

Nanoparticelle di magnetite rivestite con polivinilpirrolidone (Fe₃O₄NP): valutazione del profilo tossicologico in cellule del SNC

T. Coccini¹, C.A. Locatelli¹, E. Buscaglia¹, F. Sfolcini², D. Lonati¹, U. De Simone¹

¹Laboratorio di Tossicologia Clinica e Sperimentale, Centro Antiveleni di Pavia e Centro Nazionale di Informazione Tossicologica - Unità di Tossicologia, IRCCS Fondazione Salvatore Maugeri, Istituto Scientifico di Pavia, Italia; ²Università di Pavia, Italia

Le nanoparticelle (NP) magnetiche di ossido di ferro come la magnetite (Fe₃O₄NP), grazie alle loro proprietà fisico-chimiche e superparamagnetiche, sono ampiamente utilizzate in numerose applicazioni industriali quali: audio speaker, sensori di posizione, purificazione dell'acqua da metalli pesanti; e mediche come: drug o gene delivery, imaging, agenti di contrasto. Sebbene vi siano evidenze sperimentali che Fe₃O₄NP possa raggiungere il sistema nervoso centrale, indipendentemente dalla via di somministrazione-inalatoria, intravenosa o intraperitoneale- pochi sono ancora i dati relativi alle interazioni molecolari di queste NP nelle cellule cerebrali. In particolare, è noto il ruolo degli astrociti nel mantenimento dell'omeostasi dei metalli incluso il ferro (Fe) il cui accumulo nel tessuto cerebrale sembra, da studi sperimentali, essere associato a malattie neurodegenerative quali: Alzheimer, Parkinson, Huntington.

Gli effetti tossici indotti dopo esposizione (4,24,48 h) a dosi crescenti (1-100µg/ml) di Fe₃O₄NP sono stati valutati in due linee cerebrali umane (astrocitoma: D384 e neuroblastoma: SH-SY5Y) mediante determinazione di: i) attività mitocondriale con MTT assay; ii) integrità di membrana con calceina-AM/PI; iii) morfologia cellulare in microscopia a contrasto di fase. È stato altresì valutato l'accumulo intracellulare di NP mediante colorazione con Blu di Prussia.

Attività metabolica: Nelle cellule D384, Fe₃O₄NP induceva alterazioni dose- e tempo-dipendenti dell'attività mitocondriale: dopo solo 4h, si osservava un decremento del 25-30% della vitalità cellulare a dosi comprese tra 25 e 100 µg/ml, vitalità ulteriormente ridotta del 35-55% a dosi tra 10 e 100 µg/ml dopo 24h, e del 25-75% dopo 48h a dosi tra 1 e 100 µg/ml.

Le SH-SY5Y erano meno suscettibili a Fe₃O₄NP rispetto alle D384: gli effetti sull'attività mitocondriale si riscontravano solo dopo 48h con una mortalità cellulare del 35-45% alle dosi comprese tra 10 e 100 µg/ml.

Integrità di membrana: in entrambe le linee cellulari non è stato osservato alcun danno alle membrane cellulari per ogni dose di Fe₃O₄NP testata e per tutti i tempi considerati.

Valutazione della morfologia cellulare: gli astrociti mostravano alterazioni morfologiche (cellule tondeggianti anziché stellate) dopo 48h alle dosi di Fe₃O₄NP di 50 e 100 µg/ml con presenza di corpi elettron-densi intracellularmente a differenza di quanto osservato per le SH-SY5Y in cui i corpi elettron-densi erano presenti solo nel terreno di coltura rendendo poco visibili le cellule alla dose di 100 µg/ml, mentre a dosi inferiori ≤50 µg/ml per tutti i tempi considerati le cellule neuronali non presentavano alterazioni morfologiche.

Internalizzazione: L'accumulo di Fe₃O₄NP all'interno delle D384 era dose- e tempo-dipendente: spot blu erano visibili a partire dalla dose di 10 µg/ml già dopo 4h. Nelle SH-SY5Y, al contrario, Fe₃O₄NP era marcatamente visibile nell'ambiente extra-cellulare, e scarsamente presente all'interno dei neuroni. Ciò era in accordo anche con quanto osservato mediante microscopia in contrasto di fase.

I risultati ottenuti indicano che: i) Fe₃O₄NP alterava unicamente la funzione mitocondriale, e le D384 erano molto più sensibili rispetto alle SH-SY5Y; ii) le dosi critiche per le D384 erano 25 µg/ml dopo 4h e 1 µg/ml dopo 48h, mentre per le SH-SY5Y la dose critica era di 10 µg/ml dopo 48h; iii) Fe si accumulava in maniera dose- e tempo-dipendente prevalentemente negli astrociti.

In sintesi, considerando il fondamentale ruolo degli astrociti nella regolazione dell'equilibrio dei metalli, e l'ampio utilizzo di queste NP in diversi campi (biomedico e industriale), la potenziale tossicità dovuta a un uso prolungato di Fe₃O₄NP potrebbe alterare lo stato di omeostasi andando a compromettere il normale funzionamento del SNC. (Fondi: Ministero Italiano della Salute, Ricerca e Formazione, e Fondazione Cariplo Rif.2011-2096).