

STUDIO DELL'INTERNALIZZAZIONE DA PARTE DELLE CELLULE EPITELIALI DELL'INTESTINO DI RATTO DI NANOPARTICELLE MEDICATE CON ESTRATTI DEL VINO ROSSO

Le malattie cardiovascolari, che rappresentano la principale causa di morte nel mondo occidentale, nella maggior parte dei casi sono caratterizzate da una disfunzione endoteliale. Questo fenomeno, causato da livelli elevati di LDL ossidate, da radicali liberi, dall'avanzamento dell'età, comporta la proliferazione di cellule della muscolatura liscia vascolare, l'aggregazione piastrinica, la formazione di placche aterosclerotiche e la diminuzione della biodisponibilità di NO.

A partire dal *paradosso francese*, secondo cui il vino rosso avrebbe effetti benefici sul sistema cardio-circolatorio, i polifenoli sono stati oggetto di numerosi studi riguardo ai meccanismi mediante i quali non solo esplicano un'attività antiossidante, ma contrastano anche la disfunzione endoteliale.

Poiché l'assunzione di vino rosso non consente di assorbire quantità significative di polifenoli, senza che si assumano anche eccessive quantità di alcol, si è focalizzata l'attenzione sull'utilizzo di estratti di polifenoli. Per garantirne un adeguato assorbimento, si è pensato di incapsulare tali estratti all'interno di nanoparticelle di chitosano, materiale biocompatibile, biodegradabile e non tossico. Questi sistemi di rilascio promettono la protezione dell'estratto dall'azione enzimatica, consentendone la somministrazione orale; promettono inoltre, grazie alle capacità di mucoadesione e apertura delle giunzioni strette delle cellule epiteliali, un adeguato assorbimento.

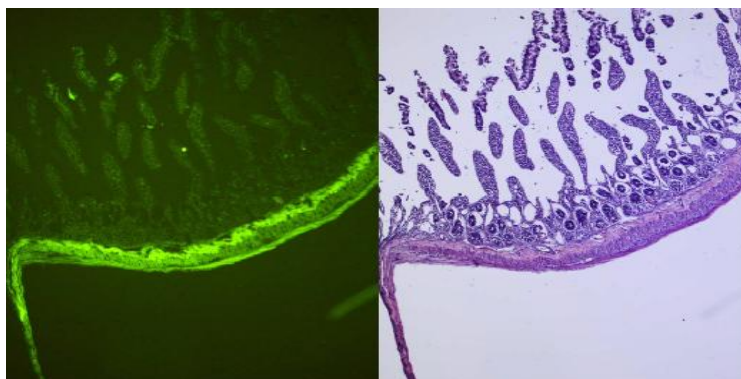
Il chitosano depolimerizzato aveva un peso molecolare viscosimetrico di 200 kDa. Sono stati sintetizzati derivati del chitosano, funzionalizzati con piccole catene laterali, costituite da gruppi ammoniacali quaternari adiacenti, partendo dal chitosano da noi depolimerizzato (sigla, N⁺-rCh); la reazione è stata condotta a 60°. Successivamente sui derivati N⁺-rCh, sono stati introdotti gruppi tiolici attraverso la formazione di legami ammidici con acido tioglicolico, ottenendo N⁺-rCh-SH. I polimeri sono stati resi fluorescenti con fluoresceina isotiocianato.

Con i derivati N⁺-rCh e N⁺-rCh-SH, sono state preparate nanoparticelle per reticolazione ionotropica con acido ialuronico da noi depolimerizzato. Le nanoparticelle contenenti estratto, sono state caratterizzate per dimensioni, efficienza di incapsulamento dell'estratto, dimensioni dopo ridispersione del liofilizzato, stabilità dopo un mese di conservazione del liofilizzato. Le nanoparticelle fluoresceinate sono state caratterizzate per dimensione e sono state utilizzate per seguire la loro internalizzazione da parte delle cellule epiteliali dell'intestino isolato di ratto.

Gli estratti sono stati caratterizzati mediante HPLC massa. Sono stati identificati i picchi dei componenti più abbondanti, tra cui quello della catechina che è stato scelto per seguire l'andamento della concentrazione degli estratti nel sangue, nelle programmate prove farmacocinetiche nel ratto. Al fine di valutare la progressione del fenomeno dell'internalizzazione delle nanoparticelle da parte delle cellule dell'intestino isolato di ratto, l'epitelio è stato isolato e montato in celle di tipo Franz ed esposto dal lato mucosale ad una sospensione di nanoparticelle medicate e fluoresceinate. L'esposizione è stata condotta per 1, 2 o 3 ore, dopodiché ciascun segmento di epitelio è stato fissato in formalina, inserito in calchi di cera e osservato al microscopio a fluorescenza.

Risultati: le dimensioni medie delle nanoparticelle determinate immediatamente dopo la loro preparazione, e dopo ridispersione dei loro liofilizzati erano sempre comprese tra 290 e 560 nm. L'efficienza di incapsulamento era sempre maggiore di 80% e non significativamente diversa tra i due tipi di nanoparticelle. Le nanoparticelle sono state preparate anche utilizzando un tampone

fosfato ipoosmotico (pH 7.4, 0.026 M) con l'obiettivo di ottenere liofilizzati che potevano essere ripresi in un volume 5 volte minore rispetto a quello iniziale ottenendo una sospensione isoosmotica. In questo modo era possibile concentrare la quantità di estratti nella sospensione da testare nelle successive prove ex vivo. Le dimensioni delle nanoparticelle ottenute per ridispersione del liofilizzato non erano significativamente diverse da quelle di partenza. Le nanoparticelle sono risultate stabili per 24 ore come tali e dopo un mese dalla loro liofilizzazione.



Epitelio intestinale di ratto esposto per un'ora a nanoparticelle N⁺rCh-SH

Dalle foto si evince che già dopo un'ora di contatto delle nanoparticelle N⁺rCh-SH con l'epitelio dell'intestino isolato di ratto, esse erano state internalizzate ed avevano raggiunto integre gli strati muscolari più profondi.

Conclusioni: il liofilizzato delle nanoparticelle è risultato stabile almeno per un mese dalla preparazione e facilmente rigenerabile per aggiunta di un appropriato volume di acqua e blanda agitazione. Le nanoparticelle venivano internalizzate dalle cellule dell'intestino isolato del ratto e si ritrovavano integre negli strati vascolarizzati del tessuto intestinale. Ciò incoraggia a proseguire nello studio della farmacocinetica degli estratti intrappolati in nanoparticelle e nella ottimizzazione di un sistema farmaceutico efficace nella prevenzione delle malattie cardiovascolari.

Relatore: Dott.ssa Ylenia Zambito

SSD: CHIM 09