. et al. 2013]. Nello specifico, una maggiore efficienza di deposizione è stata correlata ad un aumento della dose dei NMs e a sua volta ad una maggiore tossicità [Cohen J.M. et al., 2014]. E' stato dimostrato a sua volta che una maggiore internalizzazione dei NMs produce stress cellulare [Debrosse M.C. et al 2013; Dowding J.M. et al 2013] e che la composizione proteica della superficie dei NMs è direttamente coinvolta nei meccanismi di interazione, endocitosi e di deposizione all'interno delle cellule [Monopoli M.P. et al 2012; Gunawan C. et al, 2014]. Un aspetto critico della valutazione dell'interfaccia nano-bio è rappresentato dal fatto che questa interfaccia è estremamente dinamica, in continua evoluzione all'interno di un sistema cellulare [Alkilany A.M. et al., 2013].

Sebbene oggi la tossicologia tradizionale dispone di protocolli ben consolidati, l'applicazione di questi metodi in nanotossicologia è in genere poco efficace e induce spesso a errore sperimentale, dovuto proprio ai diversi profili di tossicocinetica dei NMs esistenti [Derelanko M.J. and Auletta C.S. 2014]. Dalle prime valutazioni nanotossicologiche è apparso chiaro che le risposte cellulari erano dipendenti dalla natura specifica dei NMs [Podila R. and Brown J.M. 2013; Sharifi S. et al., 2012], così i progressi apportati nella scienza dei materiali hanno permesso di poter definire i parametri esatti di riferimento che bisogna tenere in considerazione quando vengono sintetizzati e progettati dei nuovi NMs, tra questi la dimensione, la chimica superficiale, la composizione, e la morfologia. Una sintesi rappresentativa di questi parametri è indicata in Figura 2.

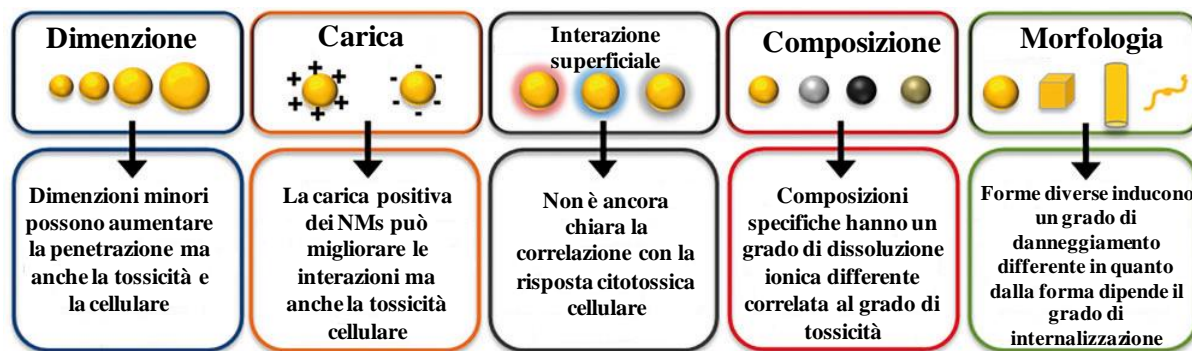


Fig. 2. Sintesi dei parametri chimico-fisici principali dei NMs. Le proprietà dei NMs influenzano la nanotossicità e le risposte cellulari [Hussain S.M. et al. 2015].

Dimensione

La dimensione delle particelle elementari è senza dubbio la proprietà più critica in una risposta di nanotossicologia, in quanto influenza il tipo e il grado di interazione cellulare, i meccanismi di endocitosi e di internalizzazione dei NMs [Jiang W. et al., 2008]. Diversi studi sono arrivati alla conclusione che le particelle con dimensioni inferiori inducono un maggiore grado di morte cellulare [Sohaebuddin S.K. et al., 2010; Haase A. et al, 2011; Hsiao I. and Huang Y. 2011], ciò però è stato correlato ad un aumento della produzione di ROS, alla perdita dell'integrità mitocondriale, e all'aumento della secrezione di citochine proinfiammatorie.

Chimica di superficie

La chimica superficiale di rivestimento di un NM determina le interazioni interparticellari, nonché la formazione dell'interfaccia nano-cellula, il meccanismo di contatto cellulare, il grado di internalizzazione del NM, e la conseguente citotossicità [Chen L. et al., 2011]. Diversi studi hanno identificato che NMs aventi carica positiva vengono più efficientemente internalizzati, e sono quelli maggiormente correlati con una risposta tossica, rispetto a NMs aventi carica negativa o neutra [Bhattacharjee S. et al., 2010; Yu B. et al., 2012; Zhu Z.J. et al., 2012]. D'altra parte diversi studi sono ancora in corso con lo scopo di chiarire una correlazione tra la chimica di superficie e il conseguente effetto biologico, poiché i risultati non sempre sono concordanti. Attualmente, non è possibile predire la citotossicità dei NMs dalla loro funzionalizzazione superficiale, in quanto dipendente a sua volta dal grado di

dissoluzione ionica [Bhattacharjee S. et al., 2010], dalla cinetica di internalizzazione cellulare [Untener E.A. et al., 2013], e dalla stabilità della particella [Suntivich J. et al., 2013].

Composizione

A prescindere dal tipo di rivestimento superficiale, il grado e il meccanismo di citotossicità del NM correla con la composizione interna del suo nucleo [Sohaebuddin S.K. et al., 2010]. Infatti diversi processi chimico-biologici dipendono fortemente dalla natura del materiale che compone il nucleo dei NMs [Chang Y.N. et al., 2012.; Hussain S.M. et al., 2005]. A tal proposito sono stati identificati alcuni elementi costitutivi che risultano essere più tossici di altri tra cui: Cu, Zn, Co, Ag, Ni, e Cd , rispetto ad esempio a Au, Ti, e Fe.

Morfologia

Le sfide attuali della ricerca tossicologica si stanno concentrando sulla possibilità di trovare una correlazione tra la forma dei NMs e una risposta biologica

Sebbene stanno emergendo un certo numero di studi in merito, vi sono ancora diverse evidenze contrastanti, che non hanno consentito prima di poter chiarire completamente questo aspetto. È stato dimostrato che particelle che hanno una forma sferica vengono internalizzate più facilmente e in minor tempo richiedendo meno energia, rispetto all'internalizzazione di particelle a forma di tubi o di fibra [Champion J. A. and Mitragotri S., 2006]. Tuttavia, anche se i nanotubi presentano un più basso tasso di internalizzazione cellulare, avendo una più grande superficie di contatto dispongono a sua volta di una maggiore zona di interazione, che introduce una nuova serie di variabili intracellulari che meritano ulteriori indagini [Lu Z. et al., 2010].

Meccanismi di Citotossicità

Oltre a identificare le proprietà dei NMs che inducono citotossicità, indagini in corso stanno valutando i meccanismi biochimici alla base di queste risposte [Hussain S.M. et al. 2015].

Pertanto si stanno prendendo in considerazione varie tipologie di risposte cellulari potenziali, che vanno al di là dei processi di stress ossidativo, fra cui l'attivazione di reazioni immunitarie e infiammatorie, la regolazione genica, le modificazioni sull'espressione e la produzione di proteine, nonché modificazione dei processi di trasduzione di *signaling* metabolici [Braydich-Stolle L.K. et al., 2010;. Comfort K.K. et al., 2011].

L'attivazione di processi metabolici differenziali a seguito dell'esposizione ai NMs generano una serie di risposte variabili che la comunità scientifica ha solo cominciato a mettere insieme [Sharifi S. et al., 2013; Comfort K.K. et al., 2014a; Ng C.T. et al., 2015].

1.2.2. Standardizzazione dei NMs e linee guida occupazionali

Considerate le sostanziali differenze che sussistono tra i vari NMs, il *National Institute of Standards and Technology* (NIST) ha concordato recentemente gli standards di riferimento dei NMs, allo scopo finalmente di definire delle linee guida di riferimento per l'introduzione di nuovi NMs e metodi di validazione. L'utilizzo di materiali standards è stato fondamentale per la regolamentazione dei limiti di esposizione occupazionali (OELs) stabiliti dall'agenzia OSHA e dal *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) [Hussain S.M. et al., 2015].

Inoltre con lo scopo di fornire informazioni più dettagliate ai consumatori, circa il rischio di esposizione ai NMs, nel 2007 è stato pubblicato un database sui rischi associati a determinati NMs, descrivendo lo sviluppo di processi sistematici utili a valutare il rischio per la salute e la sicurezza ambientale, associata all'esposizione di prodotti contenenti materiali in scala nanometrica (www.nanoriskframework.com) [Hussain S.M. et al., 2015].

1.3. Nanomateriali utilizzati nel *drug delivery*

I NMs sviluppati attraverso le nanotecnologie per uso biomedicale, vedono la loro applicazione per scopi sia diagnostici che terapeutici, tra questi si distinguono dunque NMs utilizzati come strumenti per la somministrazione mirata di farmaci (*drug delivery*) una tecnica che trova largo impiego nella terapia oncologica, come sensori biologici per la marcatura di DNA [Mahtab R. et al., 1995], di strutture proteiche [Nam J.M. et al., 2003], o per la rilevazione di agenti patogeni [Edelstein R.L. et al., 2000], o utilizzati come agenti di contrasto nelle tecniche *imaging* a risonanza magnetica.

I NMs utilizzati nel *drug delivery* (Figura 3) includono: carrier lipidici (liposomi, nanoemulsioni, nanocapsule lipidiche), *carrier* a base di tensioattivi (niosomi, micelle), nanosospensioni e nanocristalli, nanogels, dendrimeri, nanostrutture di carbonio (fullereni e nanotubi) e NPs [Nilesh J. et al., 2010].

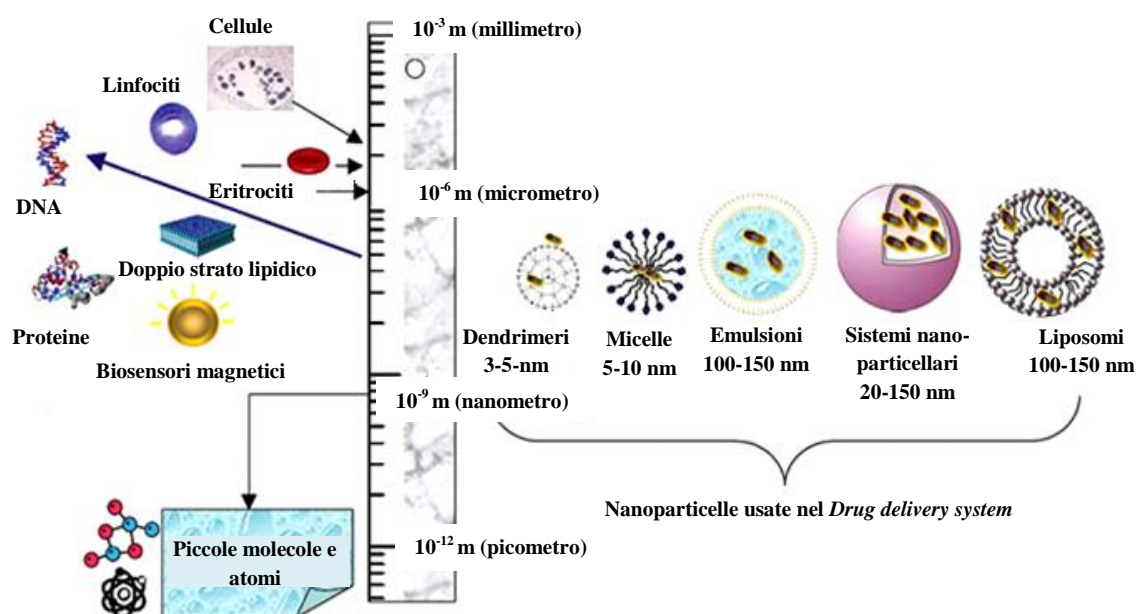


Fig. 3. Esempi di carrier utilizzati come sistemi di drug delivery [Arruebo M. et al., 2007].

1.3.1. Carrier lipidici

Liposomi

I liposomi sono stati utilizzati per veicolare farmaci fin dagli anni '60 [Bangham A.D. et al., 1965] e sono delle vescicole nelle quali un volume acquoso è completamente circondato da una membrana fosfolipidica [Koo O.M. et al., 2005].

La grandezza dei liposomi varia da 30 nm ad alcuni μm , possono essere monolamellari, composti da un singolo bilayer lipidico a contenuto idrofilo, o multilamellari composti da strati concentrici con i diversi bilayer lipidici separati dalla fase acquosa [Akbarzadeh AQ. et al., 2013]. Le proprietà di queste vescicole sono state ampiamente studiate, e possono variare per grandezza, composizione lipidica, carica di superficie e metodo di preparazione utilizzato [Sethi M. et al., 2005].

I liposomi sono in grado di trasportare sia molecole liposolubili che idrosolubili, infatti un farmaco di natura idrofilica, anche se non è in grado di attraversare il doppio strato lipidico del liposoma, può essere ancorato all'interno del core di natura acquosa, mentre molecole idrofobiche possono essere trasportate attraverso legame con il doppio strato lipidico che costituisce il rivestimento del liposoma [Johnston M.J. et al., 2007; Jain N. et al., 2010].

I vantaggi e i limiti legati all'utilizzo dei liposomi come *drug delivery system* risiedono principalmente sul meccanismo di interazione e internalizzazione dei liposomi in sistemi cellulari, nonché sui processi di eliminazione che vengono attivati *in vivo* a seguito di somministrazione. Da studi condotti sia *in vivo* che *in vitro* è stato dimostrato che il principale meccanismo di internalizzazione dei liposomi all'interno delle cellule si realizza mediante adsorbimento (attraverso interazioni specifiche con componenti presenti sulla superficie cellulare) o mediante endocitosi (che avviene attraverso fagocitosi per attivazione del sistema reticolo endoteliale, ad esempio per azione dei macrofagi o dei neutrofili) [Akbarzadeh AQ. et al., 2013].

Uno degli aspetti più critici nell'utilizzo dei liposomi è che seppur costituiti da biomembrane sono riconosciuti come elementi estranei dall'organismo [Akbarzadeh AQ. et al., 2013], di conseguenza per impedire il riconoscimento e l'opsonizzazione da parte dei macrofagi a seguito di somministrazione, è stato necessario apportare diverse modifiche di superficie, mediante l'incorporazione di destrani lineari [Pain et al., 1984], acido sialico [Allen and Chonn 1978] e polimeri sintetici derivati dall'ossido di etilene come il PEG [Lasic et al., 1991], quest'ultimo è in grado di ridurre la percentuale di captazione da parte dei macrofagi,

aumentando di consanguineità l'emivita circolante dei liposomi [Akbarzadeh AQ. Et al., 2013].

Attraverso i liposomi sono stati veicolati diverse classi di farmaci e molecole biologiche fra questi, antibiotici, antiossidanti (retinoidi, carotenoidi, tamoxifene, urato, glutazione, ecc), vitamine (vitamine A, C ed E), emoglobina, ATP, FANS (indometacina e naprossene) e materiale genetico (DNA plasmidico) [Jain N. et al., 2010]. Parecchie formulazioni tra cui amfotericina B e daunorubicina sono state commercializzate con successo [Davidson R.N. et al., 1991; Guaglianone P. et al., 1994]. Inoltre attraverso l'utilizzo di liposomi *stealth*, ovvero vescicole di forma sferica costituite da un doppio strato fosfolipidico le cui catene lipidiche sono legate stabilmente da polimeri di PEG, è stato sviluppato con successo un sistema in grado di favorire il rilascio di doxorubicina, attualmente disponibile in commercio come Doxil (Janssen Biotech, Inc., Horsham, Stati Uniti d'America) o Caelyx (Schering-Plough Corporation, Kenilworth, USA) per il trattamento tumori di solidi. [Akbarzadeh AQ. Et al., 2013].

Niosomi

I niosomi sono vescicole costituite da tensioattivi non ionici strutturalmente simili ai liposomi. Essi possono incapsulare molecole idrofile e consentirne il *delivery*. I niosomi sono formati dall'autoassemblaggio di sostanze anfifiliche non ioniche in mezzo acquoso. I niosomi sono facilmente captati da organi come il fegato e la milza ciò fa dei niosomi uno dei migliori sistemi di *delivery* di farmaci per la cura di malattie che colpiscono proprio questi organi. Inoltre, poiché gli antigeni niosomiali sono dei potenti stimolatori del sistema immunitario, essi sono anche usati come adiuvanti durante i processi di vaccinazione. I niosomi hanno visto il loro impiego nel *delivery* di agenti antinfiammatori, e nella loro forma PEGilata per il *delivery* cellulare di oligonucleotidi. E' stato riportato che i niosomi migliorano la permeabilità cutanea di 5-fluorouracile (5-FU) attraverso lo strato corneo della cute.

Inoltre è stato anche dimostrato che i niosomi costituiti da frusamide sono in grado di aumentare la permeabilità cutanea di quantità differenti di farmaco [Uchegbu I.F. and Vyas S.P. 1998].

Micelle

Le micelle sono anch'esse delle nanostrutture lipidiche di forma sferica ma non dispongono né di un doppio strato lipidico né di una cavità interna. In questa struttura sferica le estremità idrofobe dei fosfolipidi sono rivolte verso la parte interna mentre le estremità idrofile sono rivolte verso l'esterno, nelle micelle inverse i fosfolipidi hanno orientamento opposto. La dimensione tipica delle micelle per applicazioni farmaceutiche varia nel range 10-80 nm. Rispetto ai liposomi, le micelle probabilmente a causa delle dimensioni più piccole hanno un'emivita inferiore, tuttavia, è proprio grazie alle loro dimensioni che sono in grado di penetrare le cellule tumorali più facilmente. Esistono micelle costituite dal complesso lipide-polimero, utilizzate per il *delivery* di diversi farmaci come il paclitaxel, diazepam e captotecina, queste micelle mostrano una buona longevità e stabilità circolante [Jain N. et al., 2010]. Micelle con una maggiore solubilità sono state ottenute mediante coniugazione con PEG-fosfatidiletanolamina (PEG-PE), mentre micelle coniugate con transferrina possono essere utilizzate nel *delivery* di DNA in cellule tumorali. Il vantaggio di questi sistemi *carrier* è sicuramente dovuto alle piccole dimensioni che favoriscono una più agevole penetrazione del farmaco nel sito bersaglio [Kwon G.S. and Kataoka K. 1995; Krishnadas A. et al., 2003].

Nanoemulsioni

Le nanoemulsioni possono essere definite come emulsioni di olio in acqua (O/A oppure A/O) le cui goccioline costitutive possono avere un diametro che va da 50 a 1000 nm. Di solito le nanoemulsioni che vengono utilizzate hanno una dimensione media delle goccioline che è compresa tra 100 e 500 nm. I termini *submicron emulsion* (SME) e mini-emulsione sono usati come sinonimi. Generalmente, le SME contengono circa il 10-20 % di olio stabilizzato con il 0,5-2 % di lecitina di soia. Le nanoemulsioni hanno un aspetto trasparente o traslucido e possono essere considerate come delle dispersioni di goccioline su scala nanometrica di un liquido all'interno di un altro [Tadros T. et al., 2004].

Nanocapsule lipidiche (LNCs)

Questi sistemi possono essere considerati come un incrocio tra i liposomi e le nanoemulsioni, e hanno dimensioni che possono essere inferiori anche a 100 nm. La loro parete esterna è più spessa rispetto a quella presente nelle nanoemulsioni tradizionali e ciò consente una migliore e controllata funzionalizzazione con agenti attivi. Le LNCs sono costituite da un nucleo

liquido e oleoso (trigliceridi a catena media) circondato da tensioattivi idrofili e lipofili. LNCs sono state utilizzate per il *delivery* di farmaci antitumorali, nel trattamento terapeutico con radionuclidi in grado di attraversare la barriera emato encefalica (BEE) mediante coniugazione con anticorpi o frammenti di questi [Allard E. et al., 2008].

1.3.2. Nanosospensioni e nanocristalli

Le nanosospensioni sono dispersioni colloidali di nanoparticelle di un farmaco insolubile in ambiente acquoso. Questo sistema di *drug delivery* può essere utilizzato per mantenere i farmaci ad uno stato cristallino con dimensioni sufficientemente piccole da consentirne la somministrazione intravenosa. Le NPs che si formano hanno un diametro che è compreso tra 200 e 400 nm e richiedono tensioattivi per evitare l'aggregazione. La nanosospensione di farmaci idrofobi allo stato solido è chimicamente stabile e permette il caricamento di alte dosi di farmaco [Muller and Keck, 2004].

I nanocristalli sono degli aggregati di circa 10-100 migliaia di atomi che sono combinati a formare un "cluster". Hanno delle caratteristiche chimico-fisiche modificabili, compreso la superficie di interazione, la conduttività, la struttura cristallina. I nanocristalli devono essere stabilizzati per evitare la formazione di aggregati di dimensione più grande. I nanocristalli sono prodotti mediante nanosonicazione. Il processo di sintesi prevede la formazione di una nanosospensione ad alta velocità, seguita da macinazione, omogenizzazione ad alte pressioni, nanocristallizzazione ed essiccazione, al fine di creare cristalli di dimensioni nanometriche.

I vantaggi della nanocristallizzazione sono la capacità di solubilizzare molecole idrofobe, l'elevata biodisponibilità, e una notevole capacità di carico di molecole farmacologiche [Jain N. et al., 2013].

1.3.3. Dendrimeri

I dendrimeri sono nanostrutture micellari unimolecolari, monodisperse, la cui struttura simmetrica è regolarmente ramificata con un elevato numero di gruppi funzionali terminali. Queste strutture 3D sono robuste e sono in grado di legare molecole farmacologiche sia nel core interno (*nano-container*), sia a livello della superficie esterna funzionalizzata (*nano-scaffold*). I dendrimeri maggiormente studiati sono i poli(amidoamine) dendrimeri (PAMAM). I dendrimeri possono essere realizzati mediante un metodo divergente dove il dendrone si dirama da un nucleo centrale verso l'esterno, o attraverso un metodo convergente

dove i dendrimeri crescono verso l'interno in direzione di un unico punto focale [Hawker C.J. and Frechet J., 1990]. Uno dei vantaggi dei dendrimeri è che essi sono di dimensioni simili a molte proteine e biomolecole come l'insulina, il citocromo C e l'emoglobina. I dendrimeri di seconda generazione hanno dimensione simile a quella del DNA (2.4 nm), mentre dendrimeri PAMAM di 5° e 6° generazione hanno diametro simile a quello delle membrane cellulari (~5.5 nm). La capacità di carico dei dendrimeri può essere manipolata con l'aggiunta di diverse molecole sulla superficie [Jain N. et al., 2010].

I dendrimeri PAMAM complessati con la indometacina hanno mostrato, in ratti artritici, un'attività antinfiammatoria maggiore rispetto a quando il farmaco viene dato in forma libera [Chuhan A.S. et al., 2004]. Gli stessi dendrimeri PAMAM sono stati utilizzati tramite la complessazione con acido folico e metotrexato, tali complessi hanno mostrato avere effetti citotossici nei confronti di cellule di carcinoma epidermico umano [Quintana A. et al., 2002]. Anche il DNA può essere complessato con i dendrimeri, queste strutture con dimensioni di 100-175 nm aumentano l'efficienza di transfezione [Braun C.S. et al., 2004]. La tossicità e l'immunogenicità dei dendrimeri è stata notevolmente ridotta grazie all'aggiunta di PEG e acidi grassi [Jevprasesphant R. et al.2003, Nigavekar S.S. et al., 2004].

1.3.4. Nanostrutture di carbonio

Nanotubi di carbonio (CNTs)

I CNTs hanno la capacità di trasportare molecole farmacologiche, proteine e nucleotidi. Grazie alla loro forma e dimensione, i nanotubi di carbonio possono penetrare le cellule viventi senza indurne la morte o danni evidenti. Le molecole attive possono essere legate covalentemente o non alla superficie [Star A et al., 2001; Lin Y et al., 2002], d'altra parte la struttura cava dei CNTs permette l'incapsulamento di molecole. Diversi farmaci sono stati incapsulati con successo, tra cui l'amfotericina B³², che normalmente è insolubile e tossica per la sua tendenza ad aggregare. Attraverso questo sistema di *drug- delivery* si è osservato un aumento della solubilità, una minore aggregazione del farmaco (dunque una minore tossicità) e una maggiore azione anti-fungina. Sono state riportate un certo numero di applicazioni dei CNTs, fra questi il *delivery* di geni e siRNA [Liu Z. et al., 2009].

Fullereni

I fullereni hanno una struttura sferica formata da sessanta atomi di carbonio equidistanti dal centro. Questa molecola ha proprietà simili a grafite e diamanti, inizialmente questa molecola venne chiamata “buckminsterfullerene” e successivamente “fullerene” in onore di Richard Fullere, architetto celebre per aver diffuso la cupola geodetica. Queste nanostrutture derivate dal carbonio, se purificate hanno una tossicità cellulare *in vitro* molto bassa e non inducono risposte infiammatorie nei tessuti *in vivo* [Fiorito S. et al., 2004]. Recenti esperimenti hanno mostrato un effetto inibitorio di queste particelle sulla risposta allergica, attraverso una significativa riduzione del rilascio di IgE [Ryan J.J. et al., 2007]. I fullereni inoltre hanno mostrato la capacità di inattivare i radicali dell’ossigeno comportandosi come l’enzima superossido-dismutasi [Ali S.S. et al., 2004], e proprio per questo motivo sono stati classificati da alcuni autori come una nuova classe di citoprotettori [Dugan L.L. et al., 2001].

1.3.5. Globuli rossi

I globuli rossi dispongono di peculiari caratteristiche che li rendono dei *carrier* ideali per il *delivery* di molecole farmacologiche somministrate per via parenterale, essi sono infatti biodegradabili, non tossici né immunogenici se reinfusi nello stesso donatore o in uno compatibile.

Sono stati proposti numerosi procedimenti per il caricamento di molecole all’interno dei globuli rossi, e tra quelli descritti in letteratura, il metodo basato sulla dialisi ipotonica è quello maggiormente rappresentativo [Rossi L. et al., 2003].

Gli eritrociti possiedono un volume cellulare relativamente grande e, quindi un’elevata capacità, per cui è possibile ottenere una notevole percentuale di caricamento.

I globuli rossi inoltre non si comportano come semplici *carriers*, ma possono funzionare da bioreattori capaci di intervenire attivamente nella trasformazione delle sostanze trasportate [Hoffman J.F., 1992]. A tal proposito infatti possono essere incapsulati negli eritrociti dei precursori inattivi di farmaci, che grazie agli enzimi presenti nei globuli rossi, possono essere convertiti nella forma attiva e essere rilasciati in circolo. [Annese V. et al., 2005].

I globuli rossi sono stati utilizzati per il trasporto di numerosi farmaci convenzionali [Pierigè F. et al., 2008], l’applicazione più frequente vede l’utilizzo di questi *carrier* per il *delivery* di enzimi ricombinanti in trattamenti di detossificazione di metabolici tossici per malattie di accumulo [Magnani M. et al., 1989; 1990; Lizano C. et al., 1998; Millan C.G. et al., 2004] o in trattamenti enzimatici sostitutivi [Bax B.E. et al., 2007; Moran N.F. et al., 2008].

1.3.6. Nanoparticelle

NPs costituite da albumina

L'albumina è la proteina sierica maggiormente espressa e, dispone sulla sua superficie di gruppi amminici e carbossilici in grado di formare legami covalenti con diversi farmaci o altre proteine [Hawkins M.J. et al., 2008]. Le NPs di albumina funzionalizzate con molecole attive sono in grado di attraversare la BEE [Mishra V. et al., 2006]. L'uso di questo tipo di NPs è stato approvato nel 2005 dall'FDA per il trattamento di tumori metastatici [Koo O.M. et al., 2005]. A tal proposito, un esempio di impiego è stato quello nel tumore metastatico al seno dove le NPs erano costituite da albumina (nabTM) leganti il farmaco chemioterapico paclitaxel (nab-paclitaxel; Abraxane®) [Hawkins M.J. et al., 2008]. Le NPs utilizzate avevano una dimensione di circa 130 nm, e mostravano avere una citotossicità molto più bassa rispetto a quando il farmaco viene dato in forma libera [Garber K., 2004]. Le NPs di albumina sono state studiate anche per il *delivery* di DNA (DNA-polietilammina-albumina), ciò ha portato alla formazione di complessi albumina-DNA che hanno consentito la veicolazione delle NPs evitandone l'opsonizzazione e la fagocitosi da parte dei macrofagi reticolo-endoteliali; anche in questo caso le NPs sono risultate meno tossiche rispetto alle particelle di DNA-polietilammina [Rhaese S. et al., 2003], in quanto quest'ultime danneggiano le membrane cellulari.

NPs d'oro

Le NPs d'oro colloidale sono state utilizzate per molto tempo nel trattamento di malattie come il cancro, l'artrite reumatoide, la sclerosi multipla e patologie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer. I vantaggi dell'utilizzo di queste NPs sono legati sicuramente alla loro semplice preparazione, sono disponibili in diverse dimensioni, sono biocompatibili, sono facilmente funzionalizzate e possono essere coniugate con diverse biomolecole senza alterarne le proprietà biologiche. NPs d'oro con diametro ≤ 50 nm sono in grado di attraversare la BEE [Jain N. et al., 2010], mentre se PEGhilate, ovvero legate a polietilenglicoli e coniugate con TNF (Tumor Necrosis Factor) sono in grado di entrare nelle cellule tumorali mediante somministrazione intra-venosa [Jiang J. and Bischof J. 2010].

NPs magnetiche

Le NPs magnetiche sono diventate tra le NPs più studiate negli ultimi anni nel campo della nanotecnologia. Le applicazioni che coinvolgono queste NPs comprendono la somministrazione mirata di farmaci, il *delivery* di agenti di contrasto in risonanza magnetica (ad esempio il Feridex), il *gene-delivery*, o il *labelling* cellulare. Tra le NPs magnetiche sono state ampiamente studiate le NPs di ossido di ferro per le loro interessanti proprietà di biodegradabilità, biocompatibilità e proprietà superparamagnetiche ideali per applicazioni MRI (magnetic resonance imaging), a tal proposito si fa riferimento allo sviluppo di nuove nanoparticelle superparamagnetiche di ossido di ferro (SPIO) e particelle superparamagnetiche ultra piccole (USPIO) appositamente sviluppate come agenti di contrasto in applicazioni MRI e somministrate attraverso i globuli globuli rossi caricati con queste NPs [Antonelli A. et al., 2013]. NPs magnetiche rivestite con acido oleico possono essere utilizzate per il *delivery* di agenti antitumorali come doxorubicina o paclitaxel con un'efficienza di carico pari al 95% [Okon E., 1994].

NPs di ceramica

NPs di silicio, titanio, e allumina sono normalmente classificate come NPs ceramiche [Roy I et al., 2003]. Hanno numerosi vantaggi, sono infatti biocompatibili e la superficie può essere facilmente modificata tramite l'aggiunta di ligandi o gruppi funzionali, possono essere di qualsiasi forma, porosità e dimensione [Koo O.M. et al., 2005; Angelos S. et al., 2008]. La loro dimensione tipica è di circa 50 nm. Non sono suscettibili a cambiamenti in funzione del pH e della temperatura [Jain N. et al., 2010]. NPs ceramiche sono state utilizzate per formare complessi ternari con DNA e dendrimeri [Gemeinhart R.A. et al., 2005]. In questi sistemi di *delivery*, la struttura compatta permette di concentrare il DNA sulla superficie di cellule in coltura, da qui il DNA verrebbe portato all'interno della cellula tramite fagocitosi, aumentando notevolmente l'efficienza di transfezione del DNA [Koo O.M. et al., 2005 Giri S. et al., 2007].

La progettazione di queste NPs, tuttavia, può presentare non pochi problemi, fra questi la cattura delle NPs dalla fase gassosa, nonché la necessità di grandi volumi di solventi per la sintesi. A tal proposito, presso l'università della Florida, un gruppo di ricercatori ha sviluppato un metodo migliore per la formazione di NPs ceramiche, facilitando la produzione in larga scala di NPs con forma e dimensioni regolari a costi ridotti [Roy I. et al., 2003].

NPs solide lipidiche (SLNs)

Le SLN sono particelle nanometriche formate da una matrice lipidica solida stabilizzata mediante tensioattivi. Il vantaggio di queste NPs è che si può evitare l'impiego di solventi organici per la preparazione, consentono il rilascio controllato di farmaci idrofobici proteggendoli dall'ambiente acquoso. Le SLNs sono sistemi in grado di favorire il *delivery* di farmaci mediante somministrazione parenterale e la dimensione media del diametro delle particelle va da 50 a 1000 nm. Queste NPs vengono spesso prodotte mediante omogeneizzazione, che avviene ad alta pressione utilizzando soluzioni acquose costituite da tensioattivi contenenti la componente lipidica miscelata al farmaco da caricare allo stato liquido o solido (500/1500 bar, 3/10 cicli). Le SLNs sono state utilizzate in applicazioni farmaceutiche come il rilascio di paclitaxel e il *delivery* prolungato di doxorubicina [Jain N. et al., 2010] ed in prodotti cosmetici. Sebbene le SLN sembrano essere dei promettenti sistemi di *delivery*, presentano diversi svantaggi, esse infatti hanno una bassa capacità di carico, e tendono a espellere il contenuto durante la conservazione [Cavalli R. et al., 2000].

Carrier lipidici nanostrutturati (NLCs)

Per superare i limiti delle SLNs, sono state sviluppate una seconda generazione di particelle lipidiche, ottenute mescolando lipidi solidi con lipidi liquidi e prendono il nome di NLCs (*nanostructured lipid carriers*). Rispetto alle SLN le NLCs hanno una struttura meno organizzata che genera una matrice non uniforme, ciò favorisce la formazione di spazi utili in grado di accogliere le molecole degli agenti attivi. Le NLCs possono essere generate attraverso varie tecniche anche se il metodo preferenziale di produzione rimane l'omogeneizzazione ad alta pressione. Questi sistemi sono stati studiati oltre che per formulazioni orali e parenterali, anche per la somministrazione topica di farmaci, fra questi anti-antimicotici e antinfiammatori non steroidei, nonché per applicazioni di prodotti cosmetici [Pardeike J. et al., 2009].

Nanogels

I nanogels sono dei reticolati di NPs formati da polimeri flessibili di natura idrofila. Essi sono solubili in acqua e consentono il caricamento di farmaci in mezzo acquoso. Il meccanismo di preparazione è abbastanza semplice: quando il nanogel viene caricato con un farmaco esso subisce un collasso che determina la formazione delle NPs. I nanogels possiedono un'ampia

superficie di legame, la cui dimensione è modificabile, costituita da un importante *network* che consente il legame con le molecole di interesse.

Le particelle di un nanogel composto da PEG e polietilenimina (> 100 nm) sono in grado di attraversare la BEE e rilasciare oligonucleotidi al cervello. I nanogels sono stati utilizzati anche per il rilascio pH-dipendente di doxorubicina nonché per il *delivery* di piccole molecole insolubili antitumorali [Greewald R.B. et al., 2003].

NPs di chitosano

Il chitosano è un polimero policationico, ottenuto dalla parziale N-deacetilazione della chitina componente costitutivo del guscio di crostacei e artropodi, risulta essere uno dei polimeri naturali più studiati nei sistemi di *drug-delivery*, grazie soprattutto alla sua importante biocompatibilità, biodegradabilità e bassa immunogenicità [Muzzarelli R.A.A., 1995]. Ad oggi gli studi svolti sulla formulazione di *carrier* e *delivery systems* a base di chitosano sono numerosi, in particolare essi riguardano la veicolazione di macrosoluti ad attività terapeutica come geni e molecole proteiche; tale specifica propensione è giustificata prevalentemente dalla carica positiva posseduta dal chitosano che va ad interagire con molecole caricate negativamente, come DNA e alcune proteine, formando dei complessi.[S.C. W. Richardson, H. et al., 1999; Janes K.A. et al., 2001]. Le NPs di chitosano sono degli ottimi promotori di assorbimento sia per la somministrazione di farmaci per via orale che nasale, [Richardson S.C.W. et al., 2001] ma trovano [Zheng X. et al., 2009] larga applicazione anche nel rilascio sito specifico al colon, nel rilascio di vaccini e nelle terapie antitumorali [Agnihotri S. A. et al., 2004]. Il chitosano è un polimero che ha visto il suo impiego in diverse applicazioni farmacologiche, per citarne alcune: Park e collaboratori [Park J.H. et al., 2010], in una review sul chitosano descrivono come questo polimero grazie alle sue peculiari caratteristiche chimico-fisiche si presta perfettamente per lo sviluppo di efficaci sistemi di *drug delivery*. In particolare queste NPs sono state proposte per favorire il rilascio di molecole a basso peso molecolare a livello di organi specifici del tratto gastro-intestinale: il colon, il rene, il fegato. NPs a base di chitosano sono state utilizzate da Dev e collaboratori [Dev A. et al., 2010] con lo scopo di consentire il rilascio controllato di farmaci anti-retrovirali come la lamivudina e anche Menon ha studiato [Menon D. et al., 2011] il chitosano come potenziale agente in grado di favorire il rilascio di agenti terapeutici.

Di particolare interesse risultano essere le metodiche di preparazione che determinano un *cross linking* di tipo ionico tra il chitosano caricato positivamente e dei polianioni. Oltre al

processo di complessazione, il chitosano, quando posto a contatto con polianioni polivalenti, va spontaneamente incontro ad un processo di gelificazione attraverso *cross-linkage* inter e intramolecolari. Tra i polianioni più studiati e coinvolti nella preparazione di questo tipo di sistemi nanoparticellari troviamo il trifosfato pentasodico (TPP), in quanto dotato di una limitata tossicità e di un potere gelificante elevato. Studi recenti hanno dimostrato la grande capacità di complessazione del chitosano anche con delle molecole posiccaridiche come le ciclodestrine (CDs) modificate con polianioni, in applicazioni che hanno portato alla formulazione di nuovi sistemi nanoparticellari utilizzati nel *drug delivery* [Ieva E. et al., 2009; Trapani et al., 2008; 2010].

Di seguito verrà riportata una descrizione dettagliata di NPs a base di chitosano e ciclodestrine modificate, oggetto di studio di queste tesi, utilizzate nel *drug delivery* di antiossidanti per *targeting* dermico, in cui il target specifico è rappresentato proprio dall'epidermide.

1.4. Un nuovo sistema di *drug delivery* per *targeting* dermico: NPs di chitosano caricate con Glutazione e Idebenone

La pelle, essendo lo strato più esterno del nostro corpo, è costantemente esposto ad una varietà di insulti ambientali, quali radiazioni UV, inquinanti, xenobiotici, e fumo di sigaretta. In risposta a questi attacchi, si producono specie reattive dell'ossigeno (ROS), come ossigeno singoletto, anione superossido, radicali idrossilici, perossido di idrogeno e altri radicali liberi [Shindo Y et al., 1998; Dreher F. et al., 2001; Basu-Modak S. et al., 2003]. I ROS sono metaboliti dell'ossigeno, altamente reattivi, continuamente generati a bassi livelli nel corso del metabolismo aerobico [Narendhirakannan R.T. et al., 2013]. Un vettore di elettroni essenziale nella respirazione cellulare è il coenzima Q₁₀, esso infatti grazie alla sua funzione riduce la produzione di ROS durante il processo di fosforilazione ossidativa [Beyer R.E. 1990; James A.M. et al., 2004]. D'altra parte nel nostro organismo vi sono sistemi di difesa antiossidante, fisiologicamente attivi che svolgono il ruolo di *scavengers*, ovvero di agenti antiossidanti, tra i quali: glutazione (GSH), ascorbato, superossido dismutasi e glutazione perossidasi [Chen et al., 2012]. Questi sistemi hanno la funzione di bilanciare la produzione endogena di ROS in condizioni di eccessiva esposizione agli stessi, impedendo l'instaurarsi del cosiddetto stress ossidativo [Fuchs J. et al., 1989] e, l'insorgenza di tutta una serie di fenomeni degenerativi responsabili di danno cellulare e tissutale [Fuchs J. et al., 1989; Podda M. et al., 1998; Halliwell B. 1999; Ichihashi M. et al., 2003; Rizzo A. et al., 2008].

Esposizioni croniche ad elevate concentrazioni di ROS provocano cambiamenti delle funzioni cellulari che, possono portare all'insorgenza di cancro alla pelle e ad altre patologie di carattere infiammatorio [Saugstad O.D. 1996; Trouba K.J. et al., 2002; Rajdl D. et al., 2005].

Diversi autori hanno suggerito che la supplementazione topica di antiossidanti potrebbe essere utile per ridurre i danni cutanei indotti dai ROS, coadiuvando le difese antiossidanti della pelle [Dreher F. et al., 2001; Bogdan Allemann I. et al., 2008]. Tuttavia, sono stati segnalati diversi problemi relativi la somministrazione topica di farmaci con formulazioni convenzionali, dovuti essenzialmente ad una scarsa penetrazione nella pelle per la presenza dello strato corneo che funge fisiologicamente da barriera protettiva contro l'assorbimento transdermico di sostanze chimiche [Hadgraft J. 2004; Chen Y. et al., 2013;], nonché per tutta una serie di effetti collaterali legati all'assorbimento sistemico [Williams A.C. et al., 2003; Choi M.J. et al., 2005].

Ecco perché, nell'ultimo decennio per facilitare il *delivery* transdermico di farmaci, sono stati studiati in modo estensivo, molecole definite *enhancers* di penetrazione cutanea [Williams A.C. and Barry B.W., 2004].

Sono stati proposti dunque, diversi vettori colloidali in grado di migliorare l'assorbimento di un farmaco in maniera sito-specifica, come liposomi, niosomi [Bernard E. et al., 1997; Choi M.J. et al., 2005], SLNs [Pardeike J. et al., 2009; Papakostas D. et al., 2011], NLCs [Müller R.H. et al., 2002] e NPs di chitosano (NPs CS) [Hasanovic A. et al., 2009].

Quest'ultime mostrano diversi vantaggi poiché il polisaccaride CS è considerato non tossico, biocompatibile e biodegradabile [Baldrick P. et al., 2010]. E' inoltre abbastanza solubile in acqua, mucoadesivo, ed in grado di aumentare l'assorbimento topico del farmaco a livello dermico, tutta una serie di proprietà che fanno di questo polisaccaride un materiale adatto a formare i vettori colloidali [Chaudhury A. et al., 2011]. Inoltre, NPs a base di CS possono essere ottenute con metodi di preparazione abbastanza semplici [Baldrick P. et al., 2010; Sailaja A.K. et al., 2010].

Il chitosano è un polisaccaride che comprende un copolimero di glucosamina e N-acetilglucosamina e può essere ottenuto dalla parziale deacetilazione di chitina componente dell'esoscheletro di crostacei e insetti [Illum L. et al., 1998; Jones D.S. et al., 2006] (Figura 4).

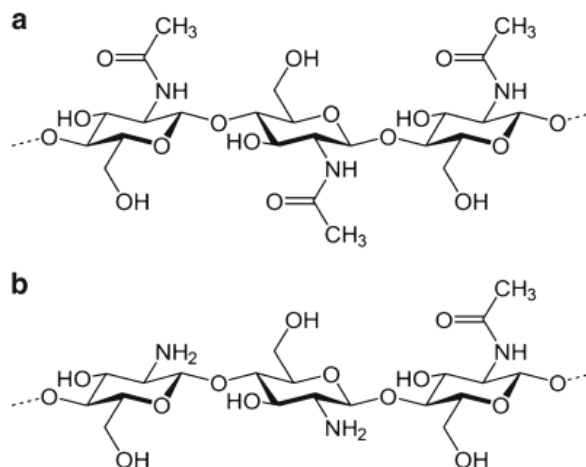


Fig. 4. Struttura della chitina (a) e del chitosano (b) [Chaudhury A. et al., 2011].

In letteratura, il termine chitosano è usato per descrivere polimeri di questa molecola con diverso peso molecolare (da 50 a 2000 kDa), diversa viscosità e grado di deacetilazione (40 – 98%) [Illum L., 1998]. Con il termine chitosano si dovrebbe indicare solamente il polimero con un grado di deacetilazione superiore al 70% [Pusateri A.E. et al. 2003].

Negli ultimi anni, il CS è stato usato in modo estensivo per *delivery* di piccole molecole [Mourya V.K. et al. 2009; Kumari A. et al. 2010], peptidi [Amidi M. et al., 2010], vaccini [van der Lubben I.M. et al., 2001; Sayin B. et al., 2008], e geni [Borchard G. et al., 2001; Koping-Hoggard M. et al., 2001].

Nonostante le notevoli potenzialità, il CS ha alcuni limiti, ad esempio soffre di bassa solubilità a pH fisiologico, e questo ne limita il suo utilizzo come *enhancer* per l'assorbimento di alcune molecole, inoltre in soluzione tende ad assorbire rapidamente acqua rigonfiandosi, ciò potrebbe provocare ad esempio un rilascio veloce di molecole, in preparazioni che invece richiedono un rilascio controllato. Per superare queste ed altre problematiche, sono stati sintetizzati e testati numerosi derivati del CS modificati chimicamente, ciò ha consentito di migliorarne la sua solubilità allargandone il campo di applicazione [Jayakumar R. et al. 2005; Prabakaran M. et al. 2007; 2008].

Tra le potenziali modifiche per la realizzazione di NPs di chitosano con migliori caratteristiche tecnologiche, recentemente sono state testate le ciclodestrine modificate con un gruppo solfo-butiletere (sulfobutiletere- β -ciclodestrina, SBE- β -CD) come agente di *cross-linking* per la preparazione delle NPs CS [Trapani A. et al. 2010].

“Le ciclodestrine (CDs) sono una famiglia di oligosaccaridi macrociclici, e sono ottenute dalla conversione enzimatica dell’amido per reazione di transglicosilazione intramolecolare ad opera della ciclodestrina-glicosiltransferasi (CGTasi). Dal processo enzimatico si ottengono molecole di forma lineare: le destrine. In soluzione acquosa le destrine lineari si dispongono a formare una spirale elicoidale costituita da molecole glucosidiche legate fra loro in posizione 1,4. La CGTasi può staccare una porzione molecolare delle destrine e legare fra loro le due estremità del frammento dando origine alla ciclodestrina [Loftsson et al., 2005]. A causa dell’impossibilità di ruotare nei punti di connessione, le ciclodestrine non sono molecole perfettamente cilindriche, ma prendono forma di toroide o di tronco di cono [Loftsson et al., 2005; Zhu et al., 2007]” (Spada G., tesi di dottorato, 2010), caratterizzate dalla presenza di una cavità interna di natura idrofobica, e di una superficie idrofilica costituita da gruppi ossidrilici che sono orientati verso la porzione esterna del toroide, ciò rende le ciclodestrine solubili in acqua [López-Nicolás J.M. et al., 2012] (Figura 5).

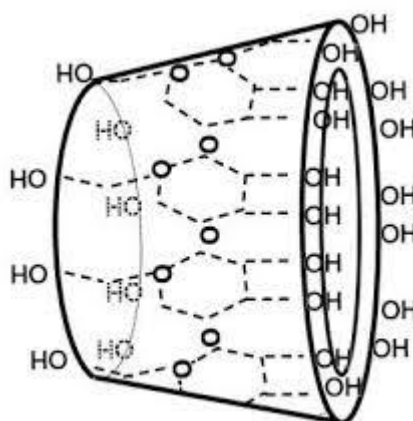


Fig. 5. Struttura chimica della ciclodestrina [Loftsson T. et al 2005].

“A seconda del numero di unità glucosidiche si hanno diversi tipi di ciclodestrine, più precisamente ne esistono quattro tipi, distinte con una lettera greca:

- α -CD, è la più piccola ed è costituita da 6 unità glucosidiche;
- β -CD: è una delle più usate in campo farmaceutico e presenta 7 unità glucosidiche;
- γ -CD: ha 8 unità glucosidiche;
- δ -CD: è la più grande ed è costituita da 9 unità glucosidiche.

All’interno delle ciclodestrine possono essere complessati diversi farmaci in funzione delle dimensioni della cavità delle ciclodestrine stesse, generalmente le α -CD hanno un diametro

troppo piccolo per includere la maggior parte dei farmaci, le γ -CD sono, al contrario, troppo grandi e la loro produzione è troppo dispendiosa. Il processo di complessazione dipende anche dalla conformazione della molecola che si vuole internalizzare nella ciclodestrina; Loftsson e collaboratori [Loftsson T. et al., 2005] hanno mostrato come la formazione di complessi d'inclusione fra le CD e diversi farmaci è dovuta alla capacità del polisaccaride di inglobare all'interno della sua cavità un'intera molecola o parte di essa. I legami non covalenti fra CD e farmaco si possono formare e rompere continuamente in ambiente acquoso, in quanto le forze che favoriscono la formazione del complesso sono legami deboli, di tipo idrofobico, forze di Van Der Waals e interazioni ioniche [Loftsson T. et al., 2005]" (Spada G., tesi di dottorato, 2010).

Grazie a queste caratteristiche le CDs sono in grado di formare complessi di inclusione con varie molecole idrofobiche [Li Z. et al., 2007], aumentandone la solubilità [Martin Del Valle E.M. et al., 2004; Salústio P.J. et al., 2011], la biodisponibilità e la stabilità in soluzioni acquose [Loftsson T. et al., 2005] (Figura 6).

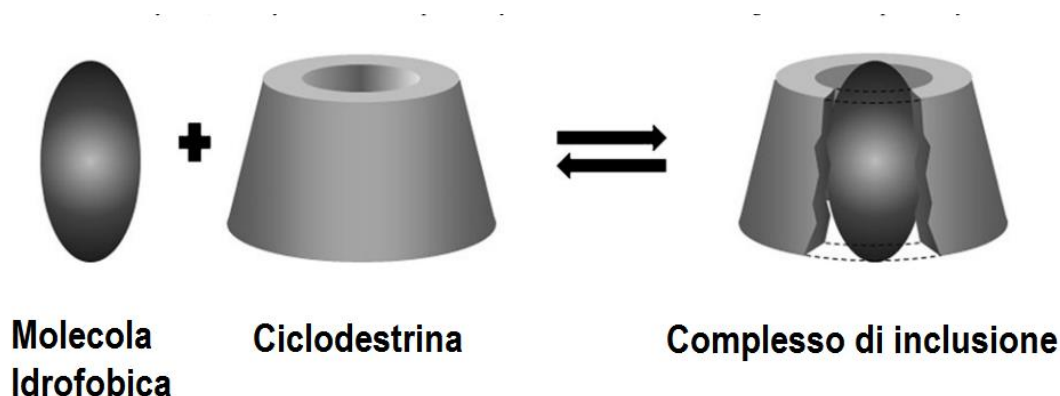


Fig. 6. Interazione della molecola idrofobica con la CD per formare un complesso di inclusione [Salústio P.J. et al., 2011].

“Le β -ciclodestrine e suoi derivati sono state utilizzate per complessare diversi tipi di farmaci [Challa R. et al 2005, Hedges A.R. et al., 1998] e attualmente le β -ciclodestrine sono presenti nella composizione di formulazioni destinate alla somministrazione orale, oculare, nasale e dermica di vari farmaci.

Le ciclodestrine vengono inoltre impiegate per aumentare il grado di assorbimento sia di farmaci che di peptidi e proteine in quanto considerate *penetration enhancer* capaci di

interagire con la membrana cellulare [Uekama K. et al 2006; Chourasia M.K. and Jain S.K. 2003; Duchene D. et al., 1999]” (Spada G., tesi di dottorato, 2010).

Nonostante il larghissimo impiego di questi oligosaccaridi, alcune ciclodestrine non modificate sinteticamente hanno evidenziato effetti tossici e la loro modificazione chimica con il gruppo sulfobutileter ne ha migliorato il profilo della sicurezza [Mc Daniel et al., 2005] (Figura 7), ma ne ha anche migliorato l'abilità di complessazione con composti policationici come ad esempio il chitosano [Jarvinen T. et al., 1995; Rajewski R. et al., 1995; Luke D.R. et al., 2010].

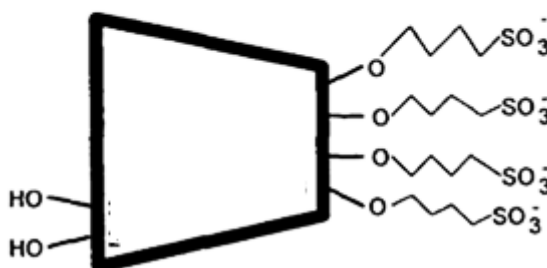


Fig. 7. Struttura della ciclo destrina modificata con il gruppo sulfobutileter (SBE- β -CD) [Desiderio C. et al., 1995; Lockwood S.F. et al., 2003].

Queste caratteristiche hanno consentito di poter utilizzare il chitosano e le ciclodestrine come potenziali *carriers* in grado di trasportare sia molecole idrofiliche che idrofobiche, se complesate a formare delle strutture nanoparticellari [Maestrelli F. et al. 2006; Krauland A.H. et al. 2007; Salústio P.J. et al. 2011].

1.4.1. Glutatione (GSH)

In questa tesi si propone l'utilizzo di NPs a base di chitosano al fine di consentirla veicolazione di due antiossidanti, fra questi il glutatione (GSH), utilizzando un sistema di legame già efficacemente studiato in diversi lavori [Ieva E. et al., 2009; Koo S.H. et al 2011; Yousefpour P et al., 2011]. Nei lavori citati, le NPs CS vengono complesate con il GSH (γ -glutamyl-cisteinyl-glicina) mediante metodo di gelificazione ionica, il CS instaura dei legami

covalenti a livello dei suoi gruppi amminici con i gruppi carbossi-terminali del glutammato. Ciò favorisce la formazione di un legame stabile che consente la veicolazione del GSH attraverso questi *carrier*.

Il GSH, è il più abbondante tiolo a basso peso molecolare presente in tutti i tessuti di mammifero, e il rapporto glutatiore ridotto/glutazione ossidato (GSH/GSSG) rappresenta la principale coppia redox nell'organismo. La struttura del GSH ha una particolarità unica, in quanto il legame peptidico che lega il glutammato alla cisteina è atipico, avviene attraverso il gruppo γ -carbossilico del glutammato, invece del convenzionale gruppo α -carbossilico [Wu G. et al. 2004; Lu S.C. et al. 2013] (Figura 8).

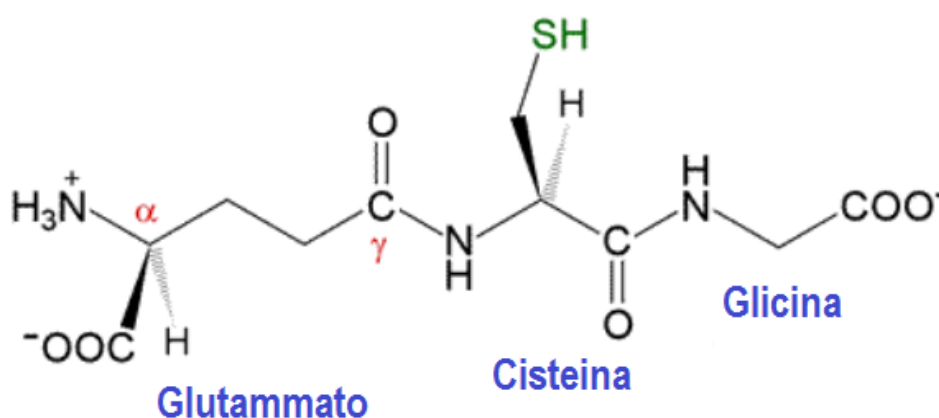


Fig. 8. Struttura del GSH ridotto. Il glutammato è legato alla cisteina attraverso un legame peptidico che utilizza il gruppo γ -carbossilico, la cisteina a sua volta forma un legame peptidico con la glicina [Zigliari et al., 2013].

Il GSH ha diverse funzioni, tra cui la detossificazione dagli xenobiotici e/o loro metaboliti, regolazione della progressione del ciclo cellulare, apoptosi, stoccaggio di cisteina, mantenimento del potenziale redox, modulazione della funzione immunitaria, fibrogenesi, ma la più importante risulta la difesa antiossidante [Meister A. et al., 1983; Suthanthiran M. et al., 1990; Ballatori N. et al., 2009; Forman H.J. et al., 2009; Pallardò F.V. et al., 2009; Liu R.M. et al., 2010; Lu S.C. et al., 2009; 2013].

La funzione antiossidante del GSH è realizzata attraverso le reazioni catalizzate dalla Glutazione Perossidasi (GPx) e dalla Glutazione S-transferasi (GST), le quali riducono il perossido d'idrogeno (H_2O_2) e il perossido organico (ROOH) con l'ossidazione del GSH a glutazione ossidato (GSSG). Il GSSG, a sua volta viene nuovamente ridotto a GSH dall'enzima Glutazione-disolfuro Reduttasi (GSR), a scapito di due molecole di coenzima

nicotinammide adenina dinucleotide fosfato ridotte (NADPH), che cedendo un elettrone ciascuno al GSSG, si trasforma nella forma ossidata (NADP⁺), rigenerando quindi due molecole di GSH, costituendo un ciclo redox [Lu S.C. et al., 2009].

I perossidi organici possono essere ridotti dall'enzima GPx e GST, quest'ultimo catalizza la coniugazione di varie molecole tossiche con il glutatione rendendole meno reattive e più facilmente eliminabili dall'organismo. Anche la catalasi (CAT) può ridurre il H₂O₂, ma è presente solo nei perossisomi. Queste evidenze suggeriscono il ruolo particolarmente importante del GSH nei mitocondri per la difesa contro i ROS [Fernández-Checa J. et al., 1997; Garcia-Ruiz C. et al., 2006] (Figura 9).

Siccome il rapporto GSH/GSSG determina in gran parte il potenziale redox della cellula (proporzionale al logaritmo di [GSH]²/[GSSG]) [Forman H.J. et al., 2009], per evitare un forte cambiamento dell'equilibrio redox, quando lo stress ossidativo supera la capacità della cellula di ridurre il GSSG a GSH, il GSSG può essere esportato attivamente fuori dalla cellula per reagire con un gruppo sulfidrico proteico, il quale induce la formazione di un disolfuro misto. Quindi, stress ossidativi severi portano all'esaurimento del GSH cellulare [Lu S.C., 2009].

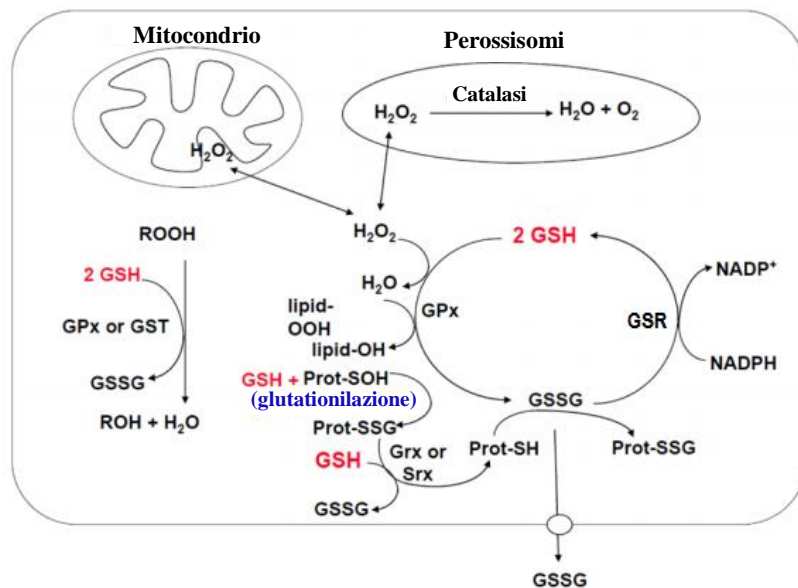


Fig. 9. Ciclo metabolico del GSH. Il metabolismo aerobico genera H₂O₂, il quale può essere metabolizzato dall'enzima GPx nel citosol e nei mitocondri, e dalla catalasi nei perossisomi a scapito del GSH. Il GSSG prodotto può essere ridotto a GSH dall'enzima GSR con il consumo di due molecole di NADPH, in questo modo viene formato un ciclo redox. I perossidi organici di natura lipidica R-OOH possono essere ridotti sia dall'enzima GPx che dalla GST. Il GSH gioca anche un ruolo chiave nel signaling del redox proteico. Durante lo stress ossidativo, residui di cisteina sulle proteine possono essere ossidati ad acido sulfenico (Prot-SOH), che può reagire con GSH per formare proteine glutationilate (Prot-SOG) (la glutatiolizzazione), che a loro volta possono essere ridotte nuovamente a Prot-SH (o proteina sulfidrica) attraverso l'azione degli enzimi glutaredossina (Grx) e sulfiredossina (Srx). Questo è un meccanismo attivo per proteggere i tioli proteici sensibili dall'ossidazione irreversibile e può servire per prevenire la perdita di GSH sotto condizioni ossidative.

La capacità della cellula di ridurre GSSG a GSH può essere superata durante insulti ossidativi severi portando ad un accumulo di GSSG. Per prevenire un cambio dell'equilibrio redox, GSSG può essere o trasportato attivamente all'esterno della cellula o fatto reagire con una Prot-SH per formare Prot-SSG. [Lu et al., 2013].

In questa tesi è stata studiata la possibilità di realizzare NPs in cui il CS è legato covalentemente al GSH. Nella struttura nanoparticellare in questione, il GSH è stato utilizzato per esplicare due potenziali funzioni, sia una funzione antiossidante che strutturale. Tale legame infatti consente il rafforzamento dell'effetto mucoadesivo del chitosano per via della formazione di un cosiddetto tiomero incrementando le cariche positive alla struttura nano particellare [Trapani A. et al., 2014]. Grazie alle presenza di queste cariche si rende possibile a sua volta il *cross-linking* con il complesso polianionico SBE- β -CD. Quest'ultimo complesso è in grado di favorire la veicolazione e il rilascio di una molecola idrofobica di natura antiossidante ovvero l'IDE, apportando diversi benefici in termini di protezione dallo stress ossidativo [Darr D. et al., 1996; Dreher F. et al., 1998].

1.4.2. Idebenone (IDE)

Nel modello di *drug-delivery* proposto in questa tesi, l'IDE viene caricato per mezzo di un processo di inclusione, all'interno della cavità idrofobica presente nella struttura delle β -ciclodestrine come descritto precedentemente, secondo una modalità di inclusione descritta in lavori recenti [Trapani A. et al., 2008; 2010].

L'IDE è un chinone sintetico strutturalmente simile al coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀). Il CoQ₁₀ è un *carrier* lipofilo che ancorato alla membrana mitocondriale interna, insieme a tutta una serie di complessi specifici, partecipa attivamente alla catena di trasporto degli elettroni (CTE) [Nicholis D.G. and Ferguson S.J., 2013]. Il composto ubiquinone, comunemente noto come CoQ₁₀, nella sua forma ridotta, è un potente antiossidante in grado di accettare elettroni da radicali liberi e inibire la perossidazione lipidica [Geromel V. et al., 2002; Beyer R.E. et al., 1996]. Nella CTE il CoQ₁₀ rappresenta un punto di convergenza per gli elettroni provenienti dai Complessi I o II [Nicholls D.G. and Ferguson S.J., 2013] verso il complesso III. Considerato che gioca un ruolo così importante nel trasporto degli elettroni, il CoQ₁₀ è stato spesso utilizzato come integratore di "energia" nel trattamento di un'ampia varietà di condizioni patologiche. Tuttavia, a parte le malattie rare causate da carenza di CoQ₁₀, ci sono poche evidenze che dimostrano che la terapia con CoQ₁₀ sia in grado di sopperire a disfunzioni a carico della CTE e quindi ripristinare il normale apporto di energia [Geromel V. et al. 2002].

Con lo scopo dunque, di ideare dei composti che potessero in qualche modo agire da *electron-transfer* in maniera analoga al CoQ₁₀ ma apportando dei miglioramenti di farmacocinetica utili per il trattamento di determinate condizioni patologiche, sono stati sintetizzati una serie di analoghi del CoQ₁₀ a corta catena [Geromel V. et al 2002;. Erb M. et al 2012;. Suno M. and Nagaoka A. 1984a].

Fra questi analoghi sintetici troviamo l'idebenone (2- (10-hydroxydecyl)-5,6-dimetossi-3-metil-cyclohexa-2,5-diene-1,4-dione) un simil-chinone sviluppato in Giappone nel 1980 per il trattamento di malattie neurodegenerative [Suno M. and Nagaoka A. 1984a].

Strutturalmente simile al CoQ₁₀, entrambi condividono infatti lo stesso anello benzochinonico, ma l'IDE presenta una corta catena laterale idrossidecil, rispetto alla catena laterale isoprenica del CoQ₁₀ [Carbone et al., 2012; Leonardi et al., 2014] (Figura10).

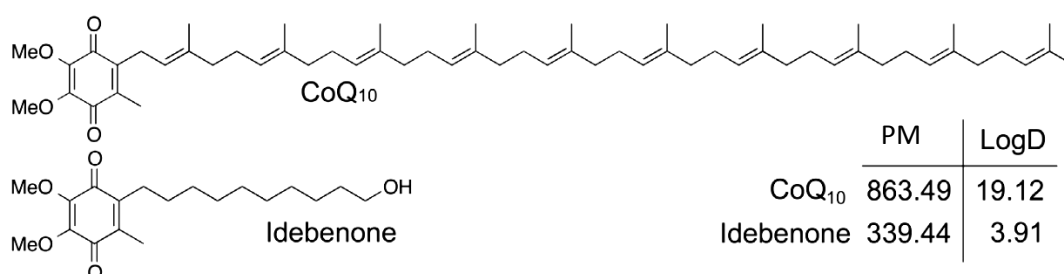


Fig. 10. Struttura chimica dei due chinoni CoQ₁₀ e IDE. Le dieci unità isopreniche contenute nella catena laterale del CoQ₁₀ sono responsabili della minore solubilità e del maggiore peso molecolare. PM: peso molecolare; LogD: coefficiente di ripartizione a pH fisiologico [Gueven N. et al., 2015].

Analogamente al CoQ₁₀, l'IDE è in grado di proteggere i mitocondri dalla perossidazione lipidica e dal danno ROS-indotto [Suno et al., 1989; Rauchova et al., 2006; Carbone et al., 2013; Leonardi et al., 2014; Erb M. et al., 2012;. Suno M. and Nagaoka A. 1984a; 1984b; 1989; Yamada K. et al., 1999; Cardoso S.M. et al., 1998]. Sia il CoQ₁₀ che l'IDE sono coinvolti nella CTE: neutralizzano i radicali liberi e incrementano la produzione di adenosina trifosfato (ATP) [Sugiyama et al., 1985; Carbone et al., 2013;].

Lo studio proposto da Erb [Erb M. et al., 2012], identifica l'IDE come il più potente antiossidante tra 70 chinoni testati. In altri esperimenti *in vitro*, è stato dimostrato su due linee cellulari neuronali, immortalizzate e corticali primarie [Miyamoto M. et al., 1989;. Pereira C.F. and Oliveira C.R., 2000; Murphy T.H. et al., 1990;. Ratan R.R. et al., 1994.], che a seguito di deplezione endogena di GSH, e successivo trattamento con IDE, si otteneva una riduzione del danno ossidativo indotto. Esperimenti di radiomarcatura condotti con ¹⁴C hanno identificato che l'IDE è in grado di attraversare la BEE dopo somministrazione orale [Nagai Y. et al 1989;. Torii H. et al. 1985]. E' stato inoltre segnalato un miglioramento neurologico a

seguito di trattamento con IDE su modelli di roditori con casi di ictus [Nagaoka A. et al. 1989] o con morbo di Alzheimer [Yamada K. et al. 1999]. L'IDE è ben tollerato nell'uomo anche a dosi giornaliere di 1- 2 g e mostra una farmacocinetica lineare a seguito di somministrazione orale singola o ripetuta [Kutz K. et al. 2009]. Milioni di esseri umani hanno assunto l'IDE in diversi *trial* clinici, [Meier T. and Buyse G. 2009], e nel 2009 infatti, l'IDE è stato anche approvato per il trattamento dell'atassia di Friedreich in Canada anche se successivamente ritirato dal mercato canadese dall'azienda farmaceutica Santhera, in quanto vi erano ancora poche evidenze della sua efficacia [Gueven N. et al., 2015].

La sua ottima biodisponibilità e il suo profilo di sicurezza fanno dell'IDE un potenziale candidato per il trattamento terapeutico di patologie caratterizzate da condizioni ossidanti.

Farmacocinetica: IDE vs CoQ₁₀

Le differenze strutturali che caratterizzano i due chinoni conferiscono a tali molecole delle proprietà chimico-fisiche notevolmente differenti (Tabella 1).

L'IDE mostra una modesta solubilità in acqua rispetto al CoQ₁₀ grazie alla presenza di una corta catena laterale (10 atomi di carbonio) con un gruppo idrossilico-terminale, come indicato dal coefficiente di ripartizione (LogD).

Tab.1. Caratteristiche chimico-fisiche del CoQ₁₀ e dell'IDE [Gueven N. et al., 2015].

Parametri	CoQ ₁₀	Idebenone
Formula chimica	C ₅₉ H ₉₀ O ₄	C ₁₉ H ₃₀ O ₅
Peso molecolare(g/mol)	863.49	338.44
Solubilità; log D (pH 7.4)	19.12	3.91
Capacità di attraversare le membrane	No	Si
In vivo t_{max}	6-8 h	1-3 h
Inibitore del Complesso I	No	Si
Substrato Complesso II	Si	Si
Substrato Complesso III	Si	Si
Riduzione mediata dall'enzima NADH-chinone ossidoredittasi 1 (NQO1)	Molto bassa	Si
Ripristino di ATP in caso di malfunzionamento del Complesso I	0%	>80%
Effetti sul potenziale di membrana mitocondriale	106%	116%
Meccanismo d'azione	Antiossidante localizzato all'interno della membrana, <i>electron-transfer</i> della CTE	Antiossidante presente in diversi compartimenti cellulari, funzione redox e ripristino di energia attraverso <i>pathways</i> alternativi

A differenza dell'IDE, il CoQ₁₀ è una molecola fisiologicamente sintetizzata da tutte le cellule dell'organismo. La biosintesi del CoQ₁₀ è abbastanza complessa, e condivide alcuni degli steps primari del pathway biosintetico del colesterolo [Wang Y. and Hekimi S., 2103].

L'elevata lipofilicità di questa molecola, rende particolarmente complicato l'assorbimento lungo il tratto intestinale quando questa viene assunta con la dieta, evidenziato da un assorbimento plasmatico con T_{max} di 6-8 h e un tempo medio di eliminazione di circa 33 h [Tomono Y. et al., 1986].

A differenza invece di quanto osservato in alcuni pazienti, in cui l'IDE viene rapidamente assorbito con una T_{max} di 1-3 h e rapidamente eliminato in 10-13 h [Di Prospero N.A. et al., 2007].

Meccanismo d'azione mitocondriale dell'IDE

Per riuscire a comprendere come l'IDE possa svolgere la sua normale azione di antiossidante e, quindi comprendere le sue potenziali applicazioni terapeutiche, è necessario chiarirne il meccanismo d'azione all'interno della CTE. La somiglianza strutturale dell'IDE a quella del CoQ₁₀ ha indotto, erroneamente, a pensare che la sua funzione possa sostituire quella endogena svolta dal CoQ₁₀ nella CTE. In realtà ci sono evidenze che dimostrano che in presenza di livelli mitocondriali fisiologici di CoQ₁₀, l'IDE è in grado di modulare direttamente la respirazione mitocondriale e la produzione di ATP, ciò suggerisce che l'IDE segue evidentemente una via metabolica distinta e differenziale da quella del CoQ₁₀ [Gueven N. et al., 2015]. Infatti, come è stato descritto sopra, il CoQ₁₀ consente il trasporto di elettroni dal complesso I (NADH deidrogenasi) e II (glicerolo 3-fosfato deidrogenasi) al complesso III (NADH-citocromo C riduttasi), diversamente l'IDE è in grado di agire da *electron-transfer* dal complesso II al complesso III [Imada I. et al 1989; Rauchova H. et al. 2008; Brière J.J. et al. 2004]. Ciò è spiegato probabilmente dal fatto che a livello del Complesso I, è presente un sito di legame chinonico, localizzato dentro una tasca apposita, in grado di proteggere il legame che avviene con il CoQ₁₀. D'altra parte considerate le più ridotte dimensioni dell'IDE, tale tasca potrebbe essere adatta ad accogliere anche questo chinone, che però essendo più piccolo probabilmente impiegherebbe più tempo a uscirne fuori. Quindi la differenza strutturale delle due molecole è sicuramente uno dei motivi che inibisce il legame dell'IDE con il complesso I della CTE [King M.S. et al., 2009].

Nonostante l'incapacità dell'IDE di legare il Complesso I, diversi studi hanno dimostrato che l'IDE è in grado di produrre energia attivando dei *pathways* metabolici Complesso I-

indipendenti in presenza di CoQ₁₀ [Erb M et al., 2012; Haefeli R.H. et al., 2011; Rauchová H. et al., 2006; Giorgio V. et al., 2012]. Questi meccanismi aumentano l'apporto di energia da coenzimi ridotti citoplasmatici all'interno dei mitocondri, e sono generalmente attivi in tessuti con alta richiesta energetica [Jaber S. and Polster B.M., 2015].

Affinchè ciò si realizzi però, le cellule devono disporre di un efficace sistema enzimatico che catalizza la reazione di riduzione dell'IDE. E' stato dimostrato infatti, che solo l'IDE ridotto (Idebenol) è in grado di preservare la sintesi di ATP, in casi ad esempio di inibizione o disfunzione del complesso I [Giorgio V. et al., 2012]. L'IDE può essere ridotto dalla succinasi deidrogenasi, la quale potenzia enormemente la sua azione contro la perossidazione lipidica [Suno M. and Nagaoka A. 1989].

Uno dei *pathways* idebenone-dipendenti che trasferisce equivalenti energetici dal citosol direttamente ai mitocondri, si realizza grazie all'azione di un enzima citoplasmatico NADH-chinone ossidoreduttasi 1 (NQO1) [Erb M et al., 2012; Haefeli R.H. et al., 2006; Giorgio V. et al., 2012] noto anche come DT-diaforasi; ovvero il principale enzima in grado di catalizzare la reazione di riduzione dell'IDE extramitocondriale a spese del NAD(P)H citoplasmatico [Haefeli R.H. et al. 2011] (Figura 11).

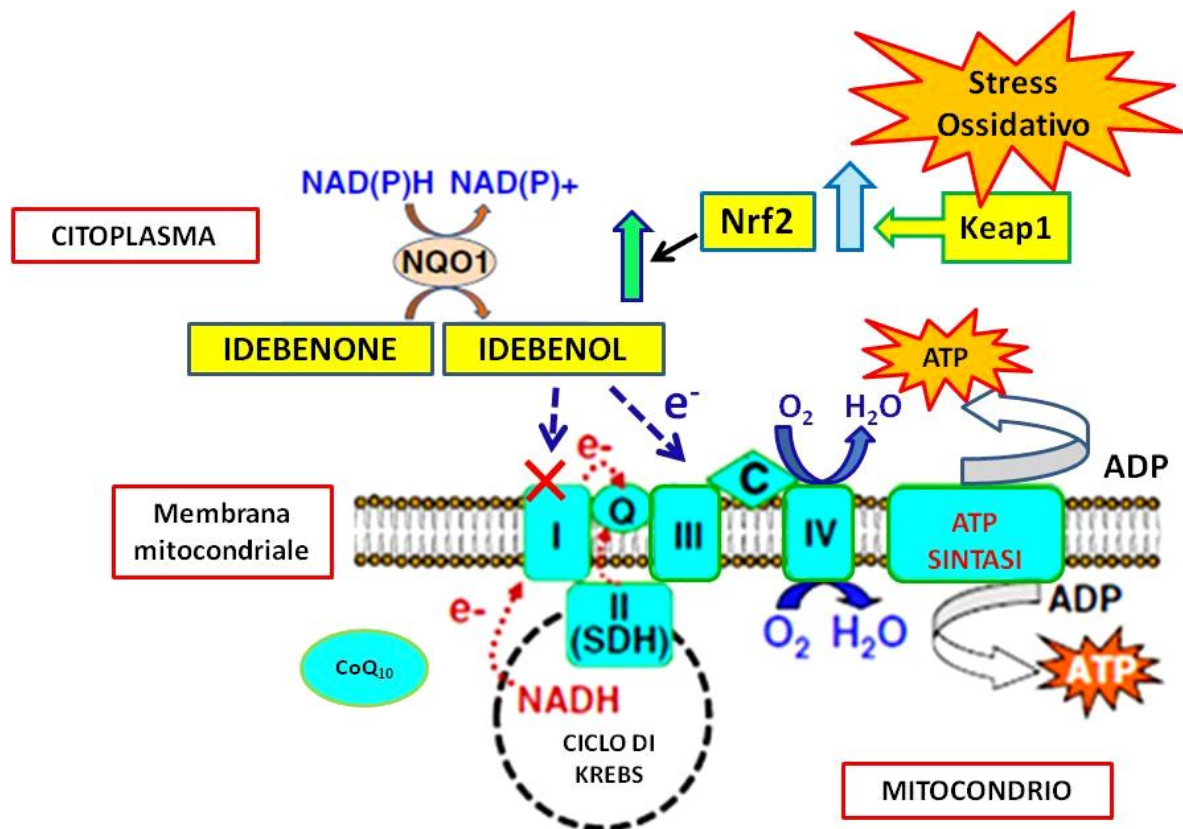


Fig. 11. Modello di electron-transfer mediato dall'IDE grazie all'azione del sistema enzimatico riducente NQO1 NAD(P)H dipendente. La riduzione dell'idebenone a idebenol è catalizzata dall'enzima NQO1 e si realizza soprattutto nel citoplasma. L'idebenol è abbastanza idrofilo per attraversare il citoplasma, ma anche abbastanza lipofilo per consentire il trasferimento di elettroni al complesso III nella membrana più interna del mitocondrio. In questo modo l'idebenol può esercitare la sua azione citoprotettiva bypassando problemi legati al malfunzionamento del complesso I, o a monte, problemi a carico di enzimi coinvolti nel ciclo di Krebs. Attraverso questo meccanismo verrebbe ripristinato il consumo di ossigeno (O_2) a livello del complesso IV e favorita la produzione di ATP dall'ATP sintasi. E' stato dimostrato inoltre che il fattore di trascrizione nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) upregolano l'espressione di NQO1, gli stimoli che a sua volta attivano questo fattore di trascrizione sono lo stress ossidativo e farmaci come il sulforafano e il ter-butildioquichinone [Jaber S. and Polster B.M., 2015].

Una serie di studi, hanno messo in evidenza come in casi di malfunzionamento della catena respiratoria indotto da inibitori del Complesso I (Rotenone), l'IDE è in grado di ripristinare i normali livelli di ATP in una ampia varietà di cellule inducendo un aumento del NQO1 mRNA [Haefeli R.H. et al. 2011; Heitz et al. 2012]. Con questo meccanismo l'IDE è in grado trasferire elettroni, attingendo energia dal comparto citoplasmatico, e favorendone il passaggio al Complesso III della CTE in cellule che esprimono NQO1, bypassando l'azione

di trasporto degli elettroni dal Complesso I al Complesso II ripristinando la sintesi di ATP [Haefeli et al. 2011; Heitz F.D. et al. 2012; Erb M. et al 2012].

L'esistenza di questo pathway IDE-dipendente rappresenta un'alternativa importante per la produzione di energia in caso di malfunzionamento del mitocondrio, in quanto la riduzione del CoQ₁₀ dipende esclusivamente dall'integrità del mitocondrio, del Complesso I e II, mentre l'IDE può utilizzare dei cofattori riducenti di natura citoplasmatica provenienti ad esempio dalla glicolisi, grazie all'attivazione dell'enzima NQO1.

NQO1 è una flavoproteina antiossidante regolata dal pathway *Nrf2/antioxidant response element* (ARE) [Ahlgren-Beckendorf J.A. et al., 1999; Dinkova-Kostova A.T. and Talalay P. 2010]. NQO1 si trova principalmente nel citoplasma, ma piccole quantità sono localizzate anche nei mitocondri, nel reticolo endoplasmatico e nel nucleo [Dong H. et al. 2013]. Questo enzima è espresso in molti tessuti dell'organismo compreso il cervello [Schultzberg M. et al. 1988; Siegel D. and Ross D. 2000; Stringer J.L. et al. 2004]. NQO1 è un enzima inducibile [Dinkova-Kostova A.T., Talalay P., 2010], e lo stress ossidativo ne è l'induttore primario. L'ossidazione di residui di cisteina di proteine KEAP1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), favorisce il rilascio del fattore di trascrizione Nrf2 da un'interazione inibitoria citoplasmatica, consentendo la migrazione di Nrf2 al nucleo, dove induce la trascrizione di NQO1 e degli altri geni

Efficacia terapeutica dell'IDE

È interessante notare come siano stati ritrovati livelli elevati di NQO1 nella malattia di Alzheimer [Raina A.K. et al., 1999; SantaCruz K.S. et al., 2004; Wang Y. et al., 2000] e nel morbo di Parkinson [van Muiswinkel F.L. et al., 2004], due malattie neurodegenerative caratterizzate da un'importante componente ossidativa [Lin M.T. and Beal M.F., 2006].

Considerato che l'alterazione del Complesso I è una delle cause maggiori di malfunzionamento mitocondriale, in diverse patologie caratterizzate sia da alterazioni classiche mitocondriali che da disordini neuromuscolari come nella distrofia muscolare di Duchenne (DMD), o in patologie neurologiche come il glaucoma [Lee S. et al., 2012], l'IDE potrebbe essere una strategia razionale di trattamento terapeutico.

A tal proposito sono stati non pochi gli studi e molti sono ancora in corso che hanno proposto il trattamento con IDE per disfunzioni mitocondriali della catena respiratoria associate a patologie neuromuscolari [Becker et al., 2010; Haefeli et al., 2011; Giorgio et al., 2012].

Pazienti con atassia di Friedreich trattati con IDE hanno mostrato una riduzione dei markers di stress ossidativo [Meier T. and Buyse G., 2009; Parkinson M.H. et al., 2013], e altri anche un miglioramento dei sintomi neurologici [Meier T. et al., 2012]. In uno studio in doppio cieco realizzato su un numero moderato di pazienti (102) affetti da morbo d Alzheimer, è stato dimostrato un miglioramento cognitivo comportamentale statisticamente significativo [Senin U. et al., 1992] a seguito del trattamento con IDE.

L'IDE è stato oggetto di studio di numerosi *trial* clinici di malattie, come l'encefalopatia mitocondriale con acidosi lattica e episodi di ictus (MELAS) [Ikejiri Y. et al., 1996], sindrome di Leigh, neuropatia ottica di Leber (LHON) [Cheng S.W. et al., 2014], casi di distrofia muscolare di Duchenne e sclerosi multipla [Firuzi et al., 2011], morbo di Parkinson, malattia di Huntington, e sclerosi amiotrofica laterale [Orsucci et al., 2011] (www.clinicaltrials.gov).

A proposito della LHON, un'analisi retrospettiva condotta su 103 pazienti, ha evidenziato l'efficacia di IDE nel migliorare l'acuità visiva [Klopstock T. et al., 2011]. Recentemente in questi pazienti affetti da LHON è stato anche dimostrato che il trattamento con IDE previene la perdita della vista dei colori [Rudolph G. et al., 2013].

In uno studio sorprendente condotto Buyse e collaboratori (DELOS *study group*), nell'ambito di un *trial* clinico [Buyse G.M. et al., 2015] su pazienti affetti da distrofia muscolare di Duchenne non sottoposti a terapia steroidea, è stato dimostrato un miglioramento dell'efficienza respiratoria a seguito di trattamento terapeutico con IDE. E' importante tenere in considerazione che in questo tipo di patologia il supporto ventilatorio e l'uso cronico di glucocorticoidi contribuiscono ad aumentare la longevità dei pazienti, ma le complicanze respiratorie continuano ad essere la principale causa di morbilità e mortalità precoce in pazienti sottoposti a trattamento con farmaci steroidei.

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi è quello di dimostrare il potenziale utilizzo di NPs di chitosano e ciclodestrine modificate, come sistema di trasporto per il rilascio topico a livello cutaneo di agenti antiossidanti come l'IDE, molecola a bassa solubilità in acqua, apportando un'azione protettiva antiossidante sulla pelle, essendo questo un tessuto costantemente esposto a insulti da parte di agenti ossidanti.

Il progetto sperimentale prevede tre fasi operative, così suddivise:

Prima fase: preparazione del carrier;

Seconda fase: funzionalità in sistemi *cell free*;

Terza fase: attività *in vitro* in cheratinociti umani

Ogni fase sperimentale è a sua volta determinata da tutta una serie di steps secondo l'ordine riportato di seguito.

2.1. Prima fase: preparazione del *carrier*

Preparazione delle nanoparticelle (NPs)

La preparazione delle NPs sarà condotta in collaborazione con l'Università degli studi di Bari, la tecnica di elezione che verrà utilizzata è nota come metodo di gelificazione ionica, e prevede la formulazione di due NPs:

- Nanoparticelle leganti covalentemente GSH, caricate con IDE (NPs CS-GSH/SBE- β -CD-IDE);
- Nanoparticelle leganti covalentemente GSH, non contenenti IDE (NPs CS-GSH/SBE- β -CD);

Caratterizzazione chimico-fisiche delle NPs

La caratterizzazione delle NPs sarà condotta in collaborazione con l'Università degli studi di Bari, comprendendo tutte le tecniche utili per avere informazioni circa le dimensioni, le proprietà chimiche e la stabilità dimensionale del materiale in forma nanoparticellare.

Caratterizzazione morfologica delle NPs

La caratterizzazione morfologica delle NPs prevede l'ausilio di sofisticate tecniche di *imaging* al fine di ottenere informazioni sull'aspetto e l'idoneità morfologica dei sistemi nanoparticellari.

2.2. Seconda fase: funzionalità in sistemi *cell free*

Gli studi funzionali in sistemi *cell free* avranno lo scopo di definire le potenzialità applicative dei sistemi di *delivery*, ideati per favorire il rilascio di antiossidanti di natura idrofobica come l'IDE anche in ambienti acquosi, dimostrando nello stesso tempo la capacità di esplicare una potenziale attività antiossidante nei confronti dei radicali liberi. A tal proposito le prove comprenderanno la:

- determinazione analitica di IDE e GSH in studi di rilascio da parte delle NPs;
- determinazione dell'attività antiossidante da parte di IDE caricato nelle NPs;

2.3. Terza fase: attività *in vitro* in cheratinociti umani

Gli studi funzionali in sistemi cellulari *in vitro* verranno condotti su due linee cellulari di cheratinociti umani, e hanno lo scopo di valutare l'interazione dell'interfaccia bio-nano a concentrazioni crescenti di NPs e per tempi sufficientemente lunghi per meglio individuare l'effetto citotossico. Per questo genere di studi è stato scelto il saggio MTT, attraverso questo saggio verrà valutata la:

- citotossicità delle NPs su linea cellulare HaCaT;
- citotossicità delle NPs su linea cellulare NCTC 2544;
- citotossicità dei composti CS-GSH e SBE- β -CD su linea cellulare NCTC 2544;

Definito l'aspetto tossicologico, si passerà allo studio della capacità antiossidante delle NPs nei confronti dei sistemi cellulari HaCaT e NCTC 2544 sottoposti a condizioni ossidanti a seguito di pretrattamento con concentrazioni differenti di IDE e GSH veicolati mediante NPs. Verranno pertanto allestiti dei saggi che avranno lo scopo di valutare:

- l'attività antiossidante delle NPs nei confronti di cellule HaCaT e NCTC 2544;
- la capacità delle NPs di esplicare un'azione protettiva a livello mitocondriale su cellule NCTC 2544;
- la capacità delle NPs di preservare il contenuto tiolico intracellulare di cellule NCTC 2544.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Prima fase: preparazione del *carrier*

3.1.1. Nanomateriali

I nanomateriali oggetto di studio di questa tesi, preparati e caratterizzati in collaborazione con la Prof.ssa Adriana Trapani, del Dipartimento di Farmacia Scienze del Farmaco dell'Università degli Studi di Bari A. Moro, e la Prof.ssa Lucia Montenegro, del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università degli Studi Catania.

Il materiale utilizzato per la formulazione delle NPs è stato ottenuto da fonti commerciali e usato tal quale, come riportato di seguito:

- Chitosano cloridrato (CS) (Protasan, UP CL 113, PM=110 kDa), con un grado di deacetilazione pari all'86% acquistato dalla Pronova Biopolymer (Norvegia);
- Solfobutileter- β -ciclodestrina sale di sodio (SBE- β -CD, PM=2.163 Da) della CyDex, Inc. (USA);
- Idebenone (IDE, PM=338,44 Da) proveniente dalla Wyeth Lederle (Italia);
- Glutazione (GSH, PM=307,32 Da), della Sigma-Aldrich[®], Italia.

3.1.2. Preparazione di NP di GSH caricate con IDE (CS-GSH/SBE- β -CD-IDE), e NP di controllo (CS-GSH/ SBE- β -CD)

Le NPs sono state preparate mediante metodo di gelificazione ionica modificato [De Giglio E. et al., 2012; Aresta A. et al., 2013].

Questo metodo prevede:

1. Formazione del coniugato CS-GSH, che si realizza attraverso legame covalente tra i gruppi amminici del chitosano ($-\text{NH}^{3+}$) e il gruppo carbossi-terminale del glutammato ($-\text{COO}^-$) presente nella struttura del GSH, in rapporto finale di massa pari a 3/1 (p/p);
2. Formazione del complesso di inclusione SBE- β -CD-IDE [Trapani A. et al., 2010], che si realizza grazie all'interazione idrofobica dell'IDE con la cavità lipofila che caratterizza la struttura conica, tronca e cava della SBE- β -CD, in rapporto finale di

massa pari a 1/1 (p/p). Il legame che lega questo complesso di inclusione, è debole ed è caratterizzato da interazioni idrofobiche, elettrostatiche e di Wan der Waals.

Di seguito viene riportata una breve descrizione del metodo di preparazione delle NPs.

Dopo la formazione del coniugato CS-GSH, secondo la sintesi descritta da Trapani A. e collaboratori [Trapani et al., 2014], si procede con la formazione del complesso SBE- β -CD/IDE, che si realizza sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente per 24 ore. Tutti i reagenti vengono mantenuti in acqua bidistillata in rapporto equimolare tra IDE e SBE- β -CD. In particolare, nella procedura che ha portato alla formazione delle NPs, la concentrazione di SBE- β -CD era pari allo 0,45% (p/v), mentre la concentrazione dell'IDE era dello 0,07% (p/v). Dopo la formazione del complesso SBE- β -CD/IDE in rapporto di massa 1/1 (p/p), 1.5 mL di soluzione acquosa contenenti il coniugato CS-GSH 0.20% (p/v), sono stati miscelati con 0.25 mL del complesso SBE- β -CD/IDE e mantenuti sotto agitazione magnetica, ottenendo un rapporto finale di massa CS-GSH/SBE- β -CD-IDE pari a 3.1/1.1 (p/p).

Per le NPs utilizzate come controllo sono state utilizzate ciclodestrine modificate non caricate con IDE (SBE- β -CD), nella fase di preparazione è stato dunque omesso il punto (2) descritto sopra.

Il processo che ha portato alla formazione delle NPs, noto come reticolazione ionica, si è realizzato per interazione elettrostatica del chitosano (carico positivamente) con le ciclodestrine modificate (cariche negativamente).

Infine le NPs risultanti, sono state isolate mediante centrifugazione su una superficie di glicerolo (16,000 g, 45 min, Eppendorf 5415D, Eppendorf, Germania) e risospese in acqua bidistillata tramite agitazione manuale.

Attraverso il metodo di gelificazione ionica sono state ottenute due formulazioni nanoparticellari differenti:

- NPs a base di chitosano-GSH e ciclodestrine modificate caricate con IDE (CS-GSH/SBE- β -CD-IDE);
- NPs a base di chitosano-GSH e ciclodestrine modificate non caricate con IDE (CS-GSH/SBE- β -CD), utilizzate come NPs di controllo.

Le formulazioni nanoparticellari preparate in collaborazione con l'Università di Bari venivano spedite di volta in volta presso il Dipartimento di Scienze Biomolecolari dell'Università di Urbino e utilizzate tal quali per l'esecuzione degli esperimenti.

3.1.3. Caratterizzazione chimico-fisica delle NPs

La caratterizzazione chimico-fisica delle NPs comprendeva la misura delle dimensioni delle particelle e dell'indice di polidispersione (PI), determinate in acqua bidistillata tramite spettroscopia a correlazione di fotoni (PCS) attraverso lo strumento Zetasizer NanoZS (ZEN 3600, Malvern, UK), e la determinazione del potenziale ζ eseguita attraverso anemometria laser Doppler (Zetasizer NanoZS, ZEN 3600, Malvern, UK). Per quest'ultima analisi le NPs sono state centrifugate su una superficie di glicerolo e il pellet risultante è stato diluito con KCl 1mM seguendo la procedura precedentemente riportata da Trapani e collaboratori [Trapani et al., 2010].

Per quanto riguarda il calcolo dell'efficienza di associazione (A.E.), ovvero della capacità di carico degli antiossidanti, essa è stata calcolata in maniera indiretta: gli antiossidanti non legati dispersi nel mezzo di preparazione, venivano separati mediante centrifugazione (16000 g per 45min., in eppendorf 5415 DI, Eppendorf, Germania) dalle NPs e il dosaggio veniva fatto attraverso metodo HPLC descritto di seguito. Le prove sono state eseguite in triplicato. L'A.E. espressa in percentuale, è stata calcolata con la seguente formula:

$$\text{A. E. (\%)} = 100 * \frac{\text{Antiossidante totale} - \text{Antiossidante libero}}{\text{Antiossidante totale}}$$

Questa procedura, appare chiaro che la si può applicare facilmente per la determinazione analitica del GSH, ma non per l'IDE, in quanto quest'ultimo è insolubile in acqua. Per cui, se vi fosse IDE residuo non caricato nelle NPs, questo tenderebbe a precipitare, essendo le NPs sospese in mezzo acquoso. Pertanto, per ovviare a questo problema, la misura dell'E.A. dell'IDE nelle NPs è stata affidata all'osservazione della trasparenza delle soluzioni colloidali ottenute, e all'assenza o meno di precipitati, d'altra parte questo è un metodo che viene generalmente usato quando vengono utilizzate molecole lipofile da caricare all'interno di NPs [Jenning V. et al., 2000].

Le NPs preparate in mezzo acquoso sono state inoltre analizzate relativamente la capacità di mantenere la loro dimensione nel tempo a 20 °C e 37 °C. NPs preparate di fresco sono state incubate alle due diverse temperature, e ad opportuni intervalli di tempo (0, 1, 2, 3 settimane) venivano prelevate aliquote di campione da sottoporre all'analisi dimensionale. La dimensione di ogni aliquota è stata confrontata con il diametro misurato in acqua tramite PCS

al tempo zero. Ogni saggio è stato eseguito in triplicato ed è stato condotto fino a quando non si è osservata la formazione di aggregati.

3.1.4. Caratterizzazione morfologica delle NPs

La caratterizzazione morfologica delle NPs è stata eseguita tramite microscopia elettronica a trasmissione (TEM): una formulazione acquosa di NPs di CS-GSH/(SBE- β -CD/IDE) è stata colorata con il 2% di acido fosfotungstico (p/v); i campioni ottenuti sono stati depositati su griglie di rame rivestite con formvar a maglie 300 *mesh* e osservati a 120 kV attraverso lo strumento FEI Tecnai T12 TEM.

L'analisi morfologica e dimensionale delle NPs è stata inoltre determinata attraverso microscopia a forza atomica (AFM) mediante Atomic Force microscope XE-100 (PARK System Inc. Suwon, South Korea). L'AFM utilizzato è dotato di uno scanner di 50 μm monitorato attraverso software XEP 1.8. La scansione del nanomateriale è stata eseguita in modalità *non-contact*, e la velocità di scansione è stata impostata tra 0.2 e 1 $\mu\text{m/s}$. La risoluzione dello scanner dimensionale Z aveva una risoluzione di 0.9 Å, mentre il cantilever utilizzato era costituito da un *tip* NCLR con costante elastica nominale di 48 N/m e una frequenza di risonanza tipica compresa tra 150-170 KHz. Prima della scansione, i campioni sono stati preparati semplicemente ponendo un'aliquota di campione su un apposito foglietto di mica di dimensioni 0.5x0.5 cm, a sua volta posto su un supporto di rame, successivamente incubati per 15 min. a 37°C. La lettura veniva quindi eseguita non appena il campione era completamente asciutto sul foglietto della mica.

3.2. Seconda fase: funzionalità in sistemi *cell free*

3.2.1. Rilascio in sistemi *cell free*

Lo studio di rilascio degli antiossidanti IDE e GSH dalle NPs di CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE) in mezzo acquoso, è stato condotto utilizzando una metodica che prende il nome di “tecnica della dose infinita”, che consiste nell’applicare una grande quantità di formulazione sulla superficie di una membrana di cellulosa rigenerata all’interno di celle di diffusione verticali tipo quelle di Franz (LGA, CA) [Montenegro L. et al., 2012]. Questa tecnica evita la deplezione del composto dal compartimento donatore durante l’esperimento, assicurando la continuità del processo di rilascio e il mantenimento delle condizioni stazionarie. Come è riportato in letteratura, questa tecnica fornisce un metodo idoneo per valutare il rilascio di un farmaco da formulazioni topiche [Shah V.P. et al., 1989].

Prima di effettuare gli esperimenti di rilascio, le membrane di cellulosa venivano idratate mediante immersione in acqua per 1 h a temperatura ambiente. L’area della superficie di diffusione e il volume della camera ricevente all’interno delle celle di diffusione utilizzate erano rispettivamente di 0.75 cm² e 4.5 mL. La semicella ricevente veniva riempita con acqua/etanolo (50/50, v/v), per assicurare le condizioni di *pseudo-sink* e aumentare nello stesso tempo anche la solubilità dell’IDE nel mezzo ricevente [Touitou E. and Fabin B., 1988; Montenegro L. et al., 2006]. Il mezzo ricevente veniva costantemente agitato (700 rpm) e termostato a 35°C per mantenere la superficie della membrana a 32°C. A tal proposito, come riportato in letteratura, la camera ricevente e la membrana venivano mantenute ad una temperatura costante prossima alla temperatura normale della pelle di 32 \pm 1 °C, in quanto il rilascio del farmaco e la permeazione nella pelle sono fortemente influenzati dalla temperatura [Diembeck W. Et al., 1999].

Per l’esecuzione della prova, 0.5 mL della formulazione nanoparticellare veniva applicata sulla superficie della membrana, per un tempo totale di 24 h. A causa della foto-instabilità dell’IDE tutti gli esperimenti di rilascio venivano eseguiti al riparo dalla luce. A intervalli di tempo (0, 2, 4, 6, 24 h), 0.2 mL di soluzione presente nel mezzo ricevente venivano prelevati e sostituiti con un volume uguale di mezzo ricevente, mantenuto a 35°C. I campioni prelevati venivano dunque analizzati e sottoposti a dosaggio di IDE e GSH tramite metodi HPLC descritti nel paragrafo successivo. Durante l’esperimento inoltre, veniva monitorata anche la stabilità dimensionale ed il PI delle NPs mediante PCS, tali analisi venivano eseguite su

aliquote di campioni che venivano prelevate dalla superficie della membrana laddove erano state applicate le NPs. Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato.

3.2.2. Determinazione analitica di IDE e GSH

La quantificazione di IDE non legato durante i processi di preparazione o rilasciato dalle NPs durante gli studi di rilascio condotti attraverso le celle di diffusione di Franz, è stata eseguita mediante Cromatografia Liquida ad Alta Prestazione (HPLC), ed è stata effettuata utilizzando una pompa Waters (Waters Corp., MA) Modello 600, con un rivelatore a fotodiodi Waters 2996 e un autocampionatore da 20 μL di iniezione (Waters 717 plus). I risultati sono stati elaborati con il software Empower™ Software Build. Durante la processazione, i campioni venivano eluiti in modalità isocratica attraverso una colonna Varian (15 cm \times 4.6 mm; particelle di 5 μm), dotata di una precolonna C18 e utilizzando la soluzione metanolo: acqua in rapporto 80:20 (v:v) come eluente. Il flusso veniva mantenuto a 1.0 mL/min. Per la determinazione dell'IDE sono state realizzate rette di taratura standard alla lunghezza d'onda di 280 nm, mentre la linearità della retta di taratura ($r^2 > 0.999$) è stata mantenuta e verificata nel range di concentrazioni testate (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ –0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Il limite di quantificazione (LOQ) del metodo HPLC era pari a 0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In dette condizioni il tempo di ritenzione dell'IDE è stato valutato di 6 min.

Per la quantificazione di GSH libero derivante dalle NPs, l'analisi HPLC è stata condotta utilizzando una colonna a fase inversa Synergy Hydro-RP (25 cm x 4.6 mm, particelle da 4 μm ; Phenomenex, Torrance, CA) in combinazione con una precolonna C18 che veniva eluita con una soluzione di acetonitrile: tampone fosfato 0,025 M (pH 2,7) in rapporto 1:99 (v:v), seguendo la modalità isocratica. Il flusso era pari a 0,7 mL/min. Le rette di taratura standard sono state ottenute a una lunghezza d'onda di 220 nm utilizzando tampone fosfato 0,025 M (pH 2.7) come solvente. La linearità della retta di taratura ($r^2 > 0,999$) è stata verificata nel range di concentrazioni testate (10-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). I tempi di ritenzione di GSH e del suo prodotto di degradazione disolfuro (glutathione disolfuro, GSSG) sono stati rispettivamente di 7.2 e 18 minuti. In queste condizioni, il LOQ era pari a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sia per GSH che per GSSG.

3.2.3. Attività antiossidante delle NPs

Per la determinazione dell'attività antiossidante esplicitata dalle NPs in un sistema *cell free*, è stato utilizzato il test del radicale 2,2-difenil-1-picrilidrazile (DPPH), con lievi modifiche del protocollo riportato da Fir e collaboratori [Fir M.M. et al., 2009].

Per l'esecuzione del saggio, il radicale DPPH (DPPH•) è stato solubilizzato in etanolo ad una concentrazione pari a 0,001% (p/v), prima dell'utilizzo questa soluzione è stata diluita fino a raggiungere una concentrazione del radicale pari a 8×10^{-4} % (p/v). Dopodiché 0.5 mL di ciascun campione sono stati fatti reagire con 2.5 mL della soluzione diluita di DPPH• per 60 min., a temperatura ambiente e al riparo dalla luce. Le variazioni di assorbanza del radicale sono state misurate ad una lunghezza d'onda di 514 nm. Per il bianco, è stata utilizzata una soluzione acquosa contenente il radicale DPPH• alla stessa concentrazione testata, mentre per i controlli è stata utilizzata una soluzione acquosa satura di IDE (3 µg/mL) [Montenegro L. et al., 2012] e una soluzione acquosa di GSH (1 mg/mL), in modo da poter distinguere il comportamento degli stessi antiossidanti quando questi non sono legati alle NPs.

L'attività antiossidante espressa in percentuale, è stata calcolata mediante la seguente formula:

$$A.A. (\%) = \left[1 - \left(\frac{Ab}{Ac} \right) \right] * 100$$

Dove:

A.A. = attività antiossidante;

Ab = assorbanza del bianco a 514 nm;

Ac = assorbanza del campione a 514 nm.

3.3. Terza fase: attività *in vitro* su cheratinoci umani

3.3.1. Linee Cellulari

Per gli studi cellulari *in vitro* sono state utilizzate linee cellulari umane provenienti dall'ATCC (*American Tissue Culture Collection*)

- **HaCaT:** linea umana di cheratinociti umani immortalizzati [Boukamp et al., 1988];
- **NCTC 2544:** linea umana di cellule cheratinocitiche sane [Ree K. et al., 1981].

La linea cellulare HaCaT appartiene ad una linea spontaneamente immortalizzata di cheratinociti ottenuta attraverso una lunga coltura *in vitro* di cheratinociti umani sani. E' stata chiamata HaCaT (da Ha= human, Ca= calcium, T= Temperature) per indicare le condizioni iniziali di coltura. Questa linea cellulare non è tumorigenica e viene utilizzata per la buona capacità di proliferare e differenziare in coltura. Le cellule HaCaT sono molto utilizzate per studiare la biologia dei cheratinociti e il loro differenziamento [Boukamp et al., 1988].

La linea cellulare NCTC 2544 è una linea commerciale di cheratinociti umani provenienti da pelle sana. Questa linea cellulare essendo meno differenziata rispetto alla linea HaCaT, con caratteristiche tipiche dello strato basale dell'epidermide [Burlando B. et al., 2008; Serini S. et al., 2011], risulta più facilmente suscettibile a insulti esterni da parte di agenti irritanti [Scanarotti C. et al., 2013].

Entrambe le linee cellulari vengono utilizzate come modelli per valutare le possibili azioni protettive e/o terapeutiche di farmaci nonché per la valutazione di agenti nocivi nei confronti dell'epidermide.

Per l'allestimento dei saggi sperimentali le linee cellulari HaCaT e NCTC 2544 sono state mantenute in coltura in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium- Sigma-Aldrich®) con l'aggiunta del 10% di siero fetale (FBS) inattivato al calore, l'1% di antibiotici (penicillina-streptomina 10.000 µg/mL) e l'1% di glutammina, in incubatore (Heraeus, HERA cell) a 37°C e con il 5% di CO₂. Queste tipologie di cellule vengono fatte crescere in adesione in fiasche (Greiner Bio-one) da 25 cm² e divise ogni 48 h circa dopo un lavaggio in PBS, 0.4 mL di Tripsina (Sigma-Aldrich®, diluita 1:10) per 10 min, bloccata poi con 4.6 mL di DMEM. Prima dell'utilizzo, tutti i componenti necessari per la coltura vengono preriscaldati in bagnetto a 37°C.

3.3.2. Studi di citotossicità: Saggio MTT

Il saggio MTT è stato uno dei primi protocolli utilizzati per gli studi di tossicità cellulare, ancora oggi ampiamente adottato nei laboratori considerate le numerose pubblicazioni che ne fanno riferimento [Riss T.L. et al., 2004-2013].

Il test MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide) è un saggio colorimetrico standard che consente di misurare l'attività enzimatica mitocondriale coinvolta nella reazione di riduzione dell'MTT a formazano, si tratta di una reazione colorimetrica che determina un cambiamento di colore del composto MTT che da giallo diventa blu-violetto. Questa reazione viene catalizzata dall'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi [Slater T.F. et al., 1963], attivo soltanto nelle cellule vive, e ha la funzione di tagliare l'anello di tetrazolio dell'MTT (sostanza di colore giallo) portando alla formazione di formazano (un sale blu) [Berridge M.V. et al., 1993-1996] (Figura 13).

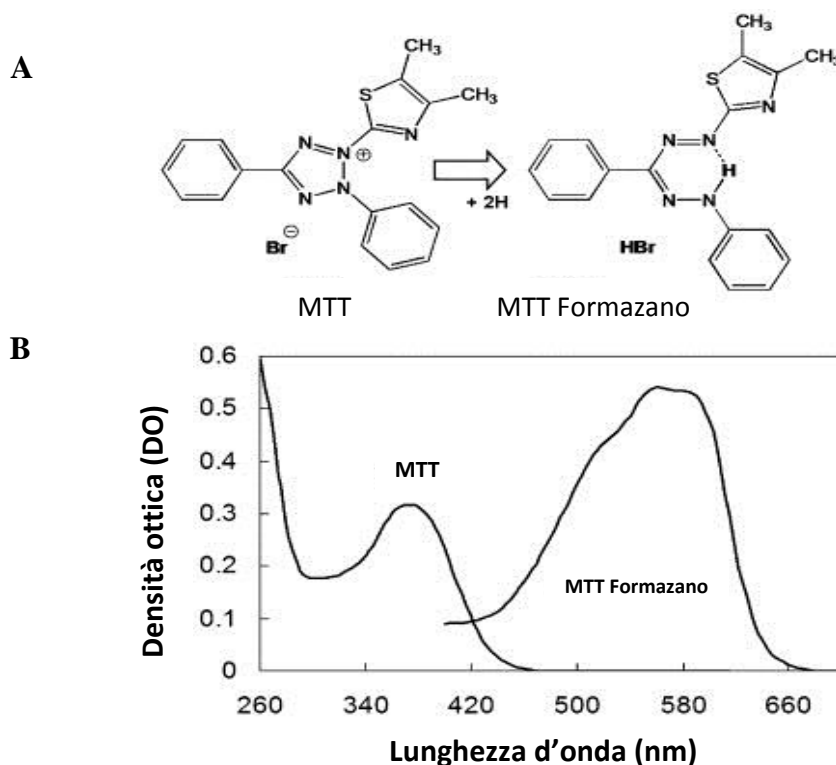


Fig. 13. Struttura del tetrazolio MTT e del suo prodotto formazano (pannello A). In basso (pannello B) è riportato lo spettro di assorbimento del composto MTT. L'assorbimento dell'MTT è misurato a 382 nm, esso diminuisce in corrispondenza della reazione di riduzione e quindi della sua conversione in formazano, il cui picco massimo di assorbimento è misurato a 570 nm. [Berridge M.V. et al., 1993-1996].

Il formazano prodotto, tende a rimanere localizzato all'interno dei mitocondri, pertanto per quantificarlo è necessario solubilizzarlo ed estrarlo dalle cellule. A tale scopo, viene generalmente utilizzata una soluzione solubilizzante contenente SDS [Mosmann T., 1983; Denizot F. e Lang R., 1986; Tada H. et al., 1986].

La densità ottica (OD) del formazano viene misurata spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda pari a 570 nm. In cellule in fase logaritmica di crescita, la quantità di formazano prodotto è proporzionale al numero di cellule vitali metabolicamente attive [Riss T.L. et al., 2004-2013].

I vantaggi che portano all'utilizzo di questa metodica sono numerosi: è semplice da utilizzare, veloce, non radioattiva, flessibile, riproducibile e sicura [Mosmann et al., 1983; Denizot and Long 1986].

Mediante saggio MTT è stata testata la citotossicità di entrambe formulazioni nanoparticellari, NP CS-GSH/SBE- β -CD-IDE e NP CS-GSH/SBE- β -CD, o dei singoli componenti (CS-GSH e SBE- β -CD) a varie concentrazioni e a vari tempi su due linee cellulari di cheratinociti umani (HaCaT e NCTC 2544).

Per l'esecuzione del saggio, cellule HaCaT trattate con entrambe NPs (IDE nel range 0-787 ng/ μ L e GSH nel range 0-1725 ng/ μ L) e cellule NCTC 2544 trattate con entrambe NPs e con i composti CS-GSH e SBE- β -CD-IDE (IDE nel range 0-1.6 ng/ μ L e GSH nel range 0-12 ng/ μ L), sono state piastrate (4×10^4 /mL) in piastre da 96 pozzetti (Sarstedt) 100 μ L/pozzetto, ogni concentrazione di NPs è stata testata in ottuplicato. Per ogni nanomateriale sono state allestite due piastre uguali e poste in incubatore per 24 e 48 h. Allo scadere di ciascuna incubazione sono stati aggiunti 20 μ L/pozzetto di una soluzione MTT (0.5 mg/mL) (Sigma Aldrich[®]) e dopo 4 h di incubazione a 37°C sono stati aggiunti 150 μ L/pozzetto di SDS 0.520M (Sigma Aldrich[®]).

La lettura è stata eseguita dopo incubazione di 1 h a 37 °C, e l'assorbimento è stato misurato a 570 nm mediante lettore Microplate Reader (Bio-rad Benchmark), utilizzando il programma software Microplate Manager[®].

Per verificare l'eventuale interferenza, ovvero l'assorbimento generato dall'interazione dei nanomateriali con l'MTT a 570 nm, concentrazioni corrispondenti di NPs e dei composti CS-GSH e SBE- β -CD-IDE sono state testate in terreno senza cellule, utilizzando la stessa procedura, tale assorbimento è stato sottratto ai valori di assorbimento sperimentale. Ogni prova è stata condotta in triplicato.

La vitalità cellulare, espressa in percentuale, è stata calcolata utilizzando la seguente formula:

$$V.C. (\%) = \left[\frac{OD (570 \text{ nm}) Ct - OD (570 \text{ nm}) NPs}{OD (570 \text{ nm}) Cc} \right] * 100$$

Dove: V.C. = vitalità cellulare; OD = densità ottica del formazano a 570 nm; Ct = cellule trattate; Cc = cellule di controllo.

3.3.3. Attività antiossidante delle NPs in cheratinociti umani

La maggior parte dei metodi utilizzati per il dosaggio dello stress ossidativo cellulare, sfruttano la capacità delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) di cambiare l'assorbanza o le proprietà fluorescenti di specifici substrati [Canonico B. et al., 2009]. In particolare è stato usato il composto 2',7'-diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA) [Halliwell and Whiteman, 2004], che rappresenta una metodica ampiamente utilizzata in citofluorimetria per misurare direttamente lo stato redox di una cellula. E' un saggio che mostra numerosi vantaggi rispetto alle altre tecniche sviluppate per questo scopo, è estremamente sensibile al cambiamento dello stato redox, è a basso costo e può essere usato per monitorare il cambiamento dei ROS nel tempo [Eruslanow E., Kusmartsev S. 2010].

La DCFH-DA è una molecola non polare, diffonde facilmente all'interno delle cellule e viene idrolizzata dalle esterasi intracellulari che rimuovono i gruppi acetato rendendola polare e quindi impermeabile.

Il nuovo composto polare DCFH viene ossidato dai ROS intracellulari portando alla formazione di 2',7'-diclorofluoresceina (DCF), una molecola altamente fluorescente che emette ad una lunghezza d'onda di 532 nm [Clift K. and Clift M.J.D., 2010] (Figura.14).

Dati recenti indicano che l'ossidazione di DCFH è dovuta principalmente a H₂O₂ o a perossidasi di basso PM generate dalle cellule, per questo motivo l'intensità di fluorescenza emessa viene considerata proporzionale alla quantità di H₂O₂ prodotto dalle cellule [Trinei G.M. et al., 2007].

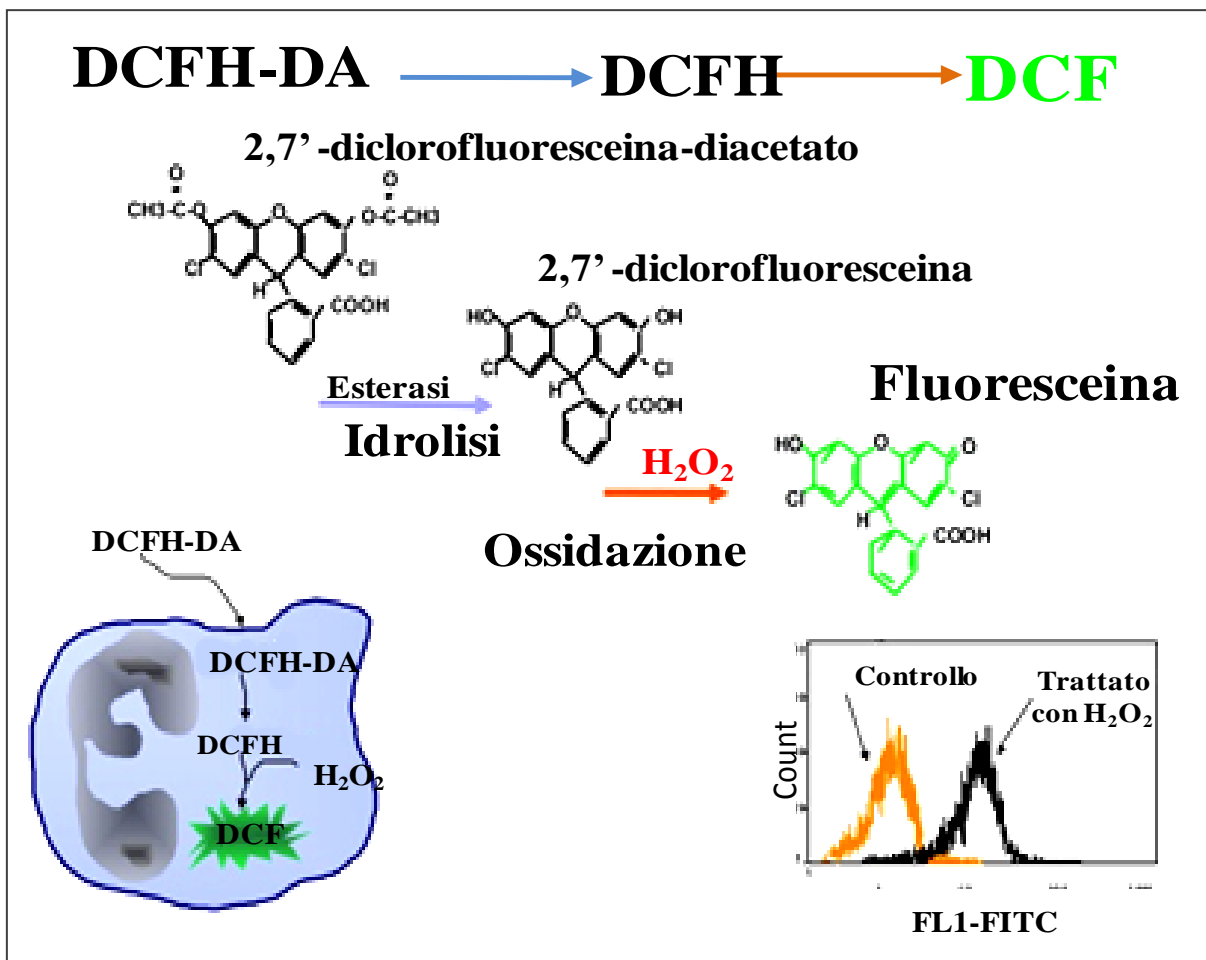


Fig. 14. Funzionalità della molecola DCFH-DA all'interno di una cellula. La molecola DCFH-DA a seguito di esterificazione intracellulare in DCFH viene ossidata dai ROS intracellulari (H_2O_2), e convertita in DCF, la cui fluorescenza viene misurata in citofluorimetria attraverso il canale di fluorescenza FL1-FITC. In basso l'immagine di un istogramma ottenuto mediante acquisizione citofluorimetrica, che mostra la fluorescenza di un campione di controllo rispetto ad un campione trattato con H_2O_2 [Canonicò B. et al., 2009].

3.3.3.1. Protocollo di colorazione con DCFH-DA

Il saggio di colorazione citofluorimetrica con DCFH-DA, è stato utilizzato per testare l'attività antiossidante di IDE e GSH veicolati attraverso le NPs su cellule di cheratinociti umani (NCTC 2544) sottoposte a condizioni ossidanti.

Per la preparazione del saggio, 1 mL di sospensione cellulare (0.3×10^6 /mL) è stata messa in coltura su piastre da 24 pozzetti (Greiner Bio-One), atteso il tempo di adesione, le cellule sono state trattate con quantità crescenti di NPs (IDE alle concentrazioni 0.008-0.08-0.8 ng/ μ L, e GSH alle concentrazioni 0.06-0.6-6 ng/ μ L), ed incubate a 37°C e 5% CO_2 per 18 h

[Goldschmidt R. et al., 2013]. Per i campioni di controllo non è stata fatta alcuna aggiunta di composti.

Inoltre, come ulteriore controllo, è stato effettuato su cellule NCTC 2544, un trattamento con IDE libero solubilizzato in DMSO, alle stesse concentrazioni testate con le NPs. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

Dopo il pretrattamento con i vari composti, le piastre sono state lavate in PBS per eliminare i composti che erano stati aggiunti al terreno di coltura, ed è stato addizionato perossido d'idrogeno (Sigma Aldrich®) ad una concentrazione finale di 400 µM, i campioni sono stati quindi incubati a 37°C per 30 min. [Vitale N. et al., 2013].

Infine, ciascun campione, è stato trattato con 10 µL di DCFH-DA (Invitrogen®), alla concentrazione finale di 0.5 µM, ed incubato per 10 min. al buio a 37°C [Zeller J. M. et al., 1989].

A questo punto, prima della lettura i campioni sono stati recuperati completamente e posti in tubi da citofluorimetro (Sarstedt 75x12 mm Ø), centrifugati a 1600 rpm per 5min., deprivati del surnatante, e risospesi in 400 µL di PBS.

I campioni sono stati letti mediante citofluorimetro FACScan (Becton and Dickinson) con un laser ad ioni di 488 nm. Lo stress ossidativo indotto è stato calcolato con la seguente formula:

$$\text{R. P. (\%)} = \left(\frac{\text{FITC} + (530 \text{ nm}) \text{ Ct}}{\text{FITC} + (530 \text{ nm}) \text{ Cc}} \right) * 100$$

Dove:

R.P (%) = produzione di ROS intracellulari;

FITC+ = rappresenta la positività alla fluorescenza emessa dalla DCF in cellule stressate;

Ct = cellule trattate;

Cc = cellule di controllo.

3.3.4. Valutazione del danno mitocondriale indotto

Il potenziale di membrana mitocondriale, è generato dal normale funzionamento della catena di trasporto degli elettroni che avviene nel mitocondrio. Durante questo trasporto elettronico si genera un flusso protonico che viene spinto dalla matrice al citoplasma, attraverso la membrana mitocondriale interna, creando un gradiente elettrochimico. Da questo gradiente

dipende a sua volta la formazione di molecole di ATP, pertanto la variazione del potenziale di membrana è un parametro importante dell'efficienza mitocondriale, nonché una spia indiretta dello stato energetico della cellula. Generalmente la perdita del potenziale di membrana mitocondriale è un segno evidente di fenomeni come la necrosi o l'apoptosi.

Per rilevare un danneggiamento del potenziale di membrana a livello della singola cellula, è stata utilizzata una tecnica citofluorimetrica che si avvale di un colorante cationico, lipofilico: lo ioduro di 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-benzimidazolcarbocianina (JC-1). In cellule sane, la carica negativa di un potenziale di membrana integro, consente al colorante cationico di penetrare la matrice mitocondriale, dove si accumula sottoforma di aggregati, conferendone una colorazione tipicamente rossa. In cellule danneggiate, che hanno subito un collasso del potenziale di membrana, il JC-1 non si accumula dentro il mitocondrio, ma tende a rimanere nel citoplasma, sottoforma di monomeri che emettono una fluorescenza di colore verde (Figura 15) [Canonica B. et al., 2009].

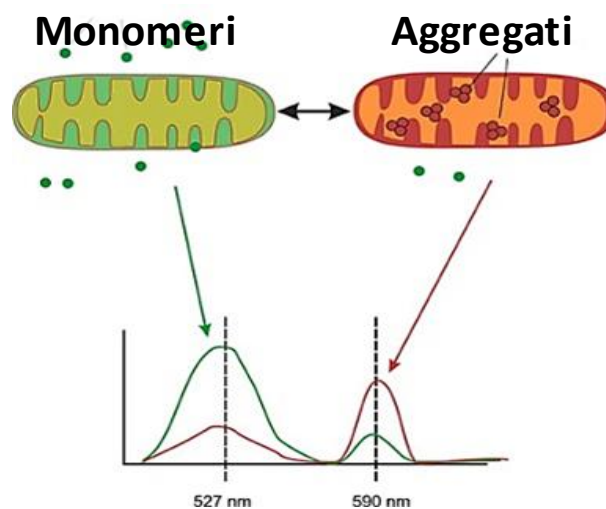


Fig. 15. Emissione di fluorescenza differenziale del JC-1 all'interno di una cellula. Il JC-1, quando è in forma monomerica nel citoplasma ha un'emissione di fluorescenza di colore verde (527 nm), quando è sottoforma di aggregati dentro il mitocondrio è invece di colore rosso (590 nm). La lettura è eseguita attraverso canale di fluorescenza FL1 e FL2 rispettivamente mediante citofluorimetro [Canonica B. et al., 2009].

3.3.4.1. Protocollo di colorazione con JC-1

Il saggio di colorazione citofluorimetrica con JC-1, è stato utilizzato per testare la capacità delle NPs di preservare le cellule NCTC 2544 dal danno mitocondriale indotto.

Per l'allestimento del saggio, 1 mL di sospensione cellulare ($0.3 \times 10^6/\text{mL}$) è stata messa in coltura su piastre da 24 pozzetti (Greiner Bio-One), atteso il tempo di adesione, le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di entrambe NPs (IDE nel range 0.008-0.8 ng/ μL , e GSH nel range 0.06-6 ng/ μL), ed incubate a 37°C e 5% CO_2 per 18 h. Per i campioni di controllo non è stata fatta alcuna aggiunta di composti. Inoltre, come ulteriore controllo, è stato effettuato un trattamento con IDE libero solubilizzato in DMSO, alle stesse concentrazioni testate con le NPs. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

Dopo il pretrattamento con i vari composti, le piastre sono state lavate in PBS per eliminare i composti che erano stati aggiunti al terreno di coltura, ed è stato addizionato un disaccoppiante energetico che provoca il collasso del potenziale di membrana di tutti i mitocondri meglio conosciuto come CCCP (carbonyl cyanide m-clorofenidrazone, Sigma-Aldrich®) ad una concentrazione finale di 50 μM . I campioni quindi sono stati incubati a 37°C e 5% di CO_2 per 20 min. Infine, ciascun campione, è stato trattato con JC-1 (Molecular Probes), alla concentrazione finale di 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ed incubato per 10 min. al buio a 37°C.

A questo punto, prima della lettura i campioni sono stati recuperati completamente e posti in tubi da citofluorimetro (Sarstedt 75x12 mm \varnothing), centrifugati a 1600 rpm per 5min., deprivati del surnatante, e risospesi in 400 μL di PBS.

I campioni sono stati letti mediante citofluorimetro FACScan (Becton and Dickinson) con un laser ad ioni di 488 nm (Figura 16).

Il danno mitocondriale indotto, espresso in percentuale, è stato calcolato con la seguente formula:

$$\text{D. M. (\%)} = \left(\frac{\text{FITC} + (530 \text{ nm}) \text{ Ct}}{\text{FITC} + (530 \text{ nm}) \text{ Cc}} \right) * 100$$

Dove:

FITC+ = rappresenta la positività alla fluorescenza verde emessa dal JC-1, in cellule che hanno subito danno mitocondriale; Ct = cellule trattate; Cc = cellule di controllo.

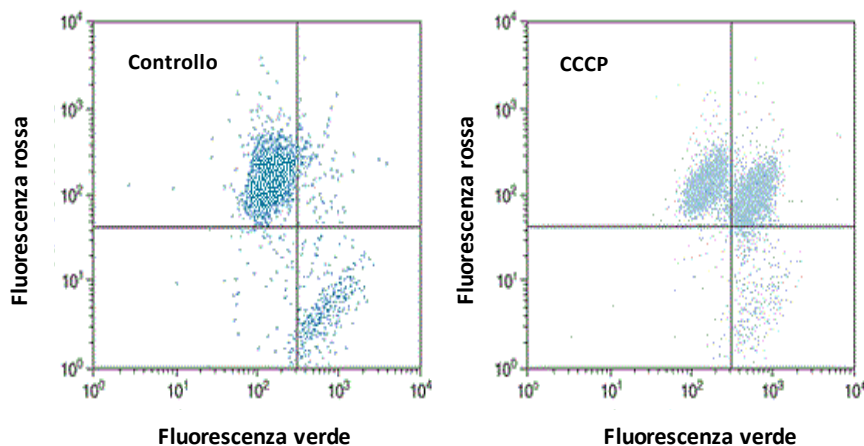


Fig. 16. Dot-plot di due acquisizioni citofluorimetriche. Controllo negativo (a sinistra), e campione trattato con CCCP (a destra). Il CCCP (carbonyl cyanide *m*-clorofenidrazone) è un disaccoppiante energetico che provoca il collasso del potenziale di membrana [Canonica B. et al., 2009].

3.3.5. Determinazione del contenuto tiolico intracellulare

I tioli, sono composti organici caratterizzati dalla presenza nella propria struttura di un gruppo sulfidrilico (-SH), e rappresentano una componente importante della barriera antiossidante contro i radicali liberi, grazie alla loro capacità di cedere gruppi idrogeno e neutralizzare le specie potenzialmente reattive. Ne fanno parte la cisteina, isolata o incorporata in peptidi come il glutatione, o all'interno di vere e proprie proteine.

Il reattivo di Ellman, chiamato DTNB (acido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico) è stato utilizzato per la prima volta nel 1959 per stimare il numero di gruppi tiolici liberi [Sedlak J. and Lindsay R.H., 1968; Reiner C.K. et al., 2002]. Il saggio di Ellman è un metodo che sfrutta la capacità dei gruppi tiolici di generare una reazione colorimetrica quando reagiscono con il reattivo di Ellman, misurabile spettrofotometricamente. Questa reazione si realizza per rottura del ponte disolfuro presente nel DTNB che porta alla formazione dell'anione 2-nitro-tiobenzoato (NTB⁻) e di un disolfuro misto, che si ionizza nel dianione 2-nitro-5-mercaptobenzoico (TNB²⁻) di colore giallo. Il meccanismo di reazione è riportato in Figura 17. Il "titolo" di tioli è direttamente proporzionale all'intensità di assorbimento del TNB²⁻ rilevato strumentalmente a 412 nm.

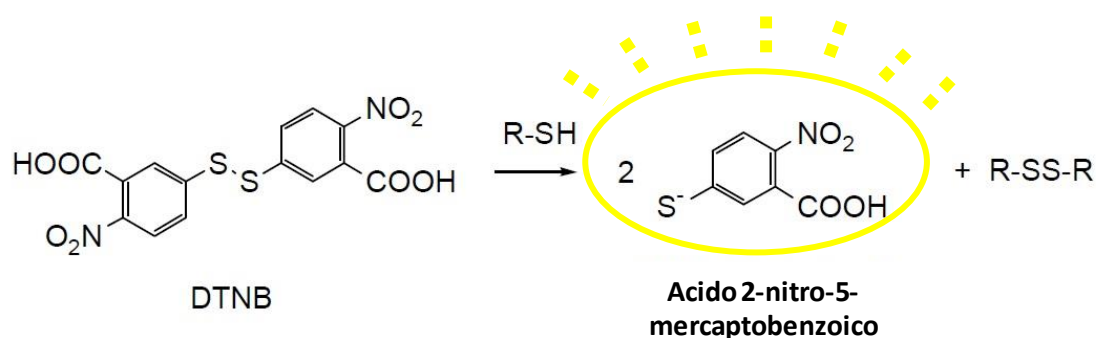


Fig. 17. Reazione di riduzione del DTNB per mezzo di un gruppo tiolico, che genera un composto di colore giallo, più un disolfuro misto R-SS-R [Reiner C.K. et al., 2002].

3.3.5.1. Protocollo per il dosaggio tiolico: saggio di Ellman

Il metodo utilizzato per il dosaggio tiolico, eseguito mediante il reattivo di Ellman, è stato scelto per valutare la capacità delle NPs di preservare il contenuto tiolico intracellulare in cellule NCTC 2544 sottoposte a condizioni ossidanti.

Per l'esecuzione di questo protocollo, 1 mL di sospensione cellulare (0.6×10^6 /mL) è stata messa in coltura su piastre da 24 pozzetti (Greiner Bio-One), atteso il tempo di adesione, le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di NPs (contenenti IDE nel range 0.008-0.8 ng/ μ L, e GSH nel range 0.06-6 ng/ μ L), ed incubate a 37°C e 5% di CO₂ per 18 h. Per i campioni di controllo non è stata fatta alcuna aggiunta di composti. Inoltre, come ulteriore controllo, è stato effettuato un trattamento con IDE libero solubilizzato in DMSO, alle stesse concentrazioni testate con le NPs. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

Dopo il pretrattamento con i vari composti, le piastre sono state lavate in PBS per eliminare i composti che erano stati aggiunti al terreno di coltura, ed è stato eseguito uno stress ossidativo mediante H₂O₂ (Sigma-Aldrich®) ad una concentrazione finale di 400 μ M, i campioni quindi sono stati incubati a 37 °C e 5% di CO₂ per h. Dopodiché, le cellule sono state lavate in 1 mL di PBS e poste in ghiaccio.

La lisi cellulare è stata fatta attraverso sonicazione, effettuando 2 passaggi di 10 secondi a 50 Watt mediante sonicatore B. Braun Biotech International (B. Braun Labsonic® U).

A questo punto, 0.5 mL del lisato cellulare è stato utilizzato per il dosaggio delle proteine (mg/mL) mediante metodo Bradford [Bradford M.M., 1976], mentre la restante parte del campione è stata diluita (1:1) con acido tricloroacetico al 20% (Carlo Erba Reagents), posto in ghiaccio per 5 min., infine centrifugato a 13.000 rpm per 7 min. a 4 °C.

Per il bianco, sono stati utilizzati 0.5 mL di PBS diluito (1:1) con acido tricloroacetico al 20%.

Per la lettura eseguita mediante spettrofotometro (Bechman DU® 7500 spectrophotometer) sono state utilizzate cuvette da 3 mL (Sarstedt), contenenti 0.5 mL di surnatante, 1 mL di soluzione EDTA (0.4 mM)-Tris-HCl (0.2 mM) pH 8.9, e 25 µL di DTNB (10 mM in metanolo).

Il contenuto tiolico (T) espresso come nmoli/mg di proteine, è stato calcolato con la seguente formula:

$$T. (\text{nmoli}/(\text{mg proteine})) = [(\text{Abs (412 nm)} * 1000) - 1.2]/14.9/(\text{mg proteine})$$

Dove: Abs (412) = assorbimento a 412 nm dell'acido 2-nitro-5-mercaptobenzoico.

Il contenuto tiolico intracellulare dei campioni trattati è stato valutato attraverso il confronto sia con il contenuto tiolico basale di un campione di controllo, non esposto a condizioni ossidanti (CTR-), sia con il contenuto tiolico di un campione di controllo (CTR+) trattato con H₂O₂, che rappresenta il 100% di deplezione tiolica indotta. I valori sperimentali sono stati quindi espressi come valore percentuale rispetto al CTR+, mediante la seguente formula:

$$T. (\%) = [(T. (\text{nmoli}/\text{mg proteine}) \text{ Ct})/T. (\text{nmoli}/\text{mg proteine}) \text{ Cc}] * 100$$

Dove: Ct = cellule trattate; Cc = cellule di controllo (CTR+).

3.4. Analisi statistica dei dati

I dati della caratterizzazione fisico-chimica e degli studi di rilascio *in vitro* sono stati analizzati attraverso Test ANOVA e le differenze sono state considerate significative ad un intervallo di confidenza (CI) del 95 % ($p \leq 0.05$), utilizzando il programma Graph Pad Prism v. 5.00 (Graph Pad Software, Inc. CA, USA). Mentre, i dati relativi agli studi cellulari *in vitro* sono stati analizzati mediante Test T Student, e le differenze sono state considerate significative ad un CI del 95% ($p \leq 0.05$) e del 99% ($p \leq 0.01$).

4. RISULTATI

4.1. Prima fase: preparazione del *carrier*

4.1.1. Caratterizzazione chimico-fisica delle NPs

Per la preparazione delle NPs che non contengono idebenone (IDE) denominate CS-GSH/(SBE- β -CD), e delle NPs caricate con IDE denominate CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE), è stata fondamentale la scelta di un adeguato agente reticolante come la sulfobutileter- β -ciclodestrina (SBE- β -CD) che permettesse la gelificazione ionica del chitosano (CS) e contemporaneamente consentisse di formare un complesso di inclusione, in grado di accogliere al suo interno una molecola lipofila come l'IDE [Cannavà C. et al., 2013].

Le interazioni idrofobiche che si instaurano tra l'IDE e le ciclodestrine inducono un riarrangiamento sterico tale da produrre un restringimento del diametro endocavitario delle CDs, in una struttura finale che appare complessivamente più stabile e compatta. Questa modificazione conformazionale conferisce alle NPs caricate con IDE delle dimensioni inferiori (376 ± 78 nm) rispetto al maggior diametro riscontrato nelle analoghe NPs non caricate con IDE (875 ± 76 nm) (Tabella 2).

Come descritto nella sezione M&M le NPs sono state preparate in mezzo acquoso, esse hanno un pH intorno a 5, che assicura una buona tollerabilità cutanea per potenziali applicazioni topiche. Le NPs mostrano inoltre un indice di polidispersione (PI) inferiore a 0.4, ad indicare una popolazione nanoparticellare discretamente omogenea, ed un potenziale zeta (mV) positivo conferito delle catene di CS che costituiscono lo *shell* delle NPs.

L'efficienza di associazione (E.A.) dell'IDE non è stata determinata sperimentalmente, poiché l'IDE è un molecola scarsamente solubile in acqua ($3 \mu\text{g/mL}$); se l'IDE non venisse incorporato nelle NPs tenderebbe a precipitare e la soluzione avrebbe un aspetto torbido. Le formulazioni di NPs durante la preparazione mostravano un aspetto trasparente, senza formazione di precipitati, si è assunto quindi che tutto l'IDE addizionato è stato completamente incorporato all'interno delle NPs con un efficienza di associazione pari al 100%. Per quanto riguarda l'E.A del GSH, l'analisi HPLC non ha rilevato nessuna traccia significativa di GSH (né della sua forma ossidata GSSG) sul surnatante derivante dalle formulazioni delle NPs, ciò indica che il GSH si lega ai *nanocarriers*, e ha efficienza di associazione pari al 99%.

NPs	pH	Diametro (nm)	PI	Potenziale zeta (mV)	E.A. GSH (%)
CS-GSH/ (SBE- β -CD)	5.7	875 \pm 76	0.28-0.40	+20.4 \pm 1.5	98.9 \pm 3.3
CS-GSH/ (SBE- β -CD-IDE)	5.2	376 \pm 78	0.33-0.48	+23.0 \pm 0.9	99.4 \pm 2.7

Tab. 2. Proprietà chimico-fisiche di NPs di CS-GSH/(SBE- β -CD) e CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE) in mezzo acquoso. PI: indice di polidispersione. E.A.(%): efficienza di associazione. Sono riportate le medie \pm S.D. (n=6).[Montenengro et al., 2014].

La valutazione della stabilità dimensionale (diametro in nm) condotta a 20°C e 37°C per tre settimane rileva l'assenza di formazione di aggregati (Figura 18). Le dimensioni delle NPs risultano stabili in funzione del tempo. Dai risultati ottenuti, si osserva una riduzione non significativa delle dimensioni dopo tre settimane, e ciò è dovuto al fatto che lo *shell* delle NPs potrebbe essere soggetto a meccanismi idrodinamici. Infatti, poiché le NPs sono preparate in mezzo acquoso, quando vengono centrifugate per allontanare gli antiossidanti non legati, le NPs subiscono un rigonfiamento dovuto a idratazione dello *shell* costituito da chitosano, che si riduce di dimensione quando esse vengono incubate a 20 e 37 °C.

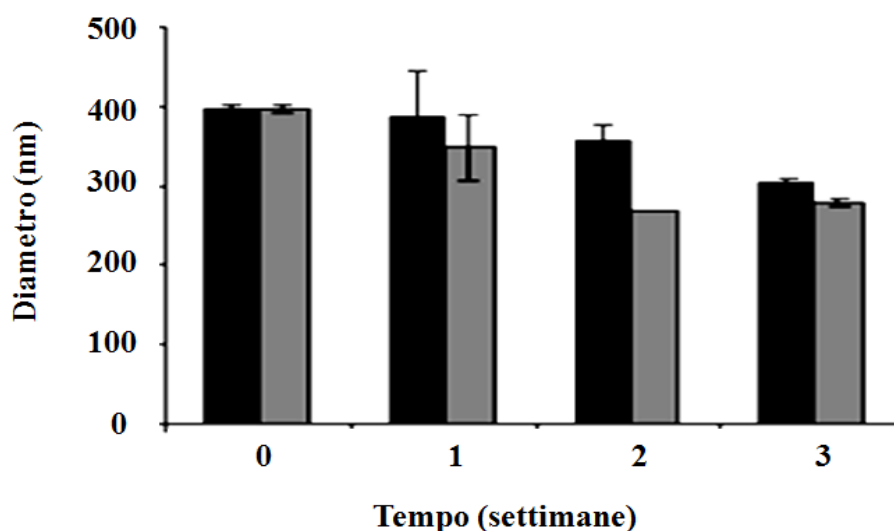


Fig. 18. Dimensioni particellari di NPs di CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE) a 20°C (barre nere) e a 37°C (barre grigie). I valori rappresentano le medie \pm SD (n=3)[Montenengro et al., 2014].

4.1.2. Caratterizzazione morfologica delle NPs

La microfotografia TEM (Figura 19) conferma le dimensioni delle NPs CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE) precedentemente calcolate mediante PCS e rileva una forma pressoché sferica. Dall'analisi delle immagini ottenute al TEM non si evidenzia alcuna forma di aggregazione. Le immagini ottenute con AFM (Figura 20) confermano che le NP CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE) hanno delle dimensioni inferiori rispetto alle NPs che non contengono IDE.

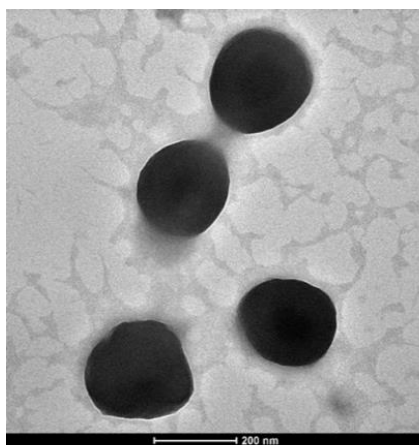


Fig. 19. Immagine TEM di NP CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE) in mezzo acquoso. Aree filamentose di colore grigio chiaro sono dovute ai residui della soluzione contenente acido fosfotungstico utilizzato per la colorazione [Montenengro et al., 2014].

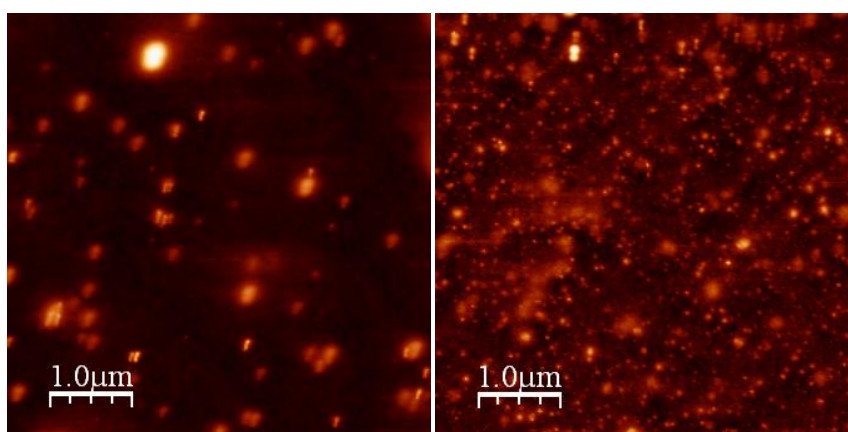


Fig. 20. Immagine AFM di NP CS-GSH/(SBE- β -CD) (a destra) e di NP CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE) (a sinistra).

4.2. Seconda fase: funzionalità in sistemi *cell free*

4.2.1. Rilascio in sistemi *cell free*

Un requisito essenziale dei sistemi farmaceutici colloidali è la loro capacità di rilasciare le sostanze attive presenti nella formulazione.

La capacità di rilascio *in vitro* di IDE e GSH da parte delle NPs CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE), è stata valutata usando la tecnica della dose infinita, descritta in dettaglio in M&M.

In Figura 21 è riportato il profilo di rilascio di IDE dalle NPs CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE), il quale segue una modalità di tipo lineare poichè si osserva una perfetta correlazione della quantità rilasciata in funzione del tempo ($r^2=0.98$, Flusso = $0.33 \pm 0.04 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, Lag time = 1.33 h). Mentre non è stato osservato alcun rilascio di GSH, probabilmente dovuto al legame covalente che esso instaura con il CS ancora presente alle condizioni sperimentali scelte.

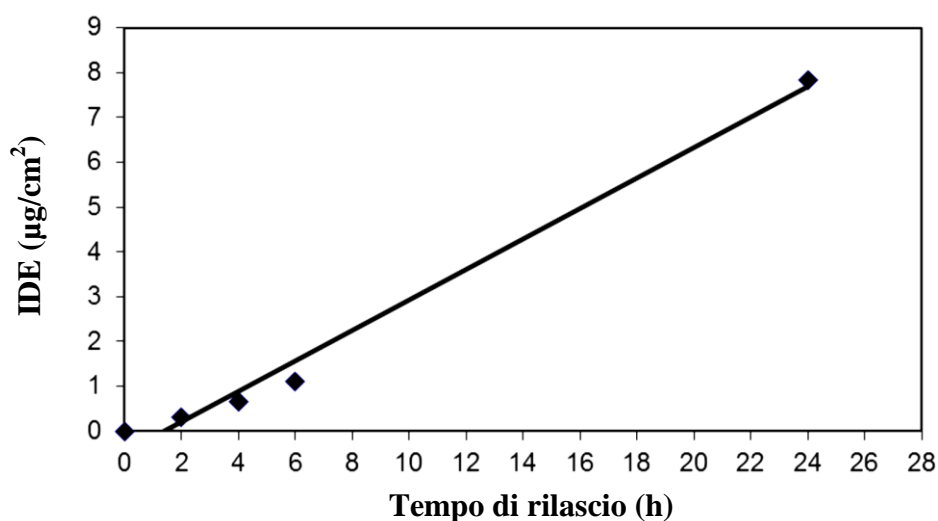


Fig. 21. Rilascio di IDE da NPs CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE) tramite celle di diffusione di Franz [Montenengro et al., 2014].

4.2.2. Attività antiossidante delle NPs

L'attività antiossidante delle NPs è stata valutata utilizzando un metodo spettrofotometrico basato sull'uso del radicale libero DPPH [Fir M.M. et al., 2009].

Mettendo a confronto le capacità antiossidante di IDE e GSH si è visto che l'IDE 3 $\mu\text{g/mL}$ (massima concentrazione solubile in acqua), non mostra alcuna attività antiossidante a differenza del GSH che ha un'attività antiossidante del 99%. Ciò è probabilmente dovuto alla scarsa solubilità in acqua dell'IDE, che non permette l'interazione con il DPPH, mentre quando l'IDE viene caricato nelle NPs esplica un'attività antiossidante del 92%.

Composto	Attività antiossidante (%) \pm S.D.
IDE	0
GSH	98.9 \pm 3.1
NP CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE)	91.6 \pm 3.5

Tab. 3. Attività antiossidante delle NPs di CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE), rispetto ad una soluzione acquosa satura di IDE libero (3 $\mu\text{g/ml}$) o di GSH (1 mg/mL). I dati rappresentano la media \pm SD (n=3).

4.3. Terza fase: Attività *in vitro* in cheratinociti umani

4.3.1. Citotossicità in cheratinociti umani (HaCaT e NCTC 2544)

Prima di utilizzare il saggio MTT, per la valutazione della citotossicità nelle linee cellulari indicate, abbiamo voluto vedere se i nanomateriali che compongono le NPs (CS-GSH e SBE- β -CD-IDE) o le NPs CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE) e CS-GSH/(SBE- β -CD) potessero interferire con il saggio prescelto dando degli assorbimenti aspecifici. Pertanto i valori di assorbimento dei nanomateriali e delle NPs in assenza di cellule sono stati detratti dai valori sperimentali.

Successivamente, è stata valutata la citotossicità delle NPs CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE) e CS-GSH/(SBE- β -CD) e dei loro rispettivi componenti su due linee cellulari di cheratinociti umani (HaCaT e NCTC 2544). I risultati ottenuti sulla linea cellulare HaCaT non evidenziano nessun effetto citotossico a seguito di trattamento con le NPs a tutte le concentrazioni testate (0-2000 $\text{ng}/\mu\text{L}$ di IDE e/o 0-1725 $\text{ng}/\mu\text{L}$ di GSH) e non varia in funzione del tempo di trattamento 24 o 48 h (Figura 22 A-B). Da notare che la presenza di IDE nelle NPs CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE) non induce alcuna variazione significativa della vitalità cellulare rispetto al trattamento con le NPs di controllo.

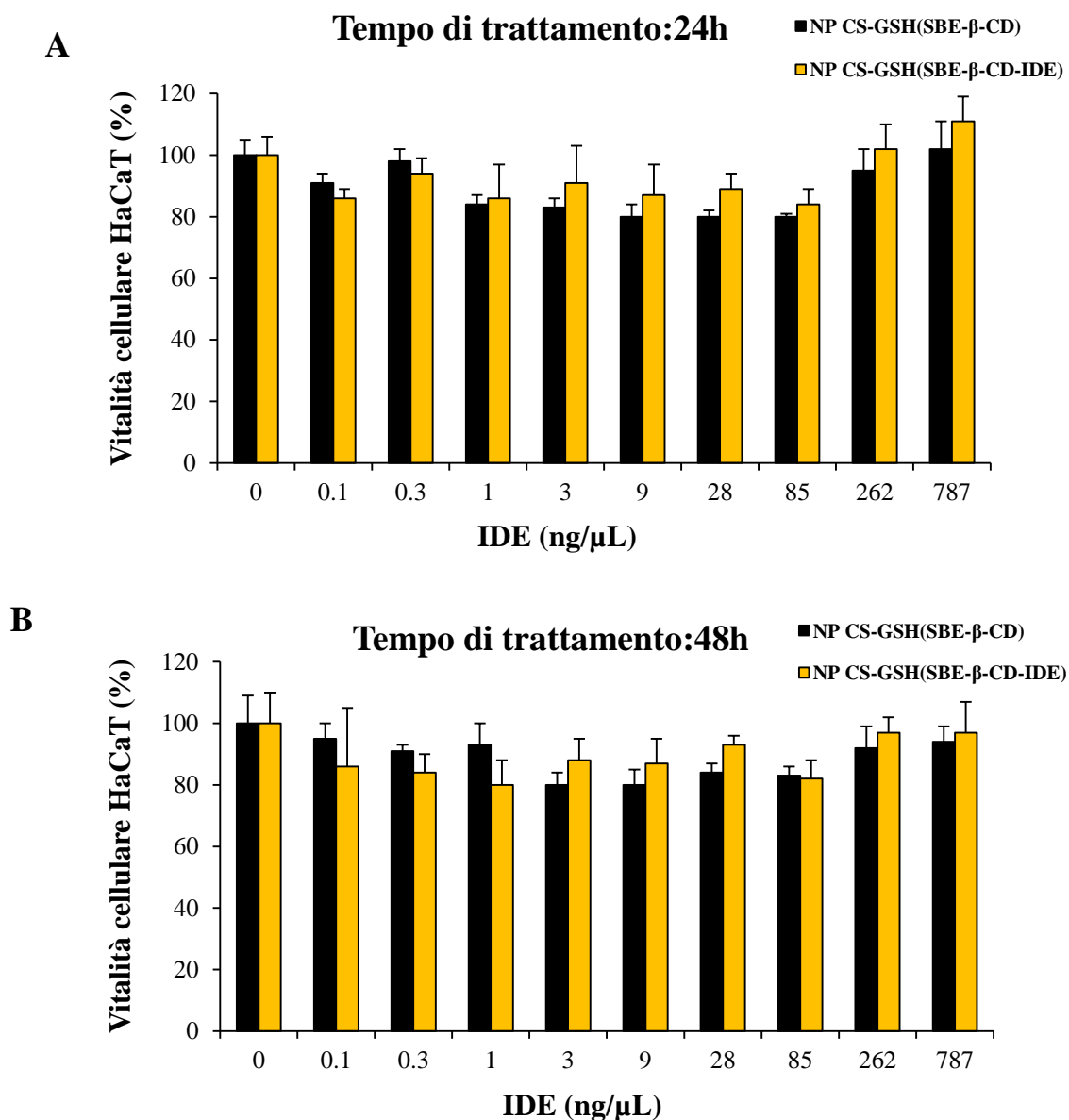


Fig. 22. Citotossicità in cellule HaCaT trattate con NPs CS-GSH/(SBE-β-CD) e NPs CS-GSH/(SBE-β-CD-IDE) nel range 0-787 ng/μL di IDE, dopo 24h (A) e 48h (B) di trattamento. La vitalità cellulare è espressa in % rispetto al controllo non trattato, ogni punto rappresenta la media ± SD (n=8) e ogni esperimento è stato eseguito in triplicato.

La linea cellulare NCTC 2544 è molto meno differenziata rispetto alle cellule HaCaT e per questo motivo più suscettibile ad insulti da parte di agenti irritanti [Scanarotti C. et al., 2013], inoltre dati di letteratura riportano concentrazioni efficaci e non tossiche di IDE nel range 0.025-2.5μM [Goldschmidt R. et al., 2013]. Da queste evidenze abbiamo testato la citotossicità delle NPs su cellule NCTC 2544 utilizzando concentrazioni di IDE nel range 0.0025-5.0 μM che corrisponde a 0.0008-1.6 ng/μL.

Il trattamento con le NPs non evidenzia citotossicità al di sotto della concentrazione di IDE di 0.8 ng/μL (2.5 μM) sia a 24 che a 48 h di trattamento (Figura 23 A-B).

I risultati riportati nella Figura 23 (A-B) relativi alle NPs che non contengono IDE (CS-GSH/SBE-β-CD) hanno lo stesso andamento di quelli relativi alle NPs caricate con IDE (CS-GSH/SBE-β-CD-IDE) dimostrando che la tossicità rilevata alla concentrazione più alta non è imputabile all'IDE.

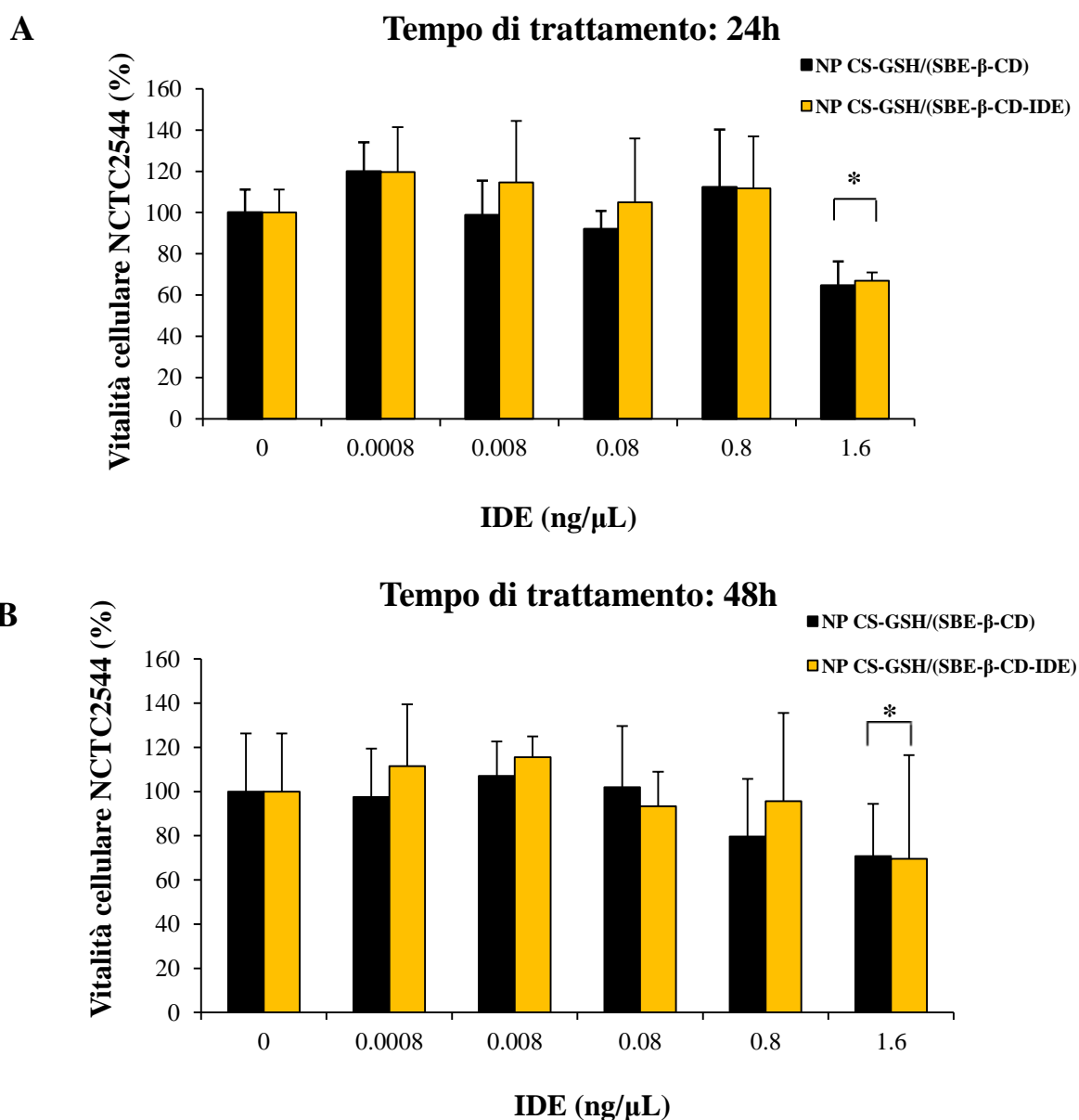


Fig. 23. Citotossicità su cellule NCTC 2544 trattate con NP CS-GSH/(SBE-β-CD) e NP CS-GSH/(SBE-β-CD-IDE) nel range 0-1.6 ng/μL di IDE, dopo 24h (A) e 48h (B) di trattamento. La vitalità cellulare è espressa in % rispetto al controllo non trattato, ogni punto rappresenta la media ± SD (n=8) e ogni esperimento è stato eseguito in triplicato. *p ≤ 0.05 rispetto al controllo non trattato.

Per meglio capire il perchè ad alte concentrazioni le NPs fossero tossiche in cellule poco differenziate come le NCTC 2544, abbiamo testato i componenti che costituiscono le NPs stesse e li abbiamo messi a confronto con le NPs complete. Di seguito viene indicato l'elenco dei componenti testati che costituiscono le NPs complete (Tabella 4).

Tab. 4. Componenti delle NPs.

Componenti	NP CS-GSH/SBE-β-CD	NP CS-GSH/(SBE-β-CD-IDE)
CS-GSH	+	+
SBE-β-CD-IDE	-	+

I risultati ottenuti su cellule NCTC 2544 trattate con il componente CS-GSH o con NPs CS-GSH/SBE- β -CD vuote (Figura 24 A-B) mostrano un effetto citotossico più evidente per il componente CS-GSH alle 24h (25-30%) rispetto alle 48h (30%) di trattamento. Da notare come solo alla concentrazione più alta (12 ng/ μ L) si ha significatività statistica rispetto al controllo non trattato per entrambi i tempi (* $p \leq 0.05$). Inoltre alle 24h di trattamento, il componente CS-GSH ha un effetto citotossico significativamente maggiore rispetto alle NPs CS-GSH/SBE- β -CD (GSH nel range 0.006-0.6 ng/ μ L) (\$\$ $p \leq 0.01$).

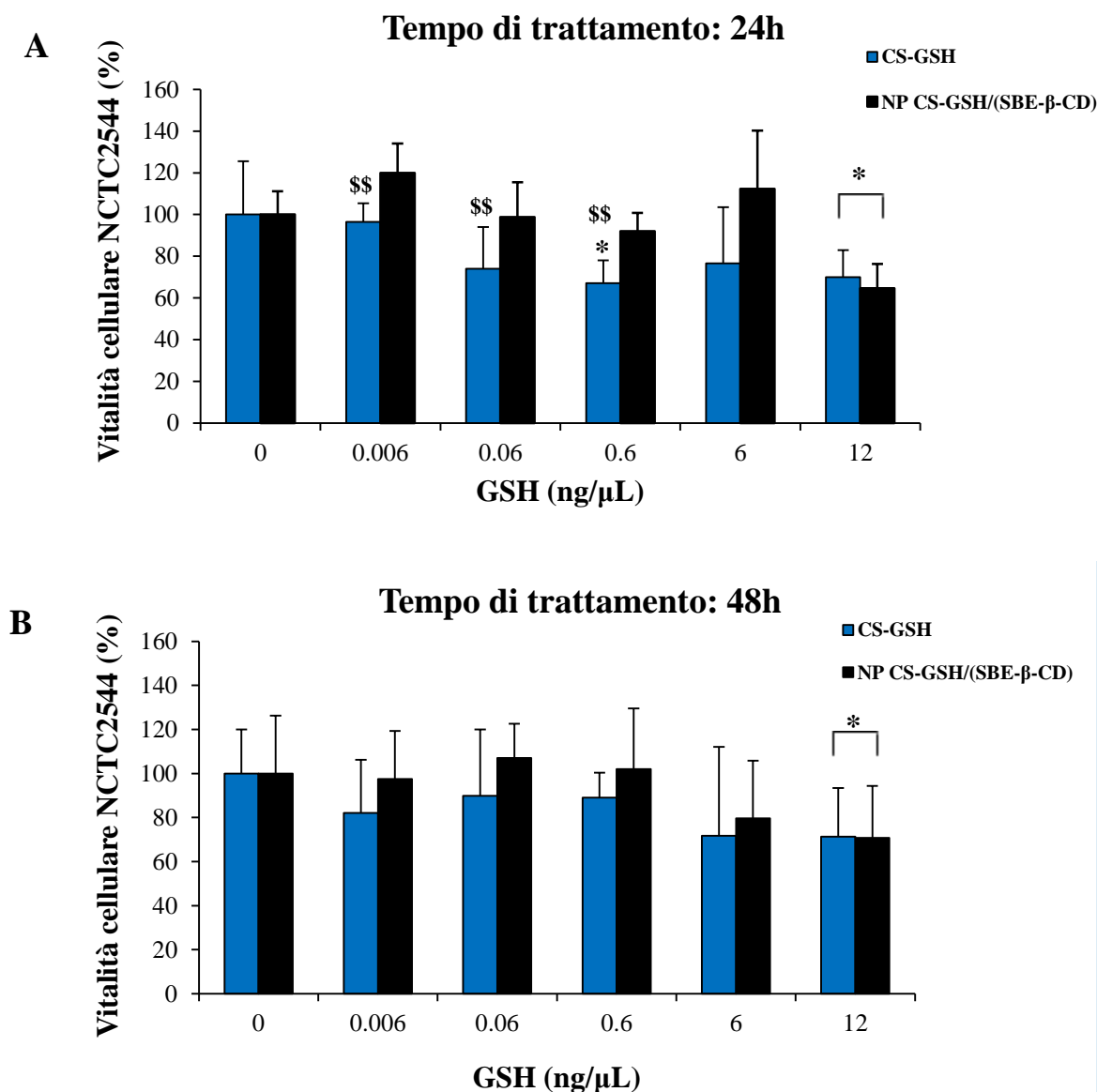


Fig. 24. Citotossicità su cellule NCTC 2544 trattate con CS-GSH e NP CS-GSH/(SBE-β-CD). Nei pannelli A e B, il confronto della vitalità cellulare (%) di campioni trattati per 24 e 48 h con CS-GSH e NP CS-GSH/SBE-β-CD. La vitalità cellulare è espressa in % rispetto al controllo non trattato, ogni punto rappresenta la media \pm SD ($n=8$) e ogni esperimento è stato eseguito in triplicato. * $p \leq 0.05$ rispetto al controllo non trattato. ** $p \leq 0.01$ rispetto alle NPs CS-GSH/(SBE-β-CD).

Dal confronto delle NPs CS-GSH/SBE-β-CD-IDE con i due componenti che le costituiscono (CS-GSH e SBE-β-CD-IDE) (Figura 25 A-B), si nota come i due componenti esplicano un effetto citotossico maggiore rispetto alle NPs, e ciò risulta più evidente alle 24h. In particolare la citotossicità del composto SBE-β-CD-IDE risulta significativa rispetto al controllo non trattato a quasi tutte le concentrazioni testate. Inoltre il trattamento con i due componenti CS-GSH e SBE-β-CD-IDE induce un effetto citotossico che è significativo rispetto al trattamento

con le NPs CS-GSH/SBE- β -CD-IDE alle concentrazioni più basse dopo 24 h (IDE nel range 0.0008-0.8 ng/ μ L) e 48 h (IDE alle concentrazioni 0.0008 e 0.008 ng/ μ L) (\$\$ $p \leq 0.01$).

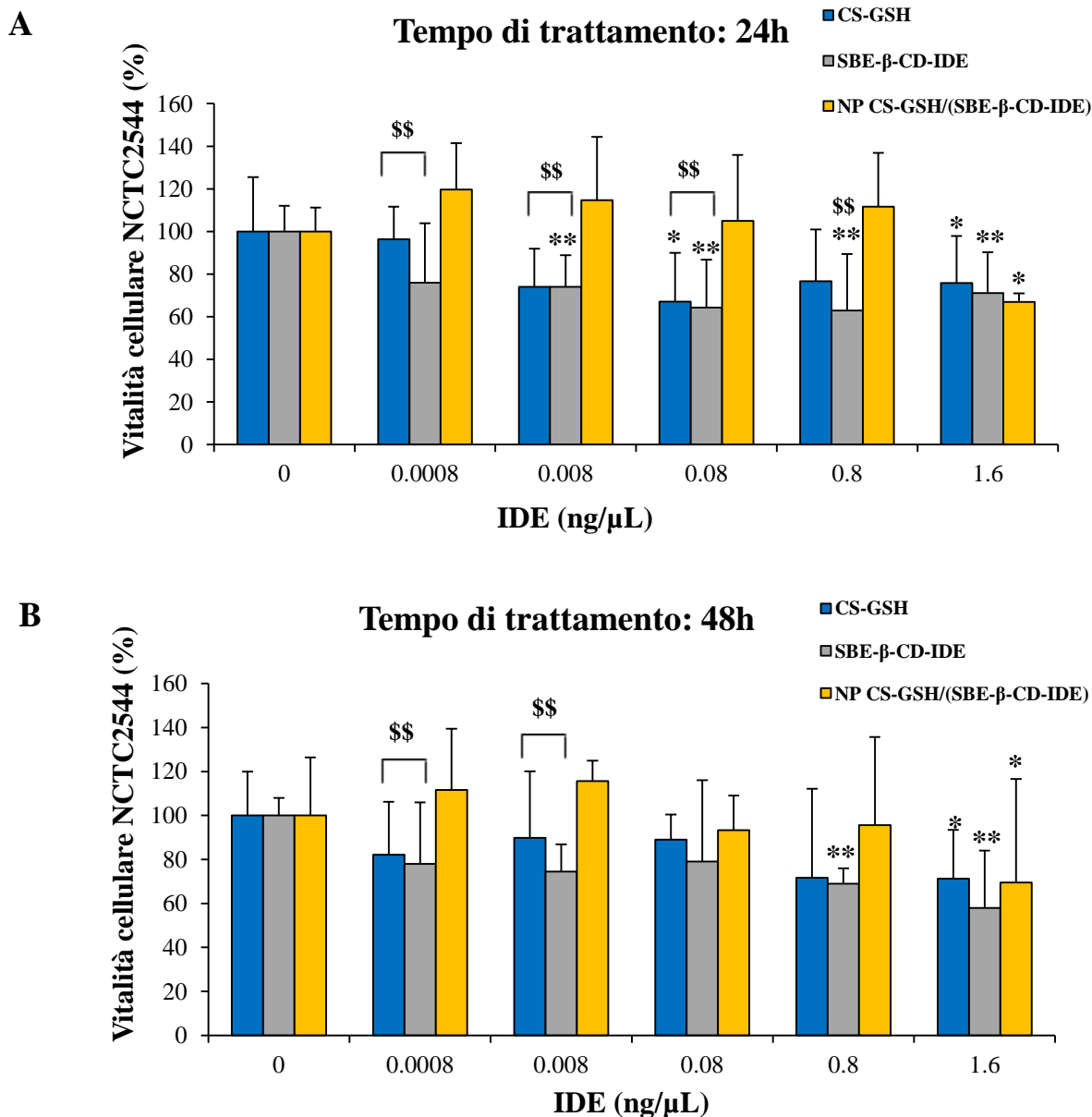


Fig. 25. Citotossicità su cellule NCTC 2544 trattate con SBE- β -CD-IDE e NP CS-GSH/SBE- β -CD-IDE. Nei pannelli A e B, il confronto della vitalità cellulare (%) di campioni trattati per 24 e 48 h con SBE- β -CD-IDE e NP CS-GSH/SBE- β -CD-IDE. La vitalità cellulare è espressa in % rispetto al controllo non trattato, ogni punto rappresenta la media \pm SD ($n=8$) e ogni esperimento è stato eseguito in triplicato. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ rispetto al controllo non trattato. \$\$ $p \leq 0.01$ rispetto alle NPs CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE).

4.3.2. Attività antiossidante delle NPs in cheratinociti umani

L'attività antiossidante delle NPs è stata valutata su entrambe linee cellulari, utilizzando la tecnica citofluorimetrica con DCFH-DA.

Per una corretta analisi dei dati è stata effettuata una lettura citofluorimetrica delle cellule trattate con le NPs prive di IDE o contenenti IDE nel range 0.008-0.8 ng/ μ L, la lettura di questi campioni non ha mostrato alcun segnale di autofluorescenza dovuto alla presenza dei composti (risultati non mostrati).

Per valutare l'azione antiossidante delle NPs nelle due linee cellulari di cheratinociti umani abbiamo utilizzato diversi induttori di stress ossidativo per individuare quale fosse in grado di indurre modificazioni riproducibili in una buona percentuale di cellule senza comprometterne la vitalità.

Tra i vari induttori di stress abbiamo testato il composto tBOOH (terz-butyl-idroperossido) ad una concentrazione di 300 μ M per 30 minuti, ma i risultati ottenuti sono stati scarsamente riproducibili (dati non mostrati), abbiamo pertanto deciso di testare come induttore di stress ossidativo il perossido di idrogeno (H_2O_2). La letteratura riporta concentrazioni molto diverse (100-800 μ M) [Xiao-yan et al., 2010; G. Park et al., 2012; Vitale N. et al., 2013], per questo motivo abbiamo testato diverse concentrazioni di H_2O_2 per un tempo di esposizione di 30 minuti, in modo da poter individuare la concentrazione ottimale (Tabella 5). I risultati hanno mostrato che concentrazioni crescenti di H_2O_2 producono in cellule NCTC 2544 un livello di stress ossidativo crescente. Dai dati ottenuti abbiamo scelto la concentrazione di H_2O_2 400 μ M, che induce stress ossidativo riproducibile del 40 % in cellule NCTC 2544, queste saranno indicate come CTR+ (Figura 26).

Tab. 5. ROS intracellulari in cellule NCTC 2544 trattate con H₂O₂.

H ₂ O ₂ (μM)	ROS intracellulari (%) ± SD
0	1.6±0.6
200	29±1.1
400	42±2.3
600	59±4.6

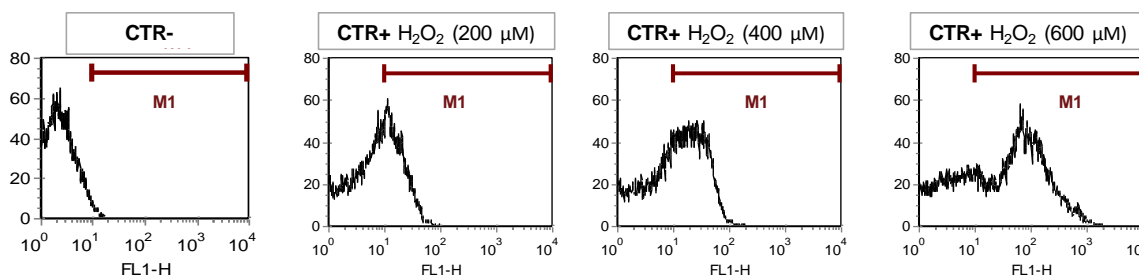


Fig 26. Produzione di ROS in cellule NCTC2544. Cellule di controllo non trattate (CTR-), cellule trattate con diverse concentrazioni di H₂O₂ (range 200-600 μM) per 30 min. e poi incubate con DCFDH-DA (0.5 μM) per 10 min. La fluorescenza verde (FL1) è stata valutata utilizzando un citofluorimetro FACScan. I risultati sono stati analizzati mediante il software CellQuest. Sull'asse x è riportata l'intensità di fluorescenza, sull'asse y è indicato il numero di eventi. I dati riportati sono rappresentativi di almeno tre esperimenti differenti.

Questi stessi esperimenti sono stati condotti anche su cellule HaCaT che purtroppo mal rispondevano alle nostre esigenze sperimentali a causa della loro lenta crescita, del loro scarso distacco dalla piastra con tripsina, ciò si ripercuoteva in una non omogenea popolazione cellulare rendendo i dati sperimentali scarsamente riproducibili. Per queste motivazioni abbiamo deciso di continuare i nostri studi solo sulla linea cellulare NCTC 2544.

L'attività antiossidante in cellule NCTC 2544 delle NPs o dei loro componenti è riassunta in Tabella 6 e mostrata in Figura 27. I campioni trattati con entrambe NPs (IDE nel range 0.008-0.8 ng/μL), e stressati con H₂O₂, mostrano una riduzione del contenuto di ROS intracellulare rispetto ai campioni di controllo positivo (CTR+). La produzione intracellulare di ROS risulta significativamente ridotta ($p \leq 0.05$) solo nelle cellule pretrattate con la concentrazione più alta di NPs contenenti IDE (0.8 ng/μL).

In Figura 28 sono riportati a titolo dimostrativo gli istogrammi ottenuti mediante citofluorimetria.

	GSH (ng/ μ L)	IDE (ng/ μ L)	ROS prodotti (%)
CTR- (nessun trattamento)	-	-	6 \pm 4
CTR+ (trattamento con H₂O₂)	-	-	100 \pm 33
NP CS-GSH/(SBE-β-CD)	0.06	-	77 \pm 13
	0.6	-	86 \pm 7
	6	-	84 \pm 17
NP CS-GSH/(SBE-β-CD-IDE)	0.06	0.008	74 \pm 27
	0.6	0.08	64 \pm 25
	6	0.8	49 \pm 25 *
IDE libero	-	0.008	84 \pm 6
	-	0.08	86 \pm 21
	-	0.8	83 \pm 3

Tab. 6. Produzione di ROS in cellule NCTC 2544. ROS prodotti (%) indica i ROS intracellulari espressi come % del CTR+. CTR- indica la produzione basale di ROS, CTR+ indica la produzione di ROS in cellule trattate solo con H₂O₂. Ogni punto rappresenta la media \pm SD (n=3). *p \leq 0.05 rispetto CTR+.

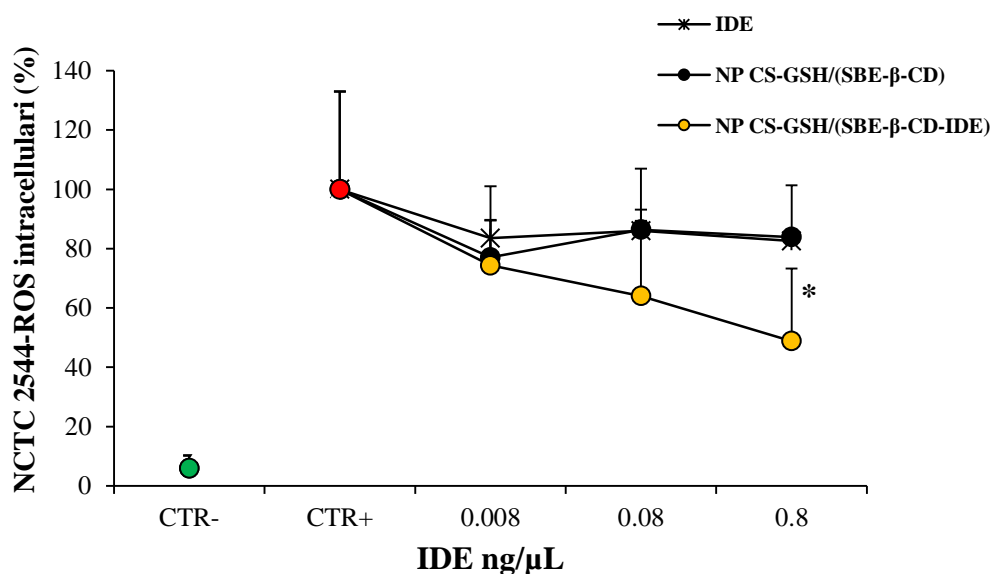


Fig. 27. Produzione di ROS intracellulari in cellule NCTC 2544. CTR- indica le cellule non trattate (pallino verde); CTR+ indica le cellule trattate solo con H₂O₂ (pallino rosso). Cellule pretrattate con diverse concentrazioni di NP CS-GSH/(SBE- β -CD) (pallini neri), NP CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE) (pallini gialli) o con IDE libero (X) e stressate con H₂O₂ (400 μ M). Ogni punto rappresenta la media \pm SD (n=3). *p \leq 0.05 rispetto CTR+.

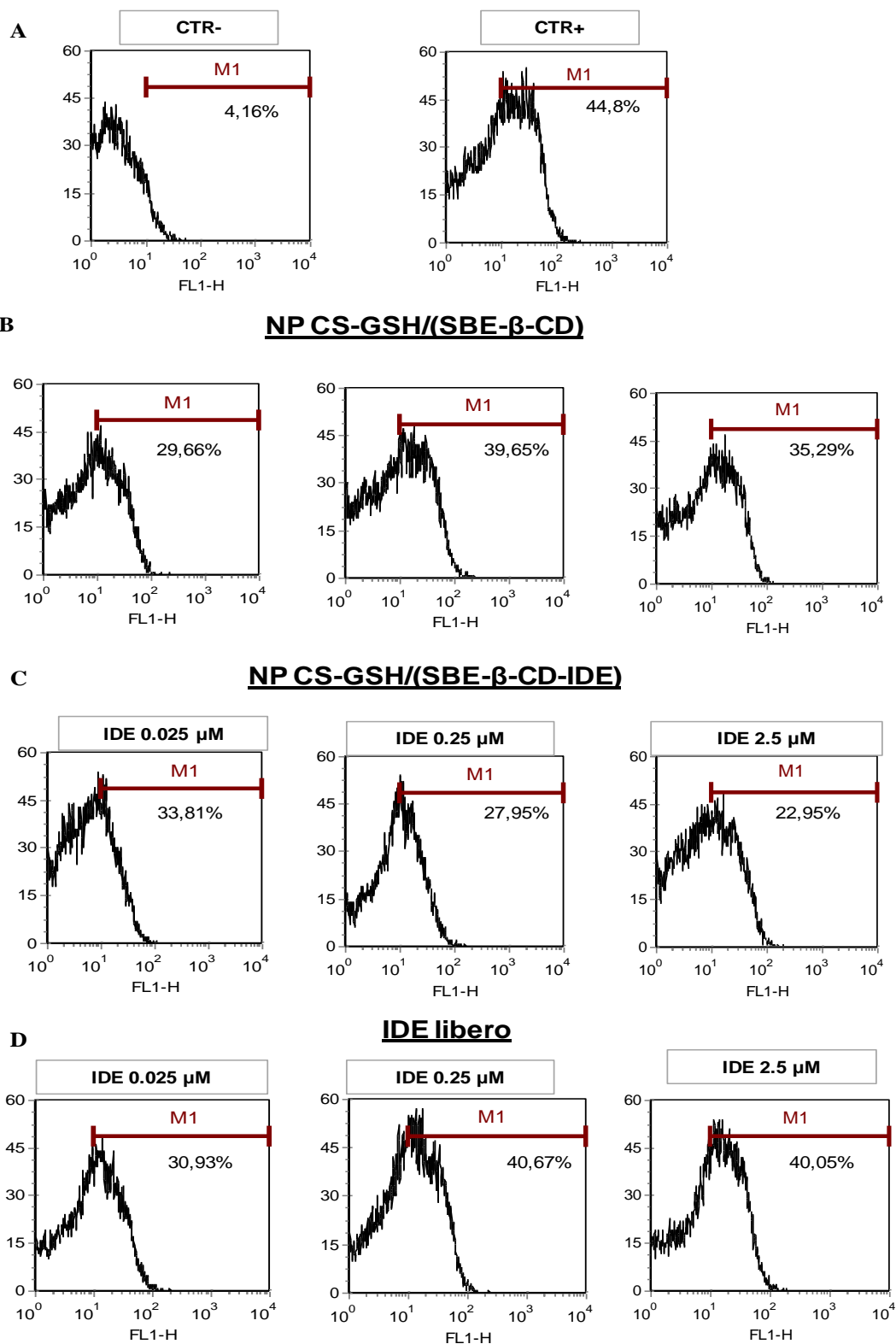


Fig 28. Produzione di ROS in cellule NCTC 2544. Pannello A: cellule non trattate (CTR-); cellule trattate solo con H_2O_2 (CTR+). Pannello B: cellule pretrattate con NPs CS-GSH/(SBE-β-CD) non contenente IDE alle stesse diluizioni delle successive. Pannello C: cellule pretrattate con NPs CS-GSH/(SBE-β-CD-IDE) a diverse concentrazioni (0.025, 0.25, 2.5 μM). Pannello D: cellule pretrattate con IDE libero (0.025, 0.25, 2.5 μM). La fluorescenza verde (FL1) è stata valutata utilizzando un citofluorimetro FACScan. I risultati sono stati analizzati mediante il software CellQuest. Sull'asse x è riportata l'intensità di fluorescenza, sull'asse y è indicato il numero di eventi.

4.3.3. Valutazione del danno mitocondriale in cellule NCTC 2544

La valutazione del danno mitocondriale indotto da CCCP in cellule NCTC 2544 pretrattate per 18 h con le NPs o con IDE libero a diverse concentrazioni (0.008-0.8 ng/ μ L), è stata eseguita mediante tecnica citofluorimetrica che utilizza il colorante JC-1 (vedi M&M). I risultati ottenuti in cellule NCTC 2544 (Tabella 7, Figura 29) mostrano che il pretrattamento con le NPs determina una riduzione del danno mitocondriale indotto da CCCP (50 μ M) rispetto a cellule di controllo non pretrattate (CTR+). Inoltre, le NPs contenenti IDE inducono un'azione protettiva significativa ($p \leq 0.01$) rispetto alle cellule trattate con IDE libero alle concentrazioni più alte.

In Figura 30 sono riportate le immagini ottenute dalla lettura dei camponi mediante citofluorimetria, i dati riportati sono rappresentativi di tre esperimenti differenti.

	GSH (ng/ μ L)	IDE (ng/ μ L)	Danno mitocondriale (%)
CTR- (nessun trattamento)	-	-	27 \pm 18
CTR+ (trattamento con CCCP)	-	-	100 \pm 19
NP CS-GSH/(SBE-β-CD)	0.06	-	58 \pm 29
	0.6	-	90 \pm 51
	6	-	73 \pm 29
NP CS-GSH/(SBE-β-CD-IDE)	0.06	0.008	66 \pm 31
	0.6	0.08	60 \pm 43
	6	0.8	80 \pm 21
IDE libero	-	0.008	96 \pm 3
	-	0.08	135 \pm 8 \$\$
	-	0.8	137 \pm 9 \$\$

Tab. 7. Danno mitocondriale in cellule NCTC 2544. Il danno mitocondriale è stato valutato dalla percentuale di cellule positive alla fluorescenza verde (FL1-FITC+) emessa dalla forma monomeric del JC-1 in cellule apoptotiche e o necrotiche. Cellule non trattate CTR-; cellule trattate con CCCP CTR+. Ogni punto rappresenta la media \pm SD (n=3). * $p \leq 0.05$ rispetto CTR+. \$\$ $p \leq 0.01$ rispetto alle NPs CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE).

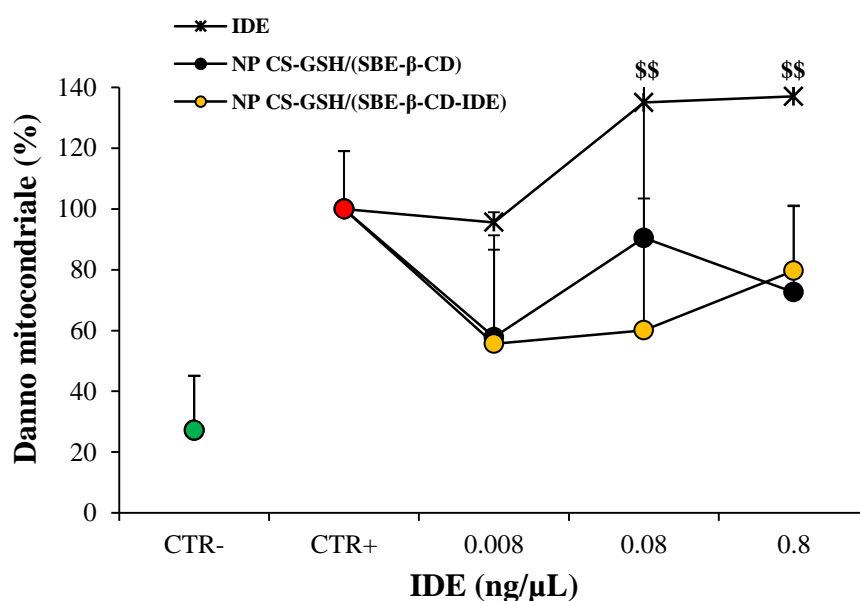


Fig. 29. Danno mitocondriale in cellule NCTC 2544. CTR- cellule non trattate (pallino verde); CTR+ cellule trattate con CCCP (pallino rosso). Cellule pretrattate con diverse concentrazioni di NP CS-GSH/(SBE- β -CD) (pallini neri), NP CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE) (pallini gialli) o con IDE libero (X). Ogni punto rappresenta la media \pm SD (n=3). \$\$ $p \leq 0.01$ rispetto alle NPs CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE).

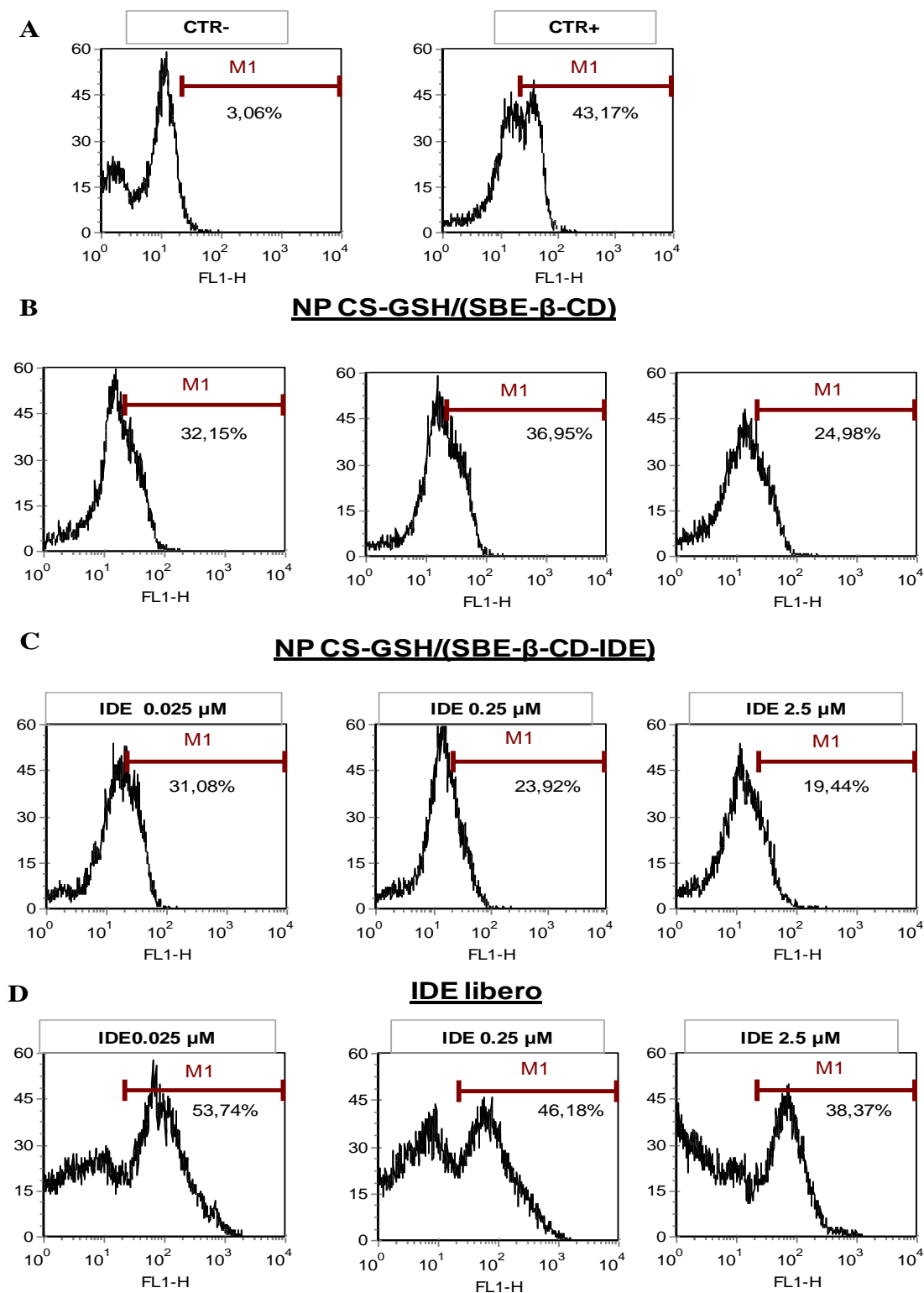


Fig. 30. Danno mitocondriale in cellule NCTC 2544 mediante citofluorimetria. Pannello A: cellule non trattate (CTR-); cellule trattate con CCCP (CTR+). Pannello B: cellule pretrattate con NPs CS-GSH/(SBE-β-CD) non contenente IDE alle stesse diluizioni delle successive. Pannello C: cellule pretrattate con NPs CS-GSH/(SBE-β-CD-IDE) a diverse concentrazioni (0.025, 0.25, 2.5 μM). Pannello D: cellule pretrattate con IDE libero (0.025, 0.25, 2.5 μM). La fluorescenza verde (FL1) è stata valutata utilizzando un citofluorimetro FACScan. I risultati sono stati analizzati mediante il software CellQuest. Sull'asse x è riportata l'intensità di fluorescenza, sull'asse y è indicato il numero di eventi.

4.3.4. Valutazione del contenuto tiolico in cellule NCTC 2544

Per dosare i tioli intracellulari in cellule NCTC 2544 pretrattate per 18 h con le NPs o con IDE libero in DMSO, è stato utilizzato il saggio di Ellman come descritto in M&M. Per una corretta analisi dei dati è stato eseguito il dosaggio tiolico anche su aliquote di NPs in assenza di cellule, per quantizzare il contributo delle sole NPs, che contengono GSH, nel saggio. Il contenuto tiolico delle NPs non risultava dosabile con il metodo prescelto. In questo esperimento abbiamo voluto vedere se il pretrattamento con NPs o IDE libero fosse in grado di preservare il contenuto tiolico dalla deplezione indotta da H₂O₂.

I risultati ottenuti in cellule NCTC 2544 (Tabella 8, Figura 31) mostrano come il pretrattamento con NPs contenenti IDE nel range 0.008-0.8 ng/μL (NP CS-GSH/SBE-β-CD-IDE) preservi il contenuto tiolico intracellulare mantenendolo ai valori basali (CTR-) anche a seguito di trattamento con H₂O₂. In particolare, tale dato risulta significativo rispetto alle cellule non trattate (CTR+) ($p \leq 0.05$) a tutte le concentrazioni utilizzate. Da notare anche come le NPs non contenenti IDE o l'IDE in forma libera non sono in grado di preservare le cellule dalla deplezione tiolica indotta, che è significativa rispetto alle cellule trattate con NP CS-GSH/SBE-β-CD-IDE alle concentrazioni più alte ($p \leq 0.05$).

	GSH (ng/ μ L)	IDE (ng/ μ L)	Tioli (%)
CTR- (nessun trattamento)	-	-	181 \pm 13
CTR+ (trattamento con H₂O₂)	-	-	100 \pm 60
NP CS-GSH/(SBE-β-CD)	0.06	-	150 \pm 50
	0.6	-	111 \pm 10 \$
	6	-	137 \pm 31 \$
NP CS-GSH/(SBE-β-CD-IDE)	0.06	0.008	169 \pm 54 *
	0.6	0.08	195 \pm 58 *
	6	0.8	238 \pm 77 *
IDE libero	-	0.008	113 \pm 20
	-	0.08	141 \pm 48
	-	0.8	130 \pm 39 \$

Tab. 8. Contenuto tiolico in cellule NCTC 2544. Contenuto tiolico basale in cellule non trattate CTR-, contenuto tiolico in cellule trattate solo con H₂O₂ CTR+. Tioli (%) indica il contenuto tiolico intracellulare espresso come percentuale rispetto al CTR+. Ogni punto rappresenta la media \pm SD (n=3). *p \leq 0.05 rispetto CTR+. \$ p \leq 0.05 rispetto alle NPs CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE).

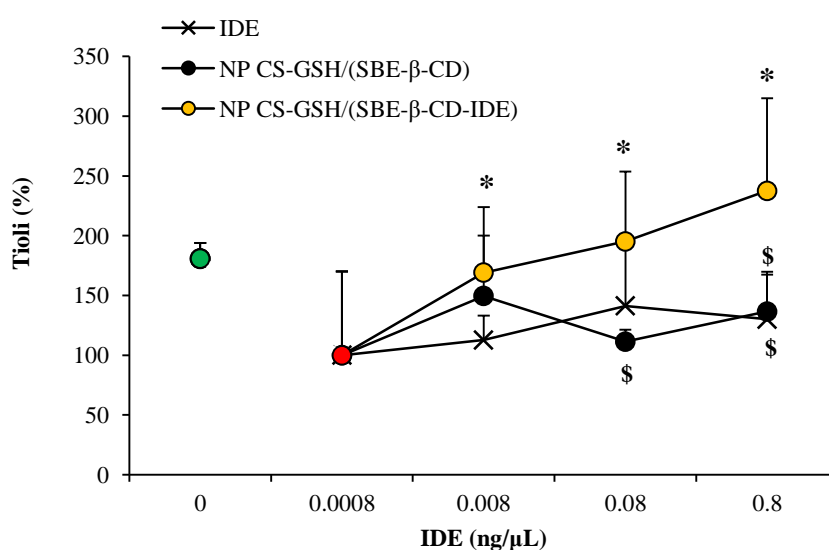


Fig. 31. Contenuto tiolico in cellule NCTC 2544. CTR- cellule non trattate (pallino verde), CTR+ cellule trattate solo con H₂O₂ (pallino rosso). Cellule pretrattate con NP CS-GSH/(SBE- β -CD) (pallini neri), NP CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE) (pallini gialli) o con IDE libero (X) e stressate con H₂O₂. Tioli (%) indica il contenuto tiolico intracellulare espresso come percentuale rispetto al CTR+. Ogni punto rappresenta la media \pm SD (n=3). *p \leq 0.05 rispetto CTR+. \$ p \leq 0.05 rispetto alle NPs CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE).

4.4. Criticità del progetto sperimentale

I risultati discussi finora mostrano che le NPs caricate con IDE si prestano perfettamente ad essere utilizzate come trasportatori per molecole lipofile in ambiente acquoso. Questo sistema *carrier* è in grado di preservare l'azione antiossidante dell'idebenone in cellule cheratinocitiche umane. Avremmo potuto fare molti altri progressi nello studio e caratterizzazione di questi sistemi nanoparticellari se le NPs preparate presso l'Università degli Studi di Bari non avessero mostrato delle caratteristiche chimico-fisiche e morfologiche non riproducibili tra una preparazione e l'altra.

Per poter svolgere un adeguato numero di ripetizioni sperimentali per ogni saggio biologico è stato necessario sintetizzare le NPs in scala maggiore. Purtroppo però il metodo di preparazione utilizzato non è stato in grado di produrre nel tempo NPs con caratteristiche analoghe alle NPs prodotte in scala minore, con le quali abbiamo svolto tutta la sperimentazione riportata in questa tesi, e che indicheremo come le NPs provenienti dalla Spedizione I.

Le preparazioni successive alla prima non hanno confermato l'attività antiossidante delle NPs della Spedizione I. Di seguito sono riportati i risultati relativi l'attività antiossidante in cellule NCTC 2544 di alcune delle NPs che sono state preparate a seguito dello *scale-up* di produzione, esse verranno indicate con il numero della spedizione corrispondente ad una preparazione differente (Spedizione II-V) (Figura 32).

I risultati dell'attività antiossidante delle NPs in cellule NCTC 2544 mostrano che solo nella spedizione I si ottengono dei dati significativi (già discussi in precedenza), mentre nelle altre quattro spedizioni le NPs caricate con IDE non sono in grado di proteggere le cellule NCTC 2544 dal danno indotto da H₂O₂.

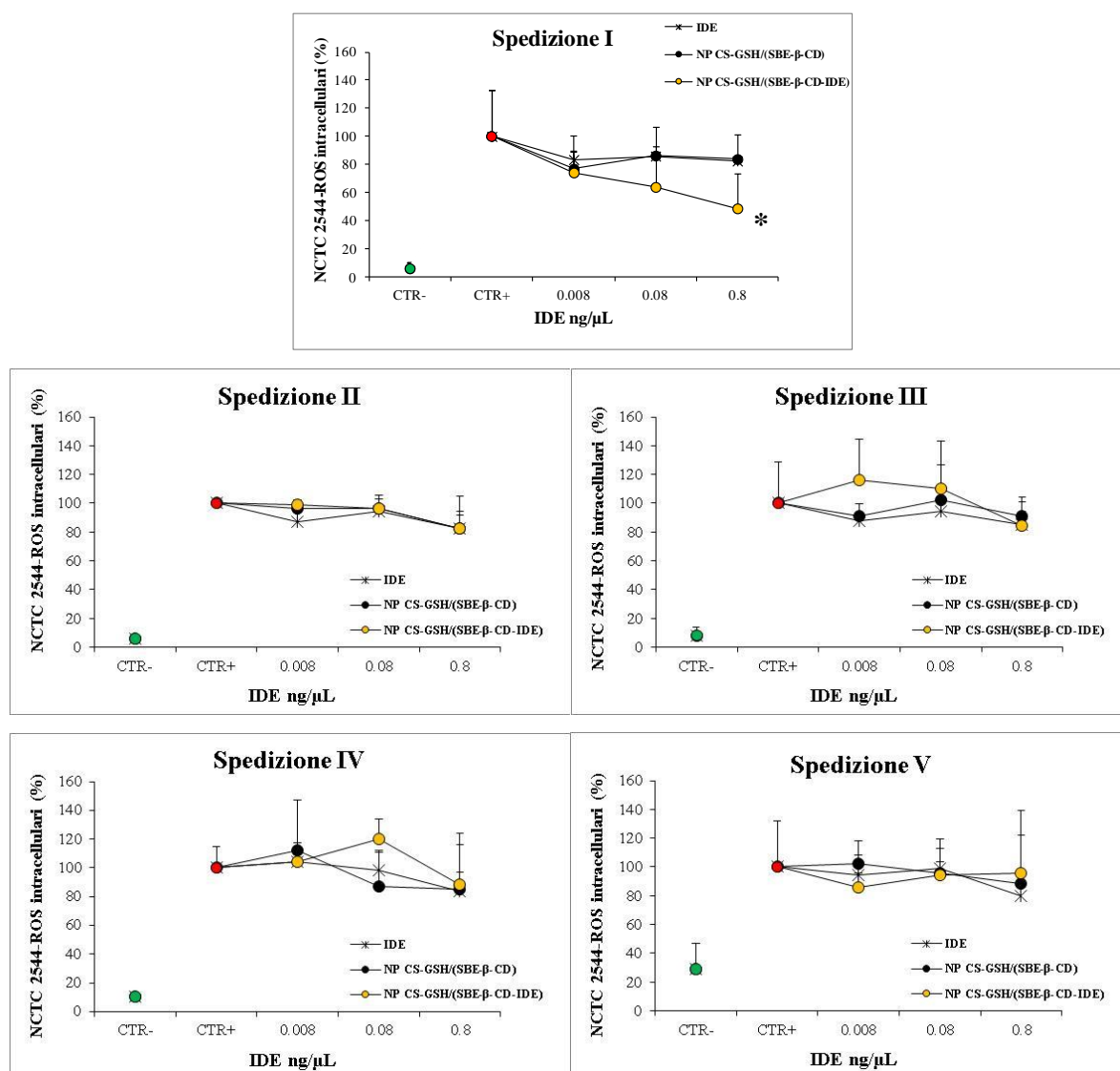


Fig. 32. Produzione di ROS intracellulari in cellule NCTC2544. Confronto dell'attività antiossidante di NPs CS-GSH/SBE-β-CD-IDE e CS-GSH/SBE-β-CD provenienti da cinque diverse spedizioni come indicato dalla nomenclatura (Spedizione I-V). Le NPs della Spedizione I sono le uniche prodotte in scala minore. CTR- indica le cellule non trattate (pallino verde); CTR+ indica le cellule trattate solo con H₂O₂ (pallino rosso). Cellule pretrattate con diverse concentrazioni di NP CS-GSH/(SBE-β-CD) (pallini neri), NP CS-GSH/(SBE-β-CD-IDE) (pallini gialli) o con IDE libero (indicatore a croce) e stressate con H₂O₂ (400 μM). Ogni punto rappresenta la media ± SD (n=3). *p ≤ 0.05 rispetto CTR+.

Analogamente anche la protezione mitocondriale non è stata confermata come mostrato in Figura 33.

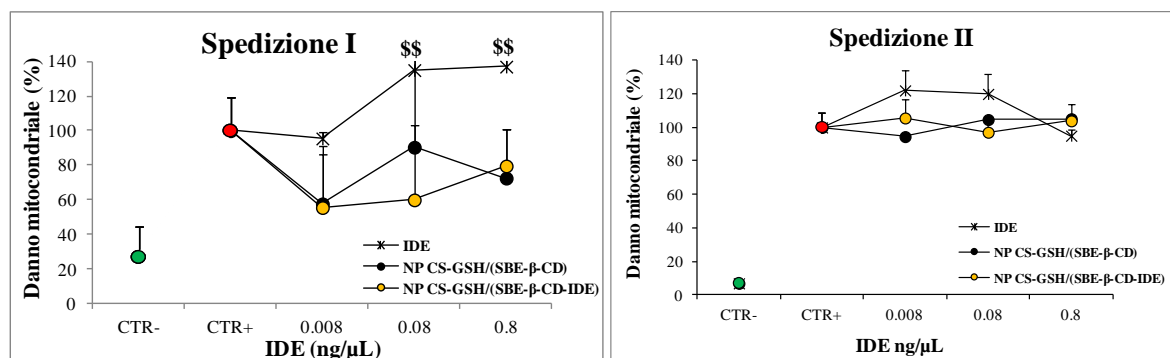


Fig. 33. Danno mitocondriale in cellule NCTC 2544 pretrattate con NPs e poi trattate con CCCP. Confronto del danno mitocondriale in cellule NCTC 2544 pretrattate con NPs CS-GSH/SBE-β-CD-IDE e CS-GSH/SBE-β-CD provenienti da due diverse spedizioni come indicato dalla nomenclatura (Spedizione I-II). Le NPs della Spedizione II sono state prodotte in scala maggiore. CTR- indica le cellule non trattate (pallino verde); CTR+ indica le cellule trattate solo con CCCP (pallino rosso). Cellule pretrattate con diverse concentrazioni di NP CS-GSH/(SBE-β-CD) (pallini neri), NP CS-GSH/(SBE-β-CD-IDE) (pallini gialli) o con IDE libero (indicatore a croce) e trattate con CCCP. Ogni punto rappresenta la media ± SD (n=3). *p ≤ 0.05 rispetto CTR+. \$\$ p ≤ 0.01 rispetto alle NPs CS-GSH/(SBE-β-CD-IDE).

Vista la mancanza di riproducibilità nei dati biologici ottenuti con le spedizioni II-V abbiamo utilizzato l'analisi AFM per la valutazione dimensionale delle varie NPs. Di seguito sono riportate le caratteristiche dimensionali, riferite alle aree (nm²), di tutte le NPs etichettate con il numero di spedizione corrispondente (I-V).

Sono state confrontate le aree AFM delle NPs caricate con IDE (CS-GSH/SBE-β-CD-IDE) con le aree delle NPs vuote (CS-GSH/SBE-β-CD).

I risultati mostrano che le NPs sono caratterizzate da popolazioni nanoparticellari con dimensioni differenti, per rendere i dati confrontabili abbiamo suddiviso le dimensioni delle NPs in classi di frequenza. Le classi che abbiamo scelto sono rappresentate da tre range diversi (<10 ; 10-100; >100 nm²).

I risultati ottenuti mostrano che le dimensioni delle NPs della Spedizione I prodotti in scala minore, utilizzate per i test biologici precedentemente discussi, sono notevolmente diverse rispetto alle dimensioni delle NPs di tutte le altre spedizioni ottenute a seguito dello *scale-up* di produzione (Tabella 9, Figura 34).

Se prendiamo come riferimento la Spedizione I si nota che le NPs CS-GSH/SBE-β-CD hanno per il 66% un'area distribuita all'interno della classe di frequenza 10-100 nm², mentre le NPs

CS-GSH/SBE- β -CD-IDE rientrano per il 99% nella classe di frequenza inferiore a 10 nm^2 . Questo risultato correla con le dimensioni ottenute mediante PCS e riportate in tabella 2. Il diametro delle NPs CS-GSH/SBE- β -CD-IDE (375 nm) risulta infatti notevolmente inferiore a quello delle NPs CS-GSH/SBE- β -CD non contenenti IDE (875 nm). Si noti come le NPs della Spedizione II mostrano delle dimensioni che sono completamente opposte alle NPs della Spedizione I, le NPs CS-GSH/SBE- β -CD hanno per il 97% un'area distribuita all'interno della classe di frequenza $< 10 \text{ nm}^2$ rispetto alle NPs CS-GSH/SBE- β -CD-IDE in cui circa il 50% della popolazione particellare ha un'area compresa nel range $10\text{-}100 \text{ nm}^2$. Una situazione analoga è stata riscontrata anche nelle NPs delle spedizioni successive.

Area (nm^2)	NPs CS-GSH/SBE- β -CD (frequenza %)			NPs CS-GSH/SBE- β -CD-IDE (frequenza %)		
	<10	10-100	>100	<10	10-100	>100
Spedizione I	24	66	10	95	4	1
Spedizione II	97	3	0	40	55	5
Spedizione III	99	1	0	15	66	19
Spedizione IV	97	3	0	73	27	0
Spedizione V	92	7	1	59	40	1

Tab. 9. Analisi AFM delle NPs. Confronto delle dimensioni particellari di NPs CS-GSH/SBE- β -CD-IDE e CS-GSH/SBE- β -CD provenienti da cinque diverse spedizioni come indicato dalla nomenclatura (Spedizione I-V). Solo le NPs della Spedizione I sono state prodotte in scala minore. Le NPs hanno dimensioni (area espressa in nm^2) distribuite in tre range (<10 ; $10\text{-}100$; $>100 \text{ nm}^2$), per ogni range è indicata la frequenza (%).

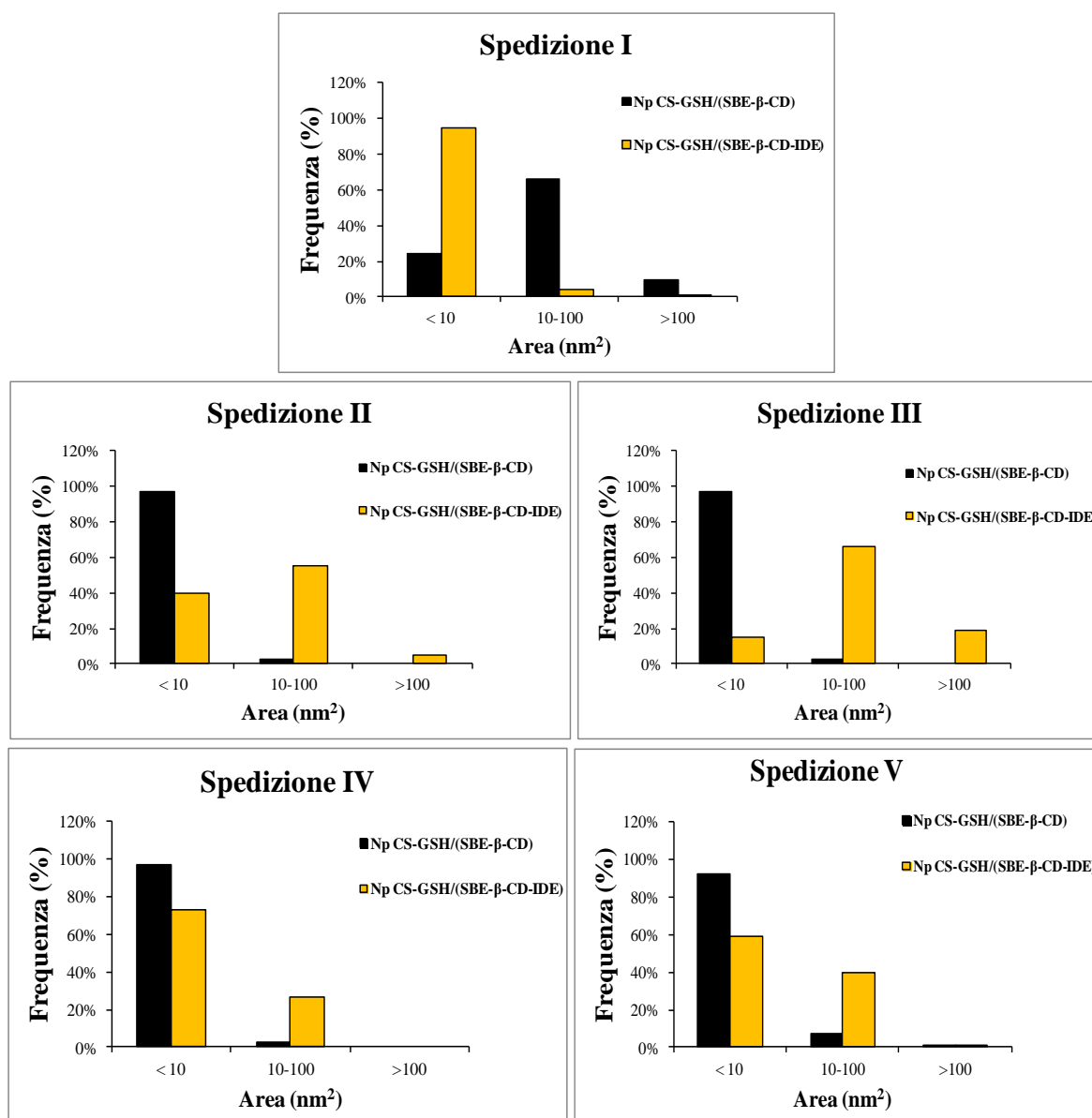


Fig. 34. Analisi AFM delle NPs. Confronto delle dimensioni particellari di NPs CS-GSH/SBE-β-CD-IDE e CS-GSH/SBE-β-CD provenienti da cinque diverse spedizioni come indicato dalla nomenclatura (Spedizione I-V). L'asse x indica l'area (nm²) delle NPs; l'asse y indica la frequenza (%).

La mancanza di attività antiossidante delle NPs contenenti IDE delle preparazioni II-V potrebbe essere quindi attribuita alle maggiori dimensioni delle NPs che potrebbero non consentirne l'ingresso a livello cellulare, impedendo quindi all'IDE in esse contenute di esercitare la sua azione protettiva nei confronti dei radicali liberi sviluppati a seguito dello stress ossidativo indotto con le diverse metodologie prese in considerazione nell'ambito di questa tesi.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

I NMs, sviluppati attraverso le nanotecnologie per uso biomedicale, rappresentano oggi un campo di ricerca interdisciplinare di notevole interesse, in quanto hanno consentito di poter lavorare nella stessa scala dimensionale di molecole organiche, processi biologici e meccanismi cellulari; per questa ragione, la medicina ha guardato alle nanotecnologie come una possibile soluzione per la diagnosi e il trattamento di molte patologie [Morigi V. et al., 2012]. L'aspetto che più affascina gli scienziati è che grazie alla loro nanodimensione i NMs potrebbero essere in grado di attraversare le barriere biologiche, penetrare le membrane plasmatiche, nucleari e mitocondriali, e proprio per questo motivo sono altamente ricercati per le possibili applicazioni in campo biomedicale, come strumenti per la somministrazione mirata di farmaci (*drug-delivery*), la terapia oncologica, le tecniche di *imaging* o come sensori biologici [Schnackenberg L.K., 2012].

Diversi autori hanno suggerito che la supplementazione topica con antiossidanti potrebbe essere utile per ridurre i danni cutanei indotti dai ROS coadiuvando le difese antiossidanti della pelle [Bogdan Allemann et al. 2008; Dreher et al. 2001]. A tal proposito, negli ultimi decenni, sono stati studiati diversi vettori colloidali in grado di migliorare l'assorbimento di un farmaco in maniera sito-specifica, denominati *enhancers* di penetrazione cutanea [Williams A.C. and Barry B.W., 2004]. Attraverso l'utilizzo di questi vettori si è cercato di superare i problemi legati alla scarsa penetrazione nella pelle per la presenza dello strato corneo che funge fisiologicamente da barriera protettiva [Chen, et al. 2013; Hadgraft, 2004], e per far fronte a tutta una serie di effetti collaterali legate all'assorbimento sistemico [Williams AC et al., 2003; Choi MJ et al. 2005].

Questo progetto sperimentale propone perciò l'utilizzo di vettori nanoparticellari, costituiti da chitosano e ciclodestrine modificate (CS-SBE- β -CD), ideati con lo scopo di favorire il *drug-delivery* di un antiossidante idrofobico come l'IDE. In particolare, questi *nanocarriers* sono stati progettati con lo scopo di fornire una strategia per migliorare il *delivey* di molecole idrofobiche con azione antiossidante come l'IDE, e nello stesso tempo agire da *enhancers* di penetrazione cellulare, ovvero da vettori in grado di favorire l'assorbimento cutaneo in maniera sito-specifica [Williams A.C. and Barry B.W., 2004].

Le NPs, oggetto di studio di questa tesi, sono state preparate e caratterizzate in collaborazione con l'Università di Bari e l'Università di Catania, esse sono composte da GSH legato covalentemente al chitosano e ciclodestrine modificate (NP CS-GSH/SBE- β -CD) e le stesse caricate con IDE (NP CS-GSH/SBE- β -CD-IDE).

Dalla caratterizzazione chimico-fisica eseguita mediante PCS, anemometria e TEM, le NPs caricate con IDE hanno: un pH intorno a 5 che assicura una buona tollerabilità cutanea, una popolazione particellare discretamente omogenea (PI), valori di potenziale zeta positivi dovuti alla presenza di polimerizzazioni polisaccaridici di chitosano che costituiscono lo *shell* delle NPs, nonché delle dimensioni (confermate anche dall'analisi AFM) notevolmente ridotte rispetto alle analoghe NPs prive di IDE. La ridotta dimensione delle NPs caricate con IDE rappresenta una caratteristica importante per i vettori nanoparticellari, in quanto potrebbe favorire una più agevole penetrazione trans-dermica se somministrate attraverso formulazioni topiche; è stato dimostrato anche che le NPs sono stabili a temperatura ambiente senza formazione di aggregati fino a tre settimane.

Un requisito essenziale dei sistemi farmaceutici colloidali è la capacità di rilasciare le sostanze attive, permettendone la diffusione fuori dal veicolo, una volta avvenuta la somministrazione. Gli esperimenti di rilascio da parte delle NPs di IDE e GSH su sistemi *cell free*, hanno mostrato un rilascio costante di IDE per 24 ore, ma nessun rilascio di GSH probabilmente a causa del legame covalente che esso instaura con il chitosano. Anche dai nostri risultati ottenuti da esperimenti eseguiti *in vitro* su cellule NCTC 2544 non è stato rilevato nessun aumento del contenuto tiolico dopo trattamento con le NPs CS-GSH/SBE- β -CD, in quanto questo antiossidante essendo legato covalentemente al CS svolge probabilmente una funzione principalmente strutturale. Infatti nella struttura delle NPs, il GSH è stato utilizzato anche allo scopo di stabilizzare il sistema nanoparticellare.

L'IDE è un benzochinone sintetico strutturalmente simile al CoQ₁₀, con scarsa solubilità in acqua, entrambi condividono lo stesso anello benzochinonico, ma l'IDE presenta una corta catena laterale idrossidecilica, rispetto alla catena laterale isoprenica del CoQ₁₀ [Carbone et al., 2012; Leonardi et al., 2014]. Analogamente al CoQ₁₀, l'IDE è in grado di proteggere i mitocondri dalla perossidazione lipidica e dal danno ROS-indotto [Suno et al., 1989; Rauchova et al., 2006; Carbone et al., 2013; Leonardi et al., 2014; Erb M. et al 2012; Suno M. e Nagaoka A. 1984a;1984b;1989; Yamada K. et al. 1999; Cardoso S.M. et al. 1998]. Sia il CoQ₁₀ che l'IDE sono coinvolti nella CTE: neutralizzano i radicali liberi e incrementano la produzione di adenosina trifosfato (ATP) [Sugiyama et al., 1985; Carbone et al., 2013].

Lo studio *in vitro* dell'attività antiossidante delle NPs condotto in un sistema *cell free* mediante test del DPPH, mostra come l'IDE libero essendo insolubile in acqua non esplica alcuna attività antiossidante, mentre quando l'IDE viene caricato nelle NPs esplica un'attività antiossidante del 92%. Risultati analoghi sono stati riscontrati anche negli studi *in vitro*, l'IDE libero infatti non è in grado di esplicare alcuna attività antiossidante nei confronti della linea

cellulare NCTC 2544 rispetto alla NPs CS-GSH/SBE- β -CD-IDE. Ciò dimostra che le NPs non solo favoriscono il trasporto di IDE, molecola lipofila in un ambiente acquoso, ma ne preservano anche l'attività antiossidante.

Le NPs sono state preparate utilizzando dei composti non tossici, biocompatibili e biodegradabili, a base di chitosano, reticolato mediante la sulfobutileter- β -ciclodestrina che migliora la biodisponibilità nonché la stabilità di molecole scarsamente solubili in acqua [Jarvinen et al., 1995; Rajewski et al., 1995; Luke et al., 2010].

D'altra parte gli studi di nanotossicologia presenti in letteratura dimostrano che i NMs dispongono di proprietà chimico-fisiche che conferiscono alla materia un'attività biologica unica nel suo genere, che non può essere direttamente predetta dalle proprietà dei composti e dalle sostanze chimiche che costituiscono il materiale grezzo, in quanto variano in relazione alla dimensione della materia stessa [Oberdorster G. et al., 2005]. Pertanto secondo i principi su cui si basa la nanotossicologia, è di estrema importanza valutare sempre le possibilità che insorgano effetti dannosi a seguito di esposizione ai NMs [Dick C.A et al., 2002]; nonché di comprendere le interazioni dell'interfaccia nano-cellula e, il rapporto che sussiste tra le proprietà chimico-fisiche dei NMs e i loro profili tossicologici [Chen C. et al., 2013].

Fatta questa premessa avendo come obiettivo l'ideazione di sistemi di *delivery* per la somministrazione topica di antiossidanti, la fase successiva del progetto ha avuto come scopo quello di dimostrare l'assenza di citotossicità delle NPs su cheratinociti umani.

Gli studi di citotossicità sono stati condotti su due linee cellulari, HaCaT e NCTC 2544, solitamente utilizzati come modelli per la valutazione di molecole con possibili attività terapeutiche, nonché per la valutazione di potenziali agenti nocivi della pelle.

I risultati ottenuti sulla linea cellulare HaCaT non evidenziano nessun effetto citotossico a seguito di trattamento con le NPs a tutte le concentrazioni testate (0-2000 ng/ μ L di IDE e/o 0-1725 ng/ μ L di GSH) e non varia in funzione del tempo di trattamento 24 o 48 h. Da notare che la presenza di IDE nelle NPs CS-GSH/(SBE- β -CD-IDE) non cambia il profilo di citotossicità ottenuto con le NPS vuote.

La seconda linea cellulare NCTC 2544, scelta per questi studi, è una linea cellulare meno differenziata delle cellule HaCaT, con caratteristiche tipiche dello strato basale dell'epidermide [Fasano E. et al., 2014], e risulta più suscettibile all'azione di agenti irritanti [Scanarotti C. et al., 2013]. Pertanto, abbiamo testato la citotossicità delle NPs su questa linea cellulare (NCTC 2544) utilizzando concentrazioni di IDE più basse ma, come riportato in letteratura, efficaci [Goldschmidt R. et al., 2013]. Le NPs non risultano citotossiche al di sotto di 0.8 ng/ μ L (2.5 μ M) di IDE sia a 24 che a 48 h. La tossicità alla concentrazione più

alta 1.6 ng/ μ L evidenziata sia alle 24 che alle 48h non è imputabile alla presenza dell'IDE e tale effetto citotossico lo si rileva anche per i singoli componenti. Dal confronto delle NPs CS-GSH/SBE- β -CD-IDE con i due componenti che le costituiscono (CS-GSH e SBE- β -CD-IDE), si nota come i due componenti esplicano un effetto citotossico maggiore rispetto alle NPs. In particolare la citotossicità del composto SBE- β -CD-IDE risulta significativa rispetto al controllo non trattato a quasi tutte le concentrazioni testate. Inoltre i singoli componenti inducono una tossicità significativa rispetto al trattamento con le NPs complete alle concentrazioni più basse per entrambi i tempi ($p \leq 0.01$). Ciò indica che, le NPs preservano dall'effetto citotossico che i singoli costituenti mostrano quando vengono somministrati tal quali.

Il pretrattamento di cellule NCTC 2544 con NPs contenenti IDE (0.008-0.8 ng/ μ L) sottoposte a condizioni ossidanti (H_2O_2 400 μ M), determina una riduzione del contenuto di ROS intracellulare rispetto ai campioni di controllo trattati solo con H_2O_2 . Tale produzione risulta significativamente ridotta ($p \leq 0.05$) solo nelle cellule pretrattate con la concentrazione più alta di NPs contenenti IDE 0.8 ng/ μ L rispetto alle cellule trattate con H_2O_2 .

Ad ulteriore conferma dell'azione protettiva di IDE somministrato mediante le NPs anche il contenuto tiolico intracellulare è preservato in maniera significativa ($p \leq 0.05$) a tutte le concentrazioni testate (IDE nel range 0.008-0.8 ng/ μ L) rispetto alle cellule trattate solo con H_2O_2 . Da notare inoltre che il trattamento con le NPs che non contengono IDE o con l'IDE libero non sono in grado di preservare la deplezione tiolica indotta con CCCP che è significativa alle concentrazioni più alte rispetto al trattamento con le NPs caricate con IDE ($p \leq 0.05$).

Infine considerata l'importante azione antiossidante che l'IDE svolge all'interno della CTE, abbiamo valutato in cellule NCTC 2544 la capacità delle NPs di preservare la funzionalità della CTE mitocondriale dal danno indotto da CCCP.

I risultati ottenuti mostrano che il pretrattamento con le NPs contenenti IDE determinano una riduzione significativa del danno mitocondriale rispetto alle cellule trattate con IDE libero alle concentrazioni più alte ($p \leq 0.01$).

In conclusione, i risultati ottenuti in questa tesi dimostrano che l'IDE può essere caricato all'interno di un sistema idrofilico di *delivery*, costituito da nanoparticelle di chitosano e ciclodestrine modificate. Questo sistema rappresenta una strategia di somministrazione alternativa per molecole idrofobiche, è stato infatti dimostrato che:

- consente il caricamento di IDE evitando l'utilizzo di solventi organici;

- l'IDE può essere rilasciato dalle NPs in sistemi *cell free*;
- non induce effetti citotossici sulle linee cellulari testate;

Inoltre le NPs caricate con IDE in cellule NCTC2544 sono in grado di:

- svolgere un'attività antiossidante contro la produzione di ROS;
- preservare il contenuto tiolico a seguito di stress ossidativo;
- preservare l'integrità mitocondriale.

I dati ottenuti da questo studio condotto su due linee cellulari di cheratinociti umani, potrebbero suggerire l'utilizzo di tali NPs per la formulazione di trattamenti topici, che prevedono l'applicazione di agenti antiossidanti contro l'azione dei radicali liberi a livello cutaneo.

Nonostante i dati sperimentali finora discussi hanno mostrato degli effetti promettenti a nulla valgono se la sintesi delle NPs non risulterà riproducibile e efficace nel tempo.

La continuità del progetto sperimentale purtroppo è stata fortemente compromessa dai problemi riscontrati nella preparazione delle NPs su scala più ampia, che hanno portato alla produzione di NPs non conformi alle caratteristiche chimico-fisiche e morfologiche con le quali abbiamo ottenuto tutti i risultati biologici finora discussi. Al variare delle condizioni per una produzione su scala più ampia le NPs contenenti IDE non sono state più in grado confermare gli effetti biologici precedentemente ottenuti.

Attualmente, sono in corso presso l'Università di Bari ulteriori studi per individuare le criticità nella riproducibilità della preparazione delle NPs oggetto di questa tesi, in modo da poter approfondire e convalidare gli incoraggianti risultati ottenuti.

6. BIBLIOGRAFIA

Agnihotri S. A., Mallikarjuna N. N., Aminabhavi T. M. **Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery.** *Journal of Controlled Release* 2004; 100: 5–28.

Ahlgren-Beckendorf J.A., Reising A.M., Schander M.A., Herdler J.W., Johnson J.A. **Coordinate regulation of NAD (P) H:quinine oxidoreductase and glutathione-S-transferases in primary cultures of rat neurons and glia: role of the antioxidant/electrophile responsive element.** *Glia* 1999; 25:131–142.

Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Joo S.W., Zarghami N., Hanifehpour Y., Samiei M., Kouhi M. and Nejati-Koshki K. **Liposome: classification, preparation, and applications.** *Nanoscale Research Letters* 2013; 8:102.

Ali S.S., Quick K.L., Kim-Han J.S., Erlanger B.F., Huang T.T., Epstein C.J., Dugan L.L. **A biologically effective fullerene (C60) derivative with superoxide dismutase mimetic properties.** *Free Radic Biol Med.* 2004; 37(8): 1191-202.

Allard E., Passirani C., Garcion E., Pigeon P., Vessières A., Jaouen G, et al. **Lipid nanocapsules loaded with an organometallic tamoxifen derivative as a novel drug-carrier system for experimental malignant gliomas.** *J Control Release* 2008; 130: 146–53.

Allen T.M., Chonn A. **Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system.** *FEBS Lett.* 1987; 223(1): 42-6.

Alkilany A.M., Lohse S.E. and Murphy C.J. **The gold standard: Gold nanoparticle libraries to understand the nano-bio interface.** *Acc. Chem. Res.* 2013; 46: 650–661.

Amidi M., Mastrobattista E., Jiskoot W., Hennink W.E. **Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens.** *Adv Drug Deliv Rev.* 2010; 62(1):59-82.

Angelos S., Liong M., Choi E., Zink J.I. **Mesoporous silicate materials as substrates for molecular machines and drug delivery.** *Chemical Engineering Journal* 2008; 137: 4–13.

Annese V., Latiano A., Rossi L., Lombardi G., Dallapiccola B., Serafini S., Damonte G., Andriulli A., Magnani M. **Erythrocytes-mediated delivery of dexamethasone in steroid-dependent IBD patients – a pilot uncontrolled study.** *Am. J. Gastroenterol.* 2005; 100(6): 1370-1375.

Antonelli A., Sfara C., Battistelli S., Canonico B., Arcangeletti M., Manuali E., Salamida S., Papa S., Magnani M. **New Strategies to Prolong the In Vivo Life Span of IronBased Contrast Agents for MRI.** *PlosOne* 2013; 8(10):e78542.

Aresta A., Calvano C., Trapani A., Zambonin C.G., De Giglio E. **α -Tocopherol/chitosan-based nanoparticles: characterization and preliminary investigations for emulsion systems application.** *J. Nanoparticles Res.* 2013.

Arruebo M., Pacheco R.F., Ibarra M.R., and Santamaría J. **Magnetic nanoparticles for drug delivery.** *Nano Today* 2007; 2: 22-32.

- Au J.L., Jang S.H., Zheng J., Chen C.T., Song S., Hu L., Wientjes M.G. **Determinants of drug delivery and transport to solid tumors.** *J Control Release.* 2001; 74(1-3): 31-46.
- Baer D., Gaspar D.J., Nachimuthu P., Techane S.D. and Castner, D.G. **Application of surface chemistry analysis tools for characterization of nanoparticles.** *Anal. Bioanal. Chem.* 2010; 396: 983–1002.
- Baldrick P. **The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient.** *Regul Toxicol Pharmacol.* 2010; 56(3):290-9.
- Ballatori N., Krance S.M., Notenboom S., Shi S., Tieu K., Hammond C.L. **Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases.** *Biol Chem.* 2009; 390:191–214.
- Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C. **Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids.** *J Mol Biol.* 1965; 13(1):238-52.
- Basu-Modak S., Gordon M.J., Dobson L.H., Spencer J.P., Rice-Evans C., Tyrrell R.M. **Epicatechin and its methylated metabolite attenuate UVA-induced oxidative damage to human skin fibroblasts.** *Free Radic Biol Med.* 2003; 35(8):910-21.
- Bax B.E., Bain M.D., Fairbanks L.D., Webster A.D., Ind P.W., Hershfield M.S., Chalmers R.A. **A 9-yr evaluation of carrier erythrocyte encapsulated adenosine deaminase (ADA) therapy in a patient with adult-type ADA deficiency.** *Eur J Haematol.* 2007; 79(4): 338-48.
- Becker C., Bray-French K., Drewe J. **Pharmacokinetic evaluation of idebenone.** *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2011; 6:1437-1434.
- Bernard E., Dubois J.L., Wepierre J. **Importance of sebaceous glands in cutaneous penetration of an antiandrogen: target effect of liposomes.** *J Pharm Sci.* 1997; 86(5):573-8.
- Berridge M.V., Tan A., McCoy K., Wang R. **The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts.** *Biochemica* 1996; 4: 14–19.
- Berridge M.V., Tan A.S. **Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction.** *Arch Biochem Biophys* 1993; 303(2): 474–82.
- Beyer R.E. **The participation of coenzyme Q in free radical production and antioxidant.** *Free Radic Biol Med.* 1990; 8: 545–565.
- Beyer R.E., Segura A.J., Di B.S., Cavazzoni M., Fato R., Fiorentini D., Galli M.C., Setti M., Landi L., Lenaz G. **The role of DT-diaphorase in the maintenance of the reduced antioxidant form of coenzyme Q in membrane systems.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:2528–2532.
- Bhattacharjee S., de Haan L.H.J., Evers N.M., Jiang X., Marcelis, A. T. M., Zuilhof, H., Rietjens, I.M. and Alink, G.M. **Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity**

- of organic monolayer-coated silicon nanoparticles to wardmacrophage NR8383 cells.** *Part. Fibre Toxicol.* 2010; 7(25).
- Bogdan Allemann I., Baumann L. **Antioxidants used in skin care formulations.** *Skin Therapy Lett.* 2008; (7):5-9.
- Borchard G. **Chitosans for gene delivery.** *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 52(2):145–50.
- Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N.E. **Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line.** *J Cell Biol.* 1988; 106(3): 761-71.
- Bouwmeester H., Lynch I., Marvin H.J.P., Dawson K.A., Berges M., Braguer, D., Byrne, H.J., Casey A., Chamber G., Clift M.J.D. et al. **Minimal analytical characterization of engineered nanomaterials needed for hazard assessment in biological matrices.** *Nanotoxicology* 2013; 5: 1–11.
- Bradford M.M. **Anal. Biochem** 1976. 72, 248-254.
- Braun C.S., Vetro J.A., Tomalia D.A, Koe G.S., Koe J.G., Middaugh C.R. **Structure/function relationships of polyamidoamine/DNA dendrimers as gene delivery vehicles.** *J Pharm Sci.* 2005; 94(2): 423-36.
- Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J.J., and Hofman M.C. **In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stemcells.** *Toxicol. Sci.* 2005; 88: 412–419.
- Braydich-Stollle L K., Speshock J.L., Castle A., Smith M., Murdock R.C. and Hussain S.M. **Nanosized aluminum altered immune function.** *ACS Nano* 2010; 4: 3661–3670.
- Briere J.J., Schlemmer D., Chretien D., Rustin P. **Quinone analogues regulate mitochondrial substrate competitive oxidation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316:1138–1142.
- Buyse G.M., Voit T., Schara U., Straathof C.S.M., D'Angelo M.G., Bernert G., Cuisset J.M., Finkel R.S., Goemans N., McDonald C.M., Rummey C., Meier T., for the DELOS Study Group. **Efficacy of idebenone on respiratory function in patients with Duchenne muscular dystrophy not using glucocorticoids (DELLOS): a double-blind randomised placebo-controlled phase 3 trial.** *Lancet* 2015; 385: 1748–57.
- Burlando B., Parodi A., Volante A., Bassi A.M. **Comparison of the irritation potentials of *Boswellia serrata* gum resin and acetyl-11-keto- β -boswellic acid by *in vitro* cytotoxicity tests on human skin derived cell lines.** *Tecnology Letters* 2008; 177: 144-149.
- Cannavà C., Crupi V., Guardo M., Majolino D., Stancanelli R., Tommasini S., et al. **Phase solubility and FTIR-ATR studies of idebenone/sulfobutylether β -cyclodextrin inclusion complex.** *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2013; 75: 255–262.
- Canonico B., Luchetti F., Arcangeletti M., Valentini M., Papa S. **Flow cytometry assays for viability and cell death. II. Evaluation of other cellular functions.** *Clinical biochemistry* 2009; 33(2).

- Carbone C., Cupri S., Leonardi A. **Lipid-based nanocarriers for drug delivery and targeting: a patent survey of methods of production and characterization.** *Pharma Pat Analyst* 2013; 2:665–677.
- Carbone C., Pignatello R., Musumeci T., Puglisi G. **Chemical and technological delivery systems for idebenone: a review of literature production.** *Expert Opin Drug Deliv.* 2012; 9 (11):1377-92.
- Cardoso S.M., Pereira C., Oliveira C.R. **The protective effect of vitamin E, idebenone and reduced glutathione on free radical mediated injury in rat brain synaptosomes.** *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246:703–710.
- Castro I.A., Rogero M.M., Junqueira R.M., Carrapeiro M.M. **Free radical scavenger and antioxidant capacity correlation of alpha-tocopherol and Trolox measured by three in vitro methodologies.** *Int J Food Sci Nutr.* 2006; 57:75–82.
- Cavalli R., Caputo O., Gasco M.R. **Preparation and characterization of solid lipid nanospheres containing paclitaxel.** *Eur J Pharm Sci* 2000; 10: 305–09.
- Challa R., Ahuja A., Ali J., Khar R.K. **Cyclodextrins in drug delivery: An Updated review.** *AAPS PharmSciTech* 2005; 6(2),43: 329-357.
- Champion J.A. and Mitragotri S. **Role of target geometry in phagocytosis.** *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 2006; 103: 4930–4934.
- Chang Y.N., Zhang M., Xia L., Zhang J. and Xing G. **The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles.** *Materials* 2012; 5: 2850–2871.
- Chaudhury A, Das S. **Recent advancement of chitosan-based nanoparticles for oral controlled delivery of insulin and other therapeutic agents.** *AAPS PharmSciTech.* 2011; 12(1):10-20.
- Chauhan A.S., Jain N.K., Diwan P.V., Khopade A.J. **Solubility enhancement of indomethacin with poly(amidoamine) dendrimers and targeting to inflammatory regions of arthritic rats.** *J Drug Target.* 2004; 12(9-10): 575-83.
- Chen L., Mccrate J.M., Lee J. and Li H. **The role of surface charge on the uptake and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles with osteoblast cells.** *Nanotechnology* 2011;22: 105-708.
- Chen L., Hu J.Y., Wang S.Q. **The role of antioxidants in photoprotection: a critical review.** *J Am Acad Dermatol.* 2012; 67(5):1013-24.
- Chen Y., Wang M., Fang L. **Biomaterials as novel penetration enhancers for transdermal and dermal drug delivery systems.** *Drug Deliv.* 2013; 5:199-209.
- Cheng S.W., Ko C.H., Yau S.K., Mak C., Yuen Y.F., Lee C.Y. **Novel use of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy in Hong Kong.** *Hong Kong Med J* 2014; 20(5):451-4.
- Choi M.J., Maibach H.I. **Liposomes and Niosomes as Topical Drug Delivery Systems.** *Skin Pharmacol. Appl Skin Physiol.* 2005; 18: 209–219.

- Chourasia M.K., Jain S.K. **Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems.** *J Pharm Pharm Sci.* 2003; 6 (1): 33-66.
- Clift K. and Clift M.J.D. **DCFH oxidation assay.** *Nanoimpact net scientific protocol.* 2010.
- Clift Martin J.D., Rutishauser B.R., Brown D.M., Duffin R., Donaldson K., Proudfoot L., Guy K., Stone V. **The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line.** *Toxicol-Appl Pharmacol.* 2008; 232: 418-427.
- Cohen J.M., Teeguarden J.G. and Demokritou P. **An integrated approach for the in vitro dosimetry of engineered nanomaterials.** *Part. Fibre Toxicol.* 2014; 11(20).
- Comfort K.K., Maurer E.I., Braydich-Stolle L.K. and Hussain S. M. **Interference of silver, gold, and iron oxide nanoparticles on epidermal growth factor signal transduction in epithelial cells.** *ACS Nano* 2011; 5: 10000-10008.
- Comfort K.K., Braydich-Stolle L.K., Maurer E.I. and Hussain, S.M. **Less is more: long term in vitro exposure to low levels of silver nanoparticles provides new insights for nanomaterial evaluation.** *ACS Nano* 2014a; 8: 3260-3271.
- Darr D., Dunston S., Faust H., Pinnell S. **Effectiveness of antioxidants (vitamin C and E) with and without sunscreens as topical photoprotectants.** *Acta Dermatol Venereol.* 1996; 76 :264-268.
- Davidson R.N., Croft S.L., Scott A., Maini M., Moody A.H., Bryceson A.D. **Liposomal amphotericin B in drug-resistant visceral leishmaniasis.** *Lancet* 1991; 337: 1061-62.
- De Brosse M.C., Comfort K.K., Untener E.A., Comfort D.A., and Hussain, S.M. **High aspect ratio gold nanorods displayed augmented cellular internalization and surface chemistry mediated cytotoxicity.** *Mater. Sci. Eng. C.* 2013; 33: 4094-4100.
- De Giglio E., Trapani A., Cafagna D., Ferretti C., Latta R., Cometa S., et al. **Ciprofloxacin-loaded Chitosan Nanoparticles as titanium coatings: a valuable strategy to prevent implant-associated infections.** *Nano Biomed Engen.* 2012; 4: 157-163.
- Denizot F., Lang R. **Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.** *J. Immunol. Meth.* 1986; 89: 271-277.
- Derelanko M.J. and Auletta C.S. **Handbook of Toxicology.** 3rd ed. *CRC Press, Boca Raton* 2014.
- Dev A., Binulal N.S., Anitha A., Nair S.V., Furuike T., Tamura H., Jayakumar R.. **Preparation of poly (lactic acid)/chitosan nanoparticles for anti-HIV drug delivery applications.** *Carbohydrate polymers* 2010; 80: 833-838
- Desiderio C., Fanali S. **Use of negatively charged sulfobutyl ether-β-cyclodextrin for enantiomeric separation by capillary electrophoresis.** *J Chrom A.* 1995; 716 183-196.

- Dick C.A., Brown D.M., Donaldson K., Stone V. **The role of free radical in the toxic and inflammatory effect of four ultrafine particle types.** *Ref Type: Generic*, 2002.
- Diembeck W., Beck H., Benech-Kieffer F., Courtellemont P., Dupuis J., Lovell W., et al. **Test guidelines for in vitro assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients.** *Food Chem Toxicol.* 1999; 37: 191-205.
- Dinkova-Kostova A.T. and Talalay P. **NAD (P) H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector.** *Arch Biochem Biophys* 2010; 501:116–123.
- Di Prospero N.A., Sumner C.J., Penzak S.R., Ravina B., Fischbeck K.H., Taylor J.P., Safety, tolerability, and pharmacokinetics of high-dose idebenone in patients with Friedreich ataxia. **Archives of Neurology** 2007; 64(6): 803–808.
- Dong H., Shertzer H.G., Genter M.B., Gonzalez F.J., Vasiliou V., Jefcoate C., Nebert D.W. **Mitochondrial targeting of mouse NQO1 and CYP1B1 proteins.** *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 435:727–732.
- Dowding J.M., Das S., Kumar A., Dosani T., McComack R., Gupta A., Sayle T.X.T., Sayle D.C., von Kalm L., Seal S. and Self W.T. **Cellular internalization and toxicity depend on physicochemical properties and surface modification of redox-active nanomaterials.** *ACS Nano* 2013; 7: 4855–4868.
- Dreher F., Gabard B., Schwindt D.A., Maibach H.I. **Topical melatonin in combination with vitamins E and C protects skin from UV-induced erythema: A human study in vivo.** *Br J Dermatol.* 1998; 139 :332–339
- Dreher F., Maibach, H.I. **Protective effects of topical antioxidants in humans.** *Curr Probl Dermatol.* 2001; 29: 157-164.
- Dûchene D., Ponchel G., Wouessidjewe D. **Cyclodextrins in targeting. Application to nanoparticles.** *Adv Drug Del Rev.* 1999; 36, 29-40.
- Dugan L.L., Lovett E.G., Quick K.L., Lotharius J., Lin T.T., O'Malley K.L. **Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders.** *Parkinsonism Relat Disord.* 2001; 7(3): 243-246.
- Edelstein R.L., Tamanaha C.R., Sheehan P.E., Miller M.M., Baselt D.R., Whitman L.J., Colton R.J. **The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents.** *Biosensors Bioelectron* 2000; 14: 805-813.
- Erb M., Hoffmann-Enger B., Deppe H., Soeberdt M., Haefeli R.H., Rummey C., Feurer A., Gueven N. **Features of idebenone and related short-chain quinones that rescue ATP levels under conditions of impaired mitochondrial complex I.** *PLoS One* 2012; 7:e36153.
- Eruslanov E., Kusmartsev S. **Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry.** *Methods Mol Biol.* 2010; 594:57-72.
- Farris P. **Idebenone, green tea, and Coffeeberry® extract: new and innovative antioxidants.** *Dermatologic Therapy* 2007; 20: 322–329.

- Fernández-Checa J., Kaplowitz N., Garcia-Ruiz C., Colell A., Miranda M., Mai M., Ardite E., Morales A. **GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect.** *Am J Physiol.* 1997; 273:G7- G17.
- Fetterly G.J., Straubinger R.M. **Pharmacokinetics of paclitaxel-containing liposomes in rats.** *AAPS PharmSci* 2003; 15(4): E32.
- Fiorito S., Serafino A., Andreola F., Bernier P. **Effects of fullerenes and single-wall carbon nanotubes on murine and human macrophages.** *Carbon* 2006; 44: 1100–1105.
- Fir M.M., Milivojevic L., Prosek M., Smidovnik A. **Properties Studies of Coenzyme Q10-Cyclodextrins complexes.** *Acta Chim Slov.* 2009; 56: 885-891.
- Firuzi O., Miri R., Tavakkoli M., Saso L. **Antioxidant therapy: current status and future prospects.** *Curr Med Chem.* 2011; 18:3871-3888.
- Forman H.J., Zhang H., Rinna A. - **Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis.** *Mol Asp Med.* 2009; 30:1–12.
- Fraternale A., Crinelli R, Casabianca A., Paoletti M.F., Orlandi C., Carloni E., Smietana M., Palamara A.T., Magnani M. **Molecules altering the intracellular thiol content modulate NF- κ B and STAT-1/IRF-1 signalling pathways and IL-12 p40 and IL-27 p28 production in murine macrophages.** *PlosOne* 2013; 8(3):e57866.
- Fuchs J., Huflejt M.E., Rothfuss L.M., Wilson D.S., Carcamo G., Packer L. **Acute effects of near ultraviolet and visible light on the cutaneous antioxidant defense system.** *Photochem Photobiol.* 1989; 50: 739-44.
- Fuchs J., Huflejt M.E., Rothfuss L.M., Wilson D.S., Carcamo G., Packer L.J. **Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation.** *J Invest Dermatol.* 1989; 93: 769-73.
- Garber K. **Improved Paclitaxel formulation hints at new chemotherapy approach.** *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96(2): 90-1.
- Garcia-Ruiz C., Fernández-Checa J.C. **Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch.** *J Gastroenterol Hepatol.* 2006; 21: S3-6.
- Gemeinhart R.A., Luo D., Saltzman W.M. **Cellular fate of a modular DNA delivery system mediated by silica nanoparticles.** *Biotechnol Prog.* 2005; 21(2): 532-7.
- Geromel V., Darin N., Chretien D., Benit P., DeLonlay P., Rotig A, Munnich A., Rustin P. **Coenzyme Q (10) and idebenone in the therapy of respiratory chain diseases: rationale and comparative benefits.** *Mol Genet Metab* 2002; 77:21–30
- Giorgio V., Petronilli V., Ghelli A. **The effects of idebenone on mitochondrial bioenergetics.** *Biochim Biochim Biophys Acta.* 2012; 1817: 363-369.
- Giri S., Trewyn B.G., Lin VS. **Mesoporous silica nanomaterial-based biotechnological and biomedical delivery systems.** *Nanomedicine (Lond)* 2007; 2(1):99-111.

Goldschmidt R., Arce P.M., Khdour O.M., Collin V.C., Dey S., Jaruvangsanti J., Fash D.M., Hecht S.M. **Effects of cytoprotective antioxidants on lymphocytes from representative mitochondrial neurodegenerative diseases.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2013; 21: 969–978

Greenwald R.B., Choe Y.H., McGuire J., Conover C.D. **Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates.** *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 217–50.

Guaglianone P., Chan K., Weiss E.D., Hanisch R., Jeffers D., Sharma D., et al. **Phase I and pharmacologic study of liposomal daunorubicin (DaunoXome).** *Invest New Drugs* 1994; 12: 103–10.

Gueven N., Woolley K., Smith J. **Border between natural product and drug: Comparison of the related benzoquinones idebenone and coenzyme Q10.** *Redox Biology* 2015; 4: 289–295.

Gunawan C., Lim M., Marquis C.P. and Amal R. **Nanoparticle-protein corona complexes govern the biological fates and function of nanoparticles.** *J. Mat. Chem. B.* 2014; 2: 2060–2083.

Haase A., Tentschert J., Jungnickel H., Graf P., Manton A., Draude, F., Plendl, J., Goetz, M. E., Galla, S., Masic, A., Thuenemann, A.F., Taubert A., Arlinghaus H.F. and Luch A. **Toxicity of silver nanoparticles in human macrophages: uptake, intracellular distribution and cellular response.** *J. Phys. Conf. Ser.* 2011; 304: 12–30.

Hadgraft J. **Skin deep.** *Eur J Pharm Biopharm*, 2004; 58:291–9.

Haefeli R.H., Erb M., Gemperli AC. **NQO1-dependent redox cycling of idebenone: effects on cellular redox potential and energy levels.** *PLoS One.* 2011; 6: e17963.

Halliwell B. **Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence?** *Lancet.* 1999; 44: 721–724.

Halliwell, B., and Whiteman, M. **Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?** *Br. J. Pharmacol.* 2004; 142: 231–255.

Hasanovic A., Zehl M., Reznicek G., Valenta C. **Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles as a possible skin drug delivery system for aciclovir with enhanced stability.** *J Pharm Pharmacol.* 2009; 61 (12):1609–16.

Hawker C.J., Jean M., Frechet J. **Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules.** *J. Am. Chem. Soc.* 1990; 112(21): 7638–7647.

Hawkins M.J., Soon-Shiong P., Desai N. **Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine.** *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60(8): 876–85.

Hedges A.R. **Industrial Applications of Cyclodextrins.** *Chem Rev.* 1998; 98: 2035–2044.

Heitz F.D., Erb. M., Anklin C., Robay D., Pernet V., Gueven N. **Idebenone protects against retinal damage and loss of vision in a mouse model of Leber's hereditary optic neuropathy.** *PLoS One* 2012; 7: e45182.

Hoffman J.F. **The use of released erythrocytes as carriers and bioreactors.** *Magnani M. and DeLoach JR ads. Plenum, NY* 1992; pp 1-15.

Hoyt V.M., Mason E. **Nanotechnology: emerging health issues.** *J. Chem Health Saf.* 2008; 15: 10-15.

Hsiao I. and Huang Y. **Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO₂ nanoparticles toward human lung epithelial cells.** *Sci. Total Environ.* 2011; 409: 1219–1228.

Hussain S.M., Hess K.L., Gearhart J.M., and Schlager J.J. **In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells.** *Toxicol. In Vitro* 2005; 19, 975–983.

Hussain S. M., Warheit D.B., Ng S.P., Comfort K.K., Grabinski C.M. and Braydich-Stolle L.K. **At the Crossroads of Nanotoxicology in vitro: Past Achievements and Current Challenges.** *Toxicological Sciences* 2015, 147(1), 5–16.

Ibrahim N.K., Desai N., Legha S., Soon-Shiong P., Theriault R.L., Rivera E., Esmali B., Ring S.E., Bedikian A., Hortobagyi G.N., Ellerhorst J.A. **Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel.** *Clin Cancer Res.* 2002; 8(5): 1038-44.

Ichihashi M., Ueda M., Budiyanoto A., Bito T., Oka M., Fukunaga M., et al. **UV-induced skin damage** *Toxicology.* 2003; 189: 21-39.

Ieva E., Trapani A., Cioffi N., Ditaranto N., Monopoli A., Sabbatini L. **Analytical characterization of chitosan nanoparticles for peptide drug delivery applications.** *Anal Bioanal Chem* 2009; 393:207–215.

Ikejiri Y., Mori E., Ishii K., Nishimoto K., Yasuda M., Sasaki M. **Idebenone improves cerebral mitochondrial oxidative metabolism in a patient with MELAS.** *Neurology* 1996;47:583–5.

Illum L. **Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient.** *Pharm. Res.* 1998; 15 (9), 1326–1331.

Imada I., Fujita T., Sugiyama Y., Okamoto K., Kobayashi Y. **Effects of idebenone and related compounds on respiratory activities of brain mitochondria, and on lipid peroxidation of their membranes.** *Arch Gerontol Geriatr* 1989; 8:323–341

Jaber S. and Polster B.M. **Idebenone and neuroprotection: antioxidant, pro-oxidant, or electron carrier?** *J. Bioenerg Biomembr* 2015; 47:111–118.

Jain N., Jain R., Thakur N., Gupta B.P., Jain D.K., Banveer J., Jain S. **Nanotechnology a safe and effective drug delivery system.** *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 2010; 3 (3): 159-165.

- James A.M., Smith RAJ., Murphy MP. **Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q.** *Arch Biochem Biophys.* 2004; 423: 47–56.
- Janes K.A., Calvo P., Alonso M.J. **Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules.** *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 47: 83-97.
- Jarvinen T., Jarvinen K., Urtti A., Thompson D., Stella V.J. **Sulfobutyl ether beta-cyclodextrin (SBE-beta-CD) in eyedrops improves the tolerability of a topically applied pilocarpine prodrug in rabbits.** *J Ocul Pharmacol Ther.* 1995; 11: 95-106.
- Jayakumar R., Prabakaran M., Reis R.L., Mano J.F. **Graft Copolymerized Chitosan-Present Status and Applications.** *Carbohydr. Polym.* 2005; 62(2): 142–158.
- Jenning V., Schäfer-Korting M., Cohla S. **Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties.** *J Control Rel.* 2000; 66: 115-126.
- Jevprasesphant R., Penny J., Jalal R., Attwood D., McKeown N.B., D'Emanuele A. **The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers.** *Int J Pharm.* 2003; 252(1-2): 263-6.
- Jiang J. and Bischof J. **Effect of timing, dose and interstitial versus nanoparticle delivery of tumor necrosis factor alpha in combinatorial adjuvant cryosurgery treatment of elt-3 uterine fibroid tumor.** *CryoLetters* 2010; 31(1), 50-62.
- Jiang W., Kim B.Y.S., Rutka J.T. and Chan W.C.W. **Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent.** *Nat. Nanotechnol.* 2008; 3: 145–150.
- Jones D.S., Mawhinney H.J. **Chitosan.** In: Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Owen, S.C. (Eds.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients, fifth ed.* American. 2006.
- Johnston M.J., Semple S.C., Klimuk S.K., Ansell S., Maurer N., Cullis P.R. **Characterization of the drug retention and pharmacokinetic properties of liposomal nanoparticles containing dihydrosphingomyelin.** *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768:1121–1127.
- Karve S., Werner M.E., Sukumar R., Cummings N.D., Copp J.A., Wang E.C., Li C., Sethi M., Chen R.C., Pacold M.E., Wang A.Z. **Revival of the abandoned therapeutic wortmannin by nanoparticle drug delivery.** *Proc Natl Acad Sci* 2012; 109(21):8230-5.
- Kayser O., Olbrich C., Yardley V., Kiderlen A.F., Croft S.L. **Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration.** *Int J Pharm.* 2003; 254(1): 73-5.
- Kessler, R. **Engineered nanoparticles in consumer products: understanding a new ingredient.** *Environ. Health Perspect.* 2011; 119: 120–125.
- King M.S., Sharpley M.S., Hirst J. **Reduction of hydrophilic ubiquinones by the Flavin in mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) and production of reactive oxygen species.** *Biochemistry* 2009; 48(9): 2053–2062.

Klopstock T., Yu-Wai-Man P., Dimitriadis K., Rouleau J., Heck S., Bailie M., et al. **A randomized placebo-controlled trial of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy.** *Brain* 2011; 134: 2677–86.

Koo O.M. , Rubinstein I., Onyuksel H. **Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2005; 1:193–212.

Koo S.H., Lee J.S., Kim G.H., and Lee H.G. **Preparation, Characteristics, and Stability of Glutathione-Loaded Nanoparticles.** *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59, 11264–11269

Koping-Hoggard M., Tubulekas I., Guan H., Edwards K., Nilsson M., Varum K.M. **Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure–property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo.** *Gene Ther.* 2001; 8 (14):1108–21.

Krauland A.H., Alonso M.J. **Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as macromolecular drug delivery.** *Int J Pharm.* 2007; 340: 134-142.

Krishnadas A., Rubinstein I., Onyuksel H. **Sterically stabilized phospholipid mixed micelles: in vitro evaluation as a novel carrier for water-insoluble drugs.** *Pharm Res* 2003; 20: 297-02.

Kumari A., Yadav S.K., Yadav SC. **Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems.** *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010; 75(1):1–18.

Kutz K., Drewe J., Vankan P. **Pharmacokinetic properties and metabolism of idebenone.** *J. Neurol* 2009; 256(Suppl 1):31–35.

Kwon G.S., Kataoka K. **Block copolymer micelles as long circulating drug vehicles.** *Adv Drug Deliv Rev* 1995; 16: 295-09.

Lasic D.D., Martin F.J., Gabizon A., Huang S.K., Papahadjopoulos D. **Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times.** *Biochim Biophys Acta* 1991; 1070(1): 187-92.

Lee J., Lee S.J., Choi J.Y., Yoo J.Y., Ahn C.H. **Amphiphilic amino acid copolymers as stabilizers for the preparation of nanocrystal dispersion.** *Eur J Pharm Sci.* 2005; 24(5):441-9.

Lee S., Sheck L., Crowston J.G., Van Bergen N.J., O'Neill E.C., O'Hare F., Kong Y.X., Chrysostomou V., Vincent A.L. **Trounce, Impaired complex-I-linked respiration and ATP synthesis in primary open-angle glaucoma patient lymphoblasts.** *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2012; 53 (4).

Leonardi A., Crascì L., Panico A., Pignatello R. **Antioxidant activity of idebenone-loaded neutral and cationic solid-lipid nanoparticles.** *Pharm Dev Technol.* 2014.

Lewinski N., Colvin V., Drezek R. **Cytotoxicity of nanoparticles.** *Small* 2008; 4(1):26-49.

- Li W. and Kong A.N. **Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response.** *Mol Carcinog* 2009; 48:91–104.
- Li Z., Wang M., Wang F., Gu Z., Du G., Wu J., Chen J. **γ -Cyclodextrins: A review on enzymatic production and applications.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007; 77: 245–255.
- Lin M.T. and Beal M.F. **Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases.** *Nature* 2006; 443:787–795.
- Lin P.C., Lin S. and Sridhar R. **Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials.** *Biotechnol. Adv.* 2013; 32: 711–726.
- Lin W.J. , Juang L.W. , Lin C.C. **Stability and Release Performance of a Series of Pegylated Copolymeric Micelles.** *Pharmaceutical Research* 2003; 20(4): 668-673.
- Lin Y., Rao A.M., Sadanadan B., Kenik E.A., Sun YP. **Functionalizing multiple-walled carbon nanotubes with aminopolymers.** *J Phys Chem B* 2002; 106(6): 1294 -98.
- Linkov I., Satterstrom F.K., Corey L.M. **Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions.** *Nanomedicine: Nanotech Bio and Med.* 2008; 4: 167–171.
- Liu R.M., Gaston Pravia K.A. **Oxidative stress and glutathione in TGF-Beta-mediated fibrogenesis.** *Free Rad Biol Med.* 2010; 1-15.
- Liu Z., Tabakman S., Welsher K., Dai H. **Carbon Nanotubes in Biology and Medicine: *In vitro* and *in vivo* detection, imaging and drug delivery.** *Nano Res* 2009; 2: 85-120.
- Lizano C., Sanz S., Luque J., Pinilla M. ***In vitro* study of alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenase encapsulated into human erythrocytes by an electroporation procedure.** *Biochim. Biophys. Acta* 1998; 1425(2): 328-336.
- Lockwood S.F., O'Malley S., Mosher G.L. **Improved aqueous solubility of crystalline astaxanthin (3,3'-dihydroxy-beta, beta-carotene-4,4'-dione) by Captisol (sulfobutyl ether beta-cyclodextrin).** *J Pharm Sci.* 2003; 92(4):922-6.
- Loftsson T., Jarho ., Masson M., Jarvinen T. **Cyclodextrins in drug delivery.** *Expert Opin Drug Deliv.* 2005;2: 335-351
- López-Nicolás J.M., Rodríguez-Bonilla P., García-Carmona F. **Cyclodextrins and antioxidants.** *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2012; 54(2):251-76.
- Love S.A., Maurer-Jones M.A., Thompson J.W., Lin Y.S., and Haynes C.L. **Assessing nanoparticle toxicity.** *Annu Rev. Anal. Chem.* 2012; 5: 181–205.
- Lu B., Zhang J.Q., Yang H. **Lung-targeting microspheres of carboplatin.** *Int J Pharm* 2003; 265: 1–1.
- Lu S.C. **Glutathione synthesis.** *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1830(5):3143-53.
- Lu S.C. **Regulation of glutathione synthesis.** *Mol Asp Med.* 2009; 30:42-59.

- Luke D.R., Tomaszewski K., Damle B., Schlamm H.T. **Review of the Basic and Clinical Pharmacology of Sulfobutylether- β -Cyclodextrin (SBECD).** *J Pharm Sci.* 2010; 99(8):3291-301.
- Lu Z., Qiao Y., Zheng X.T., Chan-Park M.B. and Li C.M. **Effect of particle shape on phagocytosis of CdTe quantum dot-cystine composites.** *Med. Chem. Commun.* 2010; 1: 84–86.
- Maestrelli F., Garcia-Fuentes M., Mura P., Alonso M.J. **A new drug nanocarrier system consisting of chitosan and hydroxypropylcyclodextrin.** *Eur J Pharm Biopharm.* 2006; 63: 79–86.
- Magnani M., Laguerre M., Rossi L., Bianchi M., Ninfali P., Mangani F., Ropars C. **Acetaldehyde dehydrogenase –loaded erythrocytes as bioreactors for the removal of blood acetaldehyde.** *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1989; 13(6): 849-852.
- Magnani M., Rossi L., Bianchi M., Serafini G., Stocchi V. **Red cell blood loading with hexokinase-inactivating antibodies. A new strategies for studying the role of enzymes in red cell metabolism and removal.** *Biomed Biochim Acta* 1990; 49(2-3): 149-53.
- Mahtab R., Rogers J.P., Murphy C.J. **Protein-sized quantum dot luminescence can distinguish between "straight", "bent", and "kinked" oligonucleotides.** *J Am Chem Soc* 1995; 117: 9099-9100.
- Marquis B.J., Love S.A., Braun K.L., Haynes C.L. **Analytical methods to assess nanoparticle toxicity.** *Analyst.* 2009; 134(3): 425-39.
- Martin Del Valle E.M. **Cyclodextrins and their uses: a review.** *Process Biochem.* 2004; 39:1033–1046.
- Martins E., John-Africa L., Yetunde I., Olobayo K., Sabinus O. **Eudraginated – polymer blends: a potential oral controlled drug delivery system for theophylline.** *Acta Pharmaceutica* 2012; 62: 71 – 82.
- Martins O.E., Ifeoma C.O., Ekaete I.A. and Sabinus I.O. **Nanotechnology in Drug Delivery.** *Licensee InTech* 2012; 4: 69-106.
- Mc Daniel D.H., Neudecker B.A., Di Nardo J.C. **Clinical efficacy assessment in photodamaged skin of 0,5% and 1,0% idebenone.** *J Cosmet Dermatol.* 2005; 4: 167-73.
- Meier T. and Buyse G. **Idebenone: an emerging therapy for Friedreich ataxia.** *J. Neurol* 2009; 256(Suppl 1):25–30.
- Meier T., Perlman S.L., Rummey C., Coppard N.J., Lynch D.R. **Assessment of neurological efficacy of idebenone in pediatric patients with Friedreich’s ataxia: data from a 6-month controlled study followed by a 12-month open-label extension study.** *J Neurol* 2012; 259:284–291.
- Meister A., Anderson M.E. **Glutathione.** *Ann Rev Biochem.* 1983; 52: 711–760.

- Menon D., Thomas R.T., Narayanan S., Maya S., Jayakumar R., Hussain F., Lakshmanana V., Nair, S.V. **A novel chitosan/polyoxometalate nano-complex for anti-cancer applications.** *Carbohydrate polymers* 2011; 84: 887-893.
- Millàn C.G., Marinero M.L., Castaneda A.Z., Lanao J.M. **Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers.** *J control Release* 2004; 95(1): 27-49.
- Mishra V., Mahor S., Rawat A., Gupta P.N., Dubey P., Khatri K., et al. **Targeted brain delivery of AZT via transferrin anchored PEGylated albumin nanoparticles.** *J Drug Target* 2006; 14(1): 45-53.
- Miyamoto M., Murphy T.H., Schnaar R.L., Coyle J.T. **Antioxidants protect against glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line.** *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 250:1132–1140.
- Montenegro L., Carbone C., Condorelli G., Drago R., Puglisi G. **Effect of oil phase lipophilicity on in vitro drug release from o/w microemulsions with low surfactant content.** *Drug Dev Ind Pharm.* 2006; 32:539-548.
- Montenegro L., Sinico C., Castangia I., Carbone C., Puglisi G. **Idebenone-loaded solid lipid nanoparticles for drug delivery to the skin: in vitro evaluation.** *Int J Pharm.* 2012; 434: 169-174.
- Montenegro L., Trapani A., Latrofa A., Puglisi G. **In vitro evaluation on a model of blood brain barrier of idebenone-loaded solid lipid nanoparticles.** *J. Nanosci Nanotech.* 2012; 12:330-337.
- Montenegro L., Trapani A., Fini P., Mandracchia D., Latrofa A., Cioffi N., Chiarantini L., Picceri G.G., Brundu S. and Puglisi G. **Chitosan Nanoparticles for Topical Co-administration of the Antioxidants Glutathione and Idebenone: Characterization and In vitro Release.** *British Journal of Pharmaceutical Research* 2014; 4(20): 2387-2406.
- Moran N.F., Bain M.D., Muqit M.M., Bax B.E. **Carrier erythrocytes entrapped thymidine phosphorylase therapy for MINGIE.** *Neurology* 2008; 71(9): 686-8.
- Morigi V., Tocchio A., Bellavite Pellegrini C., Sakamoto J.H., Arnone M., Tasciotti E. **Nanotechnology in medicine: from inception to market domination.** *J Drug Deliv.* 2012.
- Mosmann T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays.** *J. Immunol. Meth.* 1983; 65: 55–63.
- Monopoli M.P., Aberg C., Salvati A. and Dawson K.A. **Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials.** *Nat. Nanotechnol.* 2012; 7: 779–786.
- Mourya V.K., Inamdar N.N. **Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery.** *J Mater Sci Mater Med.* 2009 (5):1057-79.
- Müller RH, Radtke M, Wissing SA. **Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations.** *Adv Drug Deliv Re.* 2002; 1:S131-55.

- Muller R.H., Keck C.M. **Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs--a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles.** *J Biotechnol.* 2004; 113(1-3):151-70.
- Murdock R.C., Braydich-Stolle L.K., Shrand A.M., Schlager J.J., and Hussain, S.M. **Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering techniques.** *Toxicol. Sci.* 2004; 101, 239–253.
- Murphy T.H., Schnaar R.L., Coyle J.T. **Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine uptake.** *FASEB J* 1990; 4:1624–1633.
- Muzzarelli R.A.A. **Chitin and the human body.** *Advances in Chitin Sciences*; 1995. p. 448-61.
- Nagai Y., Yoshida K., Narumi S., Tanayama S., Nagaoka A. **Brain distribution of idebenone and its effect on local cerebral glucose utilization in rats.** *Arch Gerontol Geriatr* 1989; 8:257–272.
- Nagaoka A., Suno M., Shibota M., Kakihana M. **Effects of idebenone on neurological deficits, local cerebral blood flow, and energy metabolism in rats with experimental cerebral ischemia.** *Arch Gerontol Geriatr* 1989; 8:193–202.
- Nam J.M., Thaxton C.C., Mirkin C.A. **Nanoparticles-based bio-barcodes for the ultrasensitive detection of proteins.** *Science.* 2003; 301: 1884-1886.
- Narendhirakannan R.T., Hannah M.A. **Oxidative stress and skin cancer: an overview.** *Indian J Clin Biochem.* 2013; 28(2):110-5.
- Nel A., Xia T., Madler L., and Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006; 311: 622–627.
- Ng C.T., Yung L.Y., Swa H.L., Poh R.W., Gunaratne J. and Bay B.H. **Altered protein expression profile associated with phenotypical changes in lung fibroblasts co-cultured with gold nanoparticle-treated small airway epithelial cells.** *Biomaterials* 2015; 39: 31–38.
- Nicholls D.G. and Ferguson S.J. **Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity.** *Chem Biol Interact* 2013; 80:1–41.
- Nigavekar S.S., Sung L.Y., Llanes M., El-Jawahri A., Lawrence T.S., Becker C.W., Balogh L., Khan M.K. **3H dendrimer nanoparticle organ/tumor distribution.** *Pharm Res.* 2004; 21(3): 476-83.
- Oberdörster G., Maynard A., Donaldson K., Castranova V., Fitzpatrick J., Ausman K., Carter J., Karn B., Kreyling W., Lai D., Olin S., Monteiro-Riviere N., Warheit D., Yang H.; ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Nanomaterial Toxicity Screening Working Group. **Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Part Fibre Toxicol.** 2005a; 2:8.
- Oberdörster G., Oberdörster E., and Oberdörster J. **Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles.** *Environ. Health Perspect* 2005b. 113, 823–839.

- Okon E., Pouliquen D., Okon P., Kovaleva Z.V., Stepanova T.P., Lavit G., et al. **Biodegradation of magnetite dextran nanoparticles in the rat: A histologic and biophysical study.** *Lab Invest* 1994; 71: 895–03.
- Orsucci D., Mancuso M., Ienco E.C. **Targeting mitochondrial dysfunction and neurodegeneration by means of coenzyme Q10 and its analogues.** *Curr Med Chem.* 2011; 18:4053-4064.
- Pain D., Das P.K., Ghosh P., Bachhawat B.K. **Increased circulatory half-life of liposomes after conjunction with dextran.** *Journal of Biosciences* 1984; 6(6): 811-816.
- Pallardò F.V., Markovic J., García J.L., Vina J. **Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation.** *Mol Asp Med.* 2009; 30:77-85.
- Papakostas D., Rancan F., Sterry W., Blume-Peytavi U., Vogt A. **Nanoparticles in dermatology.** *Arch Dermatol Res.* 2011; 303(8):533-50.
- Pardeike J., Hommoss A., Müller R.H. **Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products.** *Int J Pharm.* 2009; 366(1-2):170-84.
- Park J.H., Saravanakuma G., Kwangmeyung K., Kwon I. **Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives.** *Advanced drug delivery reviews* 2010; 62(1): 28-41.
- Park G., Kim H.G., Kim Y.O., Park S.H., Kim S.Y., Oh M.S.. **Coriandrum sativum L. Protects Human Keratinocytes from Oxidative Stress by Regulating Oxidative Defense Systems.** *Skin Pharmacol Physiol* 2012; 25:93–99.
- Parkinson M.H., Schulz J.B., Giunti P. **Co-enzyme Q10 and idebenone use in Friedreich's ataxia.** *J Neurochem* 2013; 126(Suppl 1):125–141.
- Pereira C.F. and Oliveira C.R. **Oxidative glutamate toxicity involves mitochondrial dysfunction and perturbation of intracellular Ca²⁺ homeostasis.** *Neurosci Res* 2000; 37:227–236.
- Pierigè F. , Serafini S., Rossi L., Magnani M. **Cell-based drug delivery.** *Adv drug deliv Rev.* 2008; 60(2): 286-95.
- Podda M., Traber M.G., Weber C., Yan L.J., Packer L. **UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin.** *Free Radic Biol Med.* 1998; 24:55-65.
- Podila R. and Brown J.M. **Toxicity of engineered nanomaterials: a physicochemical perspective.** *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2013; 27: 50–55.
- Prabaharan M, Mano JF. **Synthesis and Characterization of Chitosan-graft-Poly (3-(trimethoxysilyl) propyl methacrylate) Initiated by Ceric (IV) Ion.** *J. Macromol. Sci. Part A: Pure Appl. Chem.* 2007; 44(5): 489–494.
- Prabaharan M. **Review paper: chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery.** *J Biomater Appl.* 2008; 23(1):5-36.

- Pusateri A.E., McCarthy S.J., Kenton W., Harris R.A., Cardenas L., McManus A.T., Goodwin C.W. **Effect of a chitosan-based hemostatic dressing on blood loss and survival in a model of severe venous hemorrhage and hepatic injury in swine.** *J. Trauma.* 2003; 54 (1), 177–182.
- Quintana A., Raczka E., Piehler L., Lee I., Myc A., Majoros I., Patri A.K., Thomas T., Mulé J., **Design and function of a dendrimer-based therapeutic nanodevice targeted to tumor cells through the folate receptor.** *Baker J.R. Jr. Pharm Res.* 2002; 19(9):1310-6.
- Raina A.K., Templeton D.J., Deak J.C., Perry G., Smith M.A. **Quinone reductase (NQO1), a sensitive redox indicator, is increased in Alzheimer's disease.** *Redox Rep* 1999; 4:23–27.
- Rajdl D., Racek J., Steinerova A., Novotny Z., Stozicky F., Trefil L., Siala K. **Markers of oxidative stress in diabetic mothers and their infants during delivery.** *Physiol Res* 2005; 54, 429–436.
- Rajewski R., Traiger G., Bresnahan J., Jaberaboansari P., Stella V.J., Thompson D.O. **Preliminary safety evaluation of parenterally administered sulfoalkyleter- β -cyclodextrina (SBE-beta-CD) derivatives.** *J Ocul Pharmacol Ther.* 1995; 11: 95-106.
- Ratan R.R., Murphy T.H., Baraban J.M. **Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons.** *J Neurochem* 1994; 62:376–379.
- Rauchova H., Vrbacky M., Bergamini C. **Inhibition of glycerophosphate-dependent H₂O₂ generation in brown fat mitochondria by idebenone.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 339: 362–366.
- Rauchova H., Drahota Z., Bergamini C., Fato R., Lenaz G. **Modification of respiratory-chain enzyme activities in brown adipose tissue mitochondria by idebenone (hydroxydecyl-ubiquinone).** *J Bioenerg Biomembr* 2008; 40:85–93.
- Rhaese S., von Briesen H., Rübsamen-Waigmann H., Kreuter J., Langer K. **Human serum albumin-polyethylenimine nanoparticles for gene delivery.** *J Control Release.* 2003; 92(1-2): 199-208.
- Ree K., Johnsen A.S., Rugstad H.E., Bakka A., Hovig T. **Characterization of a human epithelial cell line with special reference to its ultrastructure.** *Acta Pathol Microbiol Scand A.* 1981; 89 (2): 73-80.
- Richardson S.C. W., Kolbe H. V.J., Duncan R. **Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA.** *Int. J. Pharm.* 1999;178: 231-243.
- Richman E.K. and Hutchison J.E. **The nanomateria characterization bottleneck.** *ACS Nano* 2009; 3:2441–2446.
- Riener C.K., Kada G., Gruber H.J. **Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine.** *Anal Bioanal Chem.* 2002; 373(4–5): 266–76.

- Riss T.L., Moravec R.A., Niles A.L., Benink H.A., Worzella T.J., Minor L. **Cell Viability Assays**. *SourceAssay Guidance Manual*. 2004-2013.
- Rizzo A., Mutinati M., Spedicato M., Minoia G., Trisolini C., Jirillo F., Sciorsci R.L. **First demonstration of an increased serum level of reactive oxygen species during the peripartal period in the ewes**. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2008; 30, 741–746.
- Rossi L., Serafini S., Magnani M. **Red Blood Cell Loading: a selection of procedures in erythrocyte engineering for drug delivery and targeting**. *Academic/Plenum Publishers, New York, U.S.A.* 2003; 1-18.
- Roy I., Ohulchanskyy T.Y., Pudavar H.E., Bergey E.J., Oseroff A.R., Morgan J., Dougherty T.J., et al. **Ceramic-based nanoparticles entrapping waterinsoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy**. *J Am Chem Soc* 2003; 125: 7860-65.
- Rudolph G., Dimitriadis K., Büchner B., Heck S., Al-Tamami J., Seidensticker F., et al. **Effects of idebenone on color vision in patients with Leber hereditary optic neuropathy**. *J Neuro-Ophthalmol* 2013; 33:30–6.
- Ryan J.J., Bateman H.R., Stover A., Gomez G., Norton S.K., Zhao W., Schwartz L.B., Lenk R., Kepley C.L. **Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response**. *J Immunol*. 2007; 179(1): 665-72.
- Sahoo S.K., Labhasetwar V. **Nanotech approaches to drug delivery and imaging**. *Drug Discov Today*. 2003; 8(24):1112-20
- Sailaja A.K., Amareshwar P., Chakravarty P. **Chitosan nanoparticles as a drug delivery system**. *Res J Pharm Biol Chem Sci*. 2010; 1: 474-484.
- Salata, O. V. **Applications of nanoparticles in biology and medicine**. *J. Nanobiotechnol* 2004; 2,3.
- Salústio P.J., Pontes P., Conduto C., Sanches I., Carvalho C., Arrais J., Marques H.M. **Advanced technologies for oral controlled release: cyclodextrins for oral controlled release**. *AAPS PharmSciTech*. 2011; 12(4):1276-92.
- SantaCruz K.S., Yazlovitskaya E., Collins J., Johnson J., DeCarli C. **Regional NAD (P) H:quinone oxidoreductase activity in Alzheimer's disease**. *Neurobiol Aging* 2004; 25:63–69.
- Sapsford KE., Tyner K.M., Dair B.J., Deschamps J.R. and Medintz I.L. **Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques**. *Anal. Chem*. 2011; 83: 4453–4488.
- Saugstad O.D. **Mechanisms of tissue injury by oxygen radicals: implications for neonatal disease**. *Acta Paediatr* 1996; 85, 1–4.
- Sayes C.M. and Warheit D.B. **Characterization of nanomaterials for toxicity assessment**. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol*. 2009; 1: 660–670.

Sayin B., Somavarapu S., Li X.W., Thanou M., Sesardic D., Alpar H.O. **Mono-N-carboxymethyl chitosan (MCC) and N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles for non-invasive vaccine delivery.** *Int J Pharm.* 2008; 363(1–2):139–48.

Scanarotti C., Vernazza S., Brignone M., Danailova J., Pronzato M.A., Bassi A.M. **Evaluation of the cytotoxic effects of humid lightweight coal ash derived from the disposal of waste on normal human keratinocyte and endothelial cell lines in 2-D and 3-D culture.** *Altern Lab Anim.* 2013; 41(6):491-502.

Schnackenberg L.K., Sun J., Beger R.D. **Metabolomics techniques in nanotoxicology studies.** *Methods Mol Biol.* 2012; 926:141-56.

Schultzberg M., Segura-Aguilar J., Lind C. **Distribution of DT diaphorase in the rat brain: biochemical and immunohistochemical studies.** *Neurosci* 1988; 27:763–776.

Sedlak J., Lindsay R.H. **Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent.** *Anal. Biochem.* 1968; 25(1): 192–205.

Senin U., Parnetti L., Barbagallo-Sangiorgi G., Bartorelli L., Bocola V., Capurso A., Cuzzupoli M., Denaro M., Marigliano V., Tammaro A.E., Fioravanti M. **Idebenone in senile dementia of Alzheimer type: a multicentre study.** *Arch Gerontol Geriatr* 1992; 15:249–260.

Serini S., Donato V., Piccioni E., Trombino S., Monego G., Toesca A., Innocenti I., Missori M., De Spirito M., Celleno L., Fasano E., Ranelletti O.G., Calviello G. **Docosahexaenoic acid reverts resistance to UV-induced apoptosis in human keratinocytes: involvement of COX-2 and HuR.** *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 2011; 22(9): 874–885.

Sethi V., Onyüksel H., Rubinstein I. **Liposomal vasoactive intestinal peptide.** *Methods Enzymol.* 2005; 391: 377-95.

Shah V.P., Elkins J., Lam S.Y., Skelly J.P. **Determination of in vitro drug release from hydrocortisone creams.** *Int J Pharm.* 1989; 53:53-59.

Sharifi S., Behzaki S., Laurent S., Forrest M.L., Stroeve P., and Mahmoudi M. **Toxicity of nanomaterials.** *Chem. Soc. Rev.* 2012; 41: 2323–2343.

Sharifi S., Daghighi S., Motazacker M.M., Badlou B., Sanjabi B., Akbarkhanzadeh A., Rowshani A.T., Laurent S., Peppelenbosch, M.P. and Rezaee F. **Superparamagnetic iron oxide nanoparticles alter expression of obesity and T2D-associated risk genes in human adipocytes.** *Sci. Rep.* 2013; 3, 2173.

Shindo Y., Hashimoto T. **Ultraviolet B-induced cell death in four cutaneous cell lines exhibiting different enzymatic antioxidant defences: involvement of apoptosis.** *J Dermatol Sci.* 1998; 17(2):140-50.

Shingai M. and Moses O.O. **Nanotechnology in Drug Development and Life Cycle Management.** *Nanotechnology in Drug Delivery* 2009; 20: 597 – 619.

Siegel D., Ross D. **Immunodetection of NAD (P) H:quinine oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues.** *Free Radic Biol Med* 2000; 29:246–253.

Slater T.F., Sawyer B., Straeuli U. **Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts.** *Biochim Biophys Acta.* 1963; 77: 383-93.

Sohaebuddin S.K., Thevenot P.T., Baker D., Eaton J.W. and Tang L. **Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent.** *Part. Fibre Toxicol.* 2010; 7(22).

Spada G. **Sviluppo di sistemi nanoparticellari contenenti idrossipropil- β -ciclodestrina per il rilascio colon-specifico di farmaci.** Tesi di dottorato. Università degli Studi di Sassari, 2010.

Star A., Stoddart J.F., Steuerman D., Diehl M., Boukai A., Wong E.W., et al. **Preparation and properties of polymer-wrapped single-walled carbon nanotubes.** *Angew Chem Int* 2001; 40: 1721-25.

Stringer J.L., Gaikwad A., Gonzales B.N., Long D.J. Jr, Marks L.M., Jaiswal A.K. **Presence and induction of the enzyme NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 in the central nervous system.** *J Comp Neurol* 2004; 471:289–297.

Sugiyama Y., Fujita T., Matsumoto M. **Effects of idebenone (CV-2619) and its metabolites on respiratory activity and lipid peroxidation in brain mitochondria from rats and dogs.** *J Pharmacobiodyn.* 1985; 8:1006-1017.

Suno M. and Nagaoka A. **Inhibition of lipid peroxidation by a novel compound, idebenone (CV-2619).** *Jpn J Pharmacol* 1984a; 35:196–198.

Suno M. and Nagaoka A. **Inhibition of lipid peroxidation by a novel compound (CV-2619) in brain mitochondria and mode of action of the inhibition.** *Biochem Biophys Res Commun* 1984b; 125:1046–1052.

Suno M., Nagaoka A. **Inhibition of lipid peroxidation by idebenone in brain mitochondria in the presence of succinate.** *Arch Gerontol Geriatr.* 1989; 8 : 291–297.

Suntivich J., Xu Z., Carlton C.E., Kim J., Han B., Lee S.W., Bonnet N., Marzari N., Allard L.F., Gasteiger H.A., Hamad-Schifferli K., and Shao-Horn Y. **Surface composition tuning of Au-PT bimetallic nanoparticles for enhanced carbon monoxide and methanol electro-oxidation.** *J. Am. Chem. Soc.* 2013; 135: 7985–7991.

Suthanthiran M., Anderson M.E., Sharma V.K., Meister A. **Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via the CD2 and CD3 antigens.** *Proc Natl Acad Sci US.* 1990; 87:3343-3347.

Tada H., Shiho O., Kuroshima K. **An improved colorimetric assay for interleukin 2.** *J. Immunol. Methods* 1986; 93: 157–65.

Tadros T., Izquierdo P., Esquena J., Solans C. **Formation and stability of nanoemulsions.** *Adv Colloid Interface Sci* 2004; 109: 303–18.

Tomono Y., Hasegawa J., Seki T., Motegi K., Morishita N. **Pharmacokinetic study of deuterium-labelled coenzyme Q10 in man.** *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology* 1986; 24(10): 536–541.

- Torii H., Yoshida K., Kobayashi T., Tsukamoto T., Tanayama S. **Disposition of idebenone (CV-2619), a new cerebral metabolism improving agent, in rats and dogs.** *J Pharmacobiodyn* 1985; 8: 457–467.
- Touitou E., Fabin B. **Altered skin permeation of a highly lipophilic molecule: tetrahydrocannabinol.** *Int J Pharm.* 1988; 43:17-22.
- Trapani A., Garcia-Fuentes M., Alonso M.J. **Novel drug nanocarriers combining hydrophilic cyclodextrins and chitosan.** *Nanotechnology* 2008; 19: 185101/1-185101/10.
- Trapani A., Lopedota A., Franco M., Cioffi N., Ieva E., Garcia-Fuentes, M., Alonso M.J. **A comparative study of chitosan and chitosan/cyclodextrin nanoparticles as potential carriers for oral delivery of small peptides.** *Eur J Pharm Biopharm.* 2010; 75: 26-32.
- Trapani A., Palazzo C., Contino M., Perrone M.G., Cioffi N., Ditaranto N., Colabufo N.A., Conese M., Trapani G., Puglisi G. **Mucoadhesive Properties and Interaction with P-glycoprotein (P-gp) of Thiolated-Chitosans and -Glycol Chitosans and Corresponding Parent Polymers: A comparative study.** *Biomacromolecules* 2014; 15(3): 882-93.
- Trinei G.M., Migliaccio M., Pelicci P.G. **Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:722-8.
- Trouba K.J., Hamadeh H.K., Amin R.P., Germolec DR. **Oxidative stress and its role in skin disease.** *Antioxid Redox Signal.* 2002; (4):665-73.
- Uchegbu I.F., Vyas S.P. **Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery.** *Int J Pharm* 1998; 172(1-2): 33-70.
- Uekama K., Hirayama F., Arima H. **Recent Aspect of Cyclodextrin-Based Drug Delivery System.** *Journal J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2006; 56: 3–8.
- Untener E.A., Comfort K.K., Mauer E.I., Grabinski C.M., Comfort D.A. and Hussain S.M. **Tannic acid coated gold nanorods demonstrated a distinctive form of endosomal uptake and unique distribution within cells.** *ACS Appl Mater. Interfaces* 2013; 5: 8366–8373
- Van der Lubben I.M., Verhoef J.C., Borchard G., Junginger H.E. **Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery.** *Eur J Pharm Sci.* 2001; 14(3):201–7.
- Van der Lubben I. M., Verhoef J. C., Borchard G., Junginger H. E. **Chitosan for mucosal vaccination.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001; 52: 139–144.
- van Muiswinkel F.L., de Vos R.A., Bol J.G., Andringa G., Jansen Steur E.N., Ross D., Siegel D., Drukarch B. **Expression of NAD (P) H quinone oxidoreductase in the normal and Parkinsonian substantianigra.** *Neurobiol Aging* 2004; 25:1253–1262.
- Vitale N., Kisslinger A., Paladino S., Procaccini C., Matarese G., Pierantoni G.M., Mancini F.P., Tramontano D. **Resveratrol Couples Apoptosis with Autophagy in UVB Irradiated HaCaT Cells.** *Plos One* 2013; 8: 11.

Wang Y., Santa-Cruz K., DeCarli C., Johnson J.A. **NAD (P) H: quinone oxidoreductase activity is increased in hippocampal pyramidal neurons of patients with Alzheimer's disease.** *Neurobiol Aging* 2000; 21:525–531.

Wang Y. and Hekimi S. **Molecular genetics of ubiquinone biosynthesis in animals.** *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 2013; 48 (1): 69–88.

Warheit D.B. **How to measure hazards/risks following exposures to nanoscale or pigment-grade titanium dioxide particles.** *Toxicol. Lett.* 2013; 220: 193–204.

Wickline S.A.; Neubauer A.M., Winter P., Caruthers S, Lanza G. **Applications of nanotechnology to atherosclerosis, thrombosis, and vascular biology.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26(3):435-41.

Williams AC. **Transdermal and Topical Drug Delivery.** *London: Pharmaceutical Press;* 2003.

Williams AC, Barry BW. **Penetration enhancers.** *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56(5):603–618.

Wu G., Fang Y.Z., Yang S., Lupton J.R., Turner N.D. **Glutathione metabolism and its implications for health.** *J Nutr.* 2004; 134(3):489-92.

Wu Y.L., Putchu N., Ng K.W., Leong D.T., Lim C.T., Loo S.C. and Chen X. **Biophysical responses upon the interaction of nanomaterials with cellular interfaces.** *Acc. Chem. Res.* 2013; 46: 782–791.

Yamada K., Tanaka T., Han D., Senzaki K., Kameyama T., Nabeshima T. **Protective effects of idebenone and alpha-tocopherol on beta-amyloid-(1-42)-induced learning and memory deficits in rats: implication of oxidative stress in beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo.** *Eur J Neurosci* 1999; 11:83–90.

Yu B., Zhang Y., Zheng W., Fan C. and Chen T. **Positive surface charge enhances selective cellular uptake and anticancer efficacy of selenium nanoparticles.** *Inorg. Chem.* 2012; 51: 8956–8963.

Yousefpour P., Atyabi F., Dinarvand R., Vasheghani-Farahani E. **Preparation and comparison of chitosan nanoparticles with different degrees of glutathione thiolation.** *DARU* 2011; 19 (5): 376-375.

Xiao-yan, Pei-ying H.E., Juan D.U., Jian-zhong Z. **Quercetin in combating H₂O₂ induced early cell apoptosis and mitochondrial damage to normal human keratinocytes.** *Chin Med J* 2010; 123(5):532-536.

Zeller J. M., Rothberg L., Landay A. L. **Evaluation of human monocyte oxidative metabolism utilizing a flow cytometric assay.** *Clin. exp. Immunol.* 1989; 78, 91-96

Zhang J.A., Anyarambhatla G., Ma L., Ugwu S., Xuan T., Sardone T., Ahmad I. **Development and characterization of a novel Cremophor EL free liposome-based paclitaxel (LEP-ETU) formulation.** *Eur J Pharm Biopharm* 2005; 59(1): 177-87.

Zhang L., Webster T.J. **Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration.** *Nanotoday* 2009; 4(1): 66–80.

Ziglari T., Allameh A. **The significance of glutathione conjugation in aflatoxin metabolism.** *Agricultural and Biological Sciences* » "Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects", book edited by Mehdi Razzaghi-Abyaneh, 2013.

Zheng X., Lu J., Deng L., Xiong Y., Chen J. **Preparation and characterization of magnetic cationic liposome in gene delivery.** *International Journal of Pharmaceutics* 2009; 366: 211-217.

Zhu X., Sun J., Wu J. **Study on the inclusion interactions of B-cyclodextrin and its derivative with dyes by spectrofluorimetry and its analytical application.** *Talanta* 2007; 72: 237–242.

Zhu Z.J., Wang H., Yan B., Zheng H., Jiang Y., Miranda O.R., Rotello V.M., Xing B. and Vachet R.W. **Effect of surface charge on uptake and distribution of gold nanoparticles in four plant species.** *Environ. Sci. Technol.* 2012; 46: 12391–12398.

Una scelta, un cammino, un traguardo, ed è così che vorrei ricordare la bellissima esperienza del mio dottorato vissuta nel Dipartimento di Biologia Molecolare.

Un'esperienza che mi ha consentito non solo di approfondire le mie conoscenze nell'ambito della ricerca biochimica e farmacologica, ma mi ha consentito anche di circondarmi di gente meravigliosa così diversa e così speciale nello stesso tempo, i professori, i tecnici, le mie colleghe di dottorato ma soprattutto amiche di avventura.

Vorrei rivolgere il mio ringraziamento in particolar modo alla professoressa Chiarantini, da lei ho imparato che i risultati migliori si ottengono solo con la grinta e la determinazione, perchè anche dopo una caduta ci si può rialzare più forti.

Vorrei ringraziare la mia famiglia, Papà, Mamma, Nicolò, Rosario e Giada, perché per quanto lontani mi sono sempre stati vicini, gli sarò sempre grata per la forza e il coraggio che hanno avuto nell'accettare tutte le scelte e le decisioni che ho preso nella mia vita, sempre con il sorriso sulle labbra, sempre con tanto amore.

Ringrazio Sergio, Eliana, Giulia e Davide, perché con tanto affetto mi hanno accolto nella loro famiglia, perchè ogni giorno che passa mi regalano un motivo in più per essere felice in questa bellissima città, così lontana dalla mia terra eppure così vicina al mio cuore.

E poi ringrazio colui che mi ha fatto credere ancora nelle favole, quelle che finiscono con “..e vissero felici e contenti..”, colui che ha dato senso alla parola “per sempre”, colui che mi ha insegnato a guardare il lato migliore delle cose, che mi ha aiutato a crederci ancora, che mi ha dato la forza di non mollare mai.

Grazie Gabri perché hai reso la mia vita bella da morire, galeotto fu questo dottorato che ci ha fatto incontrare.