



DI  
C  
Ma  
PI

Dipartimento  
di Ingegneria Chimica,  
dei Materiali e della  
Produzione Industriale  
Università degli Studi  
di Napoli Federico II



ISTITUTO ITALIANO DI TECNOLOGIA  
CENTER FOR ADVANCED BIOMATERIALS FOR HEALTHCARE

*Dottorato di Ricerca in*

*Ingegneria dei Prodotti e dei Processi Industriali*

Tesi di Dottorato – XXXII Ciclo

**NANOSTRATEGIE DI TARGETING PER L'IMAGING  
DELL'ATEROSCLEROSI**

Coordinatore

Prof. Giuseppe Mensitieri

Supervisor:

Prof. Paolo Antonio Netti

Dr-Ing. Enza Torino

Candidato

Dott. Agnese Grassia

## **Sommario**

<b>ABSTRACT</b>	<b>5</b>
<b>NANOSTRATEGIE DI TARGETING PER L'IMAGING DELL'ATEROSCLEROSI</b>	<b>5</b>
<b>CAPITOLO 1 INTRODUZIONE</b>	<b>8</b>
<b>ATEROSCLEROSI: LA PATOLOGIA</b>	<b>8</b>
<b>STUDIO DELLA INSTABILITA' DELLE PLACCHE ATEROSCLEROTICHE</b>	<b>9</b>
<b>LE TECNICHE DI IMAGING NELLO STUDIO DELLE PLACCHE ATEROSCLEROTICHE</b>	<b>14</b>
<b>STATO DELL'ARTE</b>	<b>16</b>
<b>RM E AGENTI DI CONTRASTO</b>	<b>16</b>
<b>NANOMEDICINA, IMAGING E ATEROSCLEROSI</b>	<b>20</b>
<b>ATEROSCLEROSI E NANOTECNOLOGIA: STATO DELL'ARTE</b>	<b>22</b>
<b>TARGETING DELLE NANOPARTICELLE NELL'ATEROSCLEROSI</b>	<b>35</b>
<b>CD36, un recettore scavenger implicato nell'aterosclerosi</b>	<b>39</b>
<b>CAPITOLO 2: OBIETTIVO DEL PROGETTO DI DOTTORATO E CONDUZIONE DELLA CAMPAGNA SPERIMENTALE.</b>	<b>42</b>
<b>PROGETTAZIONE DEL NANOVETTORE</b>	<b>43</b>
<b>DIMENSIONE</b>	<b>44</b>
<b>FORMA</b>	<b>46</b>
<b>HYDRODENTICITY</b>	<b>47</b>
<b>CARICA SUPERFICIALE</b>	<b>48</b>

FUNZIONALIZZAZIONE DELLA SUPERFICIE CON POLIETILEN GLICOLE	48
FUNZIONALIZZAZIONE SUPERFICIALE	49
<b>PIANIFICAZIONE SPERIMENTALE</b>	<b>50</b>
<b>CAPITOLO 3: PARTE SPERIMENTALE</b>	<b>55</b>
<b>PARAGRAFO 3.1: PRODUZIONE DELLE GD-HA-NPS E LORO CARATTERIZZAZIONE</b>	<b>55</b>
MATERIALI E METODI	55
RISULTATI E DISCUSSIONE	60
Studio della stabilità dell'emulsione	60
Preparazione di nanoparticelle reticolate con DVS con e senza CA.	60
Purificazione e caratterizzazione di HA-NPs	62
CONCLUSIONI	64
<b>PARAGRAFO 3.2: FUNZIONALIZZAZIONE</b>	<b>65</b>
INTRODUZIONE	65
MATERIALI E METODI	67
Materiali	67
PRODUZIONE E CARATTERIZZAZIONE	67
RISULTATI E DISCUSSIONE	69
Quantificazione dei gruppi carbossilici sulla superficie delle NP HA reticolato	69
Ottimizzazione streptavidina NPs	69
Coniugazione diretta con anti-cd36	70
Coniugazione indiretta con l'anticorpo anti cd36	71
Caratterizzazione delle NPs	72
CONCLUSIONI	73
<b>PARAGRAFO 3.3: CARATTERIZZAZIONE PLACCA ATEROSCLEROTICA</b>	<b>74</b>
MATERIALI E METODI	74

PREPARAZIONE CAMPIONI PER MICROSCOPIA ELETTRONCA	74
RISULTATI E DISCUSSIONI	76
Caratterizzazione della placca aterosclerotica	76
<b>PARAGRAFO 3.4: STUDIO EX-VIVO INTERAZIONE Gd-HA-NPs/PLACCA ATEROSCLEROTICA</b>	<b>78</b>
INTRODUZIONE	78
MATERIALI E METODI	78
RISULTATI E DISCUSSIONI	81
Ex-vivo imaging – risultati preliminari	81
Caratterizzazione interazione placca aterosclerotica umana-NPs-Gd	85
CONCLUSIONI	87
<b>CAPITOLO 4: CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE</b>	<b>88</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>89</b>

## ABSTRACT

# Nanostrategie di targeting per l'imaging dell'aterosclerosi

## TARGETING NANO-STRATEGIES FOR IMAGING OF ATHEROSCLEROSIS

L'obiettivo del mio progetto di dottorato di ricerca è stata la progettazione, produzione e caratterizzazione di nanostrutture biocompatibili, costituite da polimeri altamente idrofilici di origine naturale e molecole attive, in particolare mezzi di contrasto per risonanza magnetica nucleare (MRI), nel caso specifico Gd chelato, per l'imaging diagnostico dell'aterosclerosi.

L'aterosclerosi è una patologia caratterizzata dalla formazione di tipiche placche lipidiche che determinano il restringimento del lume di vasi di medie e grandi dimensioni. La pericolosità della patologia non è legata al grado di stenosi del vaso, quanto alla composizione della placca che può determinarne fenomeni di instabilità con conseguente manifestazione di sintomi clinici quali ictus, infarto e ischemia.

Le attuali tecniche diagnostiche sono basate sugli indici dei fattori di rischio o sulla valutazione del grado di stenosi del vaso, pertanto esse non permettono una valida diagnosi preventiva delle complicanze cliniche della patologia, che conta 18 milioni di morti l'anno con proiezioni in crescita per il futuro e rappresenta la prima causa di ospedalizzazione. È evidente quindi l'utilità e la necessità di attuare nuove tecniche diagnostiche efficaci durante le fasi silenziose della malattia, per evitare le complicanze conseguenti alla instabilità della placca. Le tecniche diagnostiche auspicabili dovrebbero dare non tanto informazioni sul grado di stenosi, bensì sulla morfologia della lesione aterosclerotica. La risonanza magnetica (RM) è tra le tecniche diagnostiche più utilizzate in campo medico e

consente di ottenere informazioni 3D anatomiche e funzionali dei tessuti molli. Al fine di incrementare la sensibilità della MRI, vengono somministrati al paziente per via intravenosa mezzi di contrasto (mdc), che, nella più diffusa pratica clinica sono a base di gadolinio (Gd). Nonostante la loro utilità clinica, questi agenti richiedono lunghi tempi di scansione, hanno una rapida *clearance* renale, e possono anche comportare gravi rischi per la salute dei pazienti a causa della loro biodistribuzione aspecifica e del loro effetto collaterale di determinare una sindrome detta "fibrosi nefrogenica sistemica", che si può presentare clinicamente anche a distanza di tempo dalla somministrazione.

Emerge chiaramente la necessità di disporre di un sistema diverso in grado di potenziare quelli che sono gli attuali agenti di contrasto.

La nanomedicina, con l'impiego di *carrier* di dimensioni nanometriche offre l'opportunità di veicolare in maniera specifica il mdc al sito bersaglio e di svolgere una funzione protettiva contro la destabilizzazione del Gd chelato. Inoltre, la presenza di una struttura polimerica di rivestimento, soprattutto se idrofilica, ha effetti positivi sulle prestazioni dell'agente di contrasto nell'imaging della MR. Pertanto l'utilizzo di un carrier nanometrico per l'agente di contrasto offre l'opportunità di funzionalizzare ad hoc la superficie del nanovettore per consentire il targeting attivo del sito di interesse in modo da migliorarne l'efficacia e quindi ridurre le dosi di somministrazione e di conseguenza la tossicità sistemica, attraverso un'azione selettiva, specifica ed efficace.

La peculiare disfunzionalità dell'endotelio vascolare nell'aterosclerosi lo rende un candidato naturale per il targeting attivo, in quanto fornisce un ampio spettro di bersagli. In particolare, un ottimo bersaglio della placca aterosclerotica è il recettore *scavenger* (SRCD36) specifico dei macrofagi, cellule attive nel processo di formazione della placca aterosclerotica.

Per la realizzazione del carrier, il primo step è stata la produzione di nanoparticelle polimeriche di acido ialuronico (Hyaluronic Acid, HA) contenenti il gadolinio (Gd) come agente di contrasto, (HA-NPs- Gd), con caratteristiche opportunamente progettate per l'imaging delle placche aterosclerotiche (AP). Sono state ottenute HA-NPs reticolate stabili che incapsulano Gd-DTPA utilizzando un metodo basato sulle nanoemulsioni W/O, producendo delle gocce con dimensione media di 200 nm di forma sferica. Utilizzando la nanoemulsione come microreattore è stato

possibile modulare finemente la struttura del nanovettore, garantendo un controllo preciso sulla reticolazione dell'hydrogel che ha permesso di migliorare il grado di idratazione del Gd chelato concentrando le molecole d'acqua nel suo intorno con conseguente miglioramento della sua efficacia per effetto dell'*hydrodentcity*. L'*hydrodentcity* è infatti una proprietà degli hydrogels che, quando opportunamente reticolati, formano delle maglie elastiche che regolano la pressione osmotica dell'acqua, migliorano lo scambio acquoso con il chelato, quindi la sua rilassività<sup>1,2</sup>.

Dopo aver determinato la quantità dei gruppi carbossilici dell'HA sulla superficie delle nanoparticelle disponibili per la funzionalizzazione, una reazione di ammidazione ha permesso di coniugare, direttamente e indirettamente, l'anticorpo anti-CD36, specifico per il targeting della placca aterosclerotica. In seguito si è poi passati alla sperimentazione ex-vivo su placche carotidiche umane prelevate per endoarterectomia e successivamente trattate per fissazione biologica e chimica per poterne studiare le caratteristiche morfologiche attraverso l'utilizzo della microscopia elettronica a trasmissione e a scansione. È stato poi condotto uno studio sulla veicolazione mirata, tramite lo studio di internalizzazione nella placca aterosclerotica e in via preliminare, uno studio MRI del miglioramento delle proprietà rilassometriche delle nanoparticelle funzionalizzate per l'imaging della placca.

Questo lavoro ha contribuito alla conoscenza sia scientifica che tecnologica nel settore dell'imaging delle placche aterosclerotiche. In breve, il protocollo utilizzato per produrre le NP biocompatibili fornisce una potenziale via sintetica per progettare una vasta gamma di mdc nanostrutturati altamente efficienti; le dimensioni delle NP risultanti sono in un intervallo che le rende idonee per la diffusione nelle cellule e la distribuzione in determinati tessuti a livello vascolare; attraverso il controllo dei parametri strutturali dell'idrogel c'è la possibilità di migliorare le proprietà rilassometriche del mdc per aprire la strada a nuovi progressi nella progettazione di nanovettori per la diagnosi e la terapia. Infine è stata approssiata con successo la detection e la conoscenza dell'elaborazione MRI di questi complessi sistemi.

# Capitolo 1 INTRODUZIONE

## ATEROSCLEROSI: LA PATOLOGIA

L'aterosclerosi è una patologia subdola e asintomatica ma che può causare gravi eventi clinici improvvisi come l'infarto o l'ictus<sup>3</sup>. E' una patologia infiammatoria lenta e progressiva caratterizzata da un ispessimento delle pareti arteriose e dalla formazione delle caratteristiche placche.

Inoltre, è noto che il grado di stenosi luminale è solo un indicatore indiretto del processo aterosclerotico<sup>4</sup>. Il processo inizia nei primi anni di vita e progredisce gradualmente per decenni in maniera silente. Avviene nella parete vasale vascolare, in particolare nella tonaca intima, attraverso tre fasi.

La stria lipidica è la tipica lesione della prima fase silente del processo aterosclerotico. Successivamente sia ha la formazione di una lesione fibrolipidica, il tipico cappuccio fibroso, caratteristica della seconda fase di stabilizzazione della placca aterosclerotica.

Le placche aterosclerotiche, prima di diventare fibrocalcifiche, sono vulnerabili e pertanto presentano un rischio elevato di rottura. Una volta diventate fibrocalcifiche, ossia costituite principalmente da collagene e calcificazioni, risultano stabili; tuttavia nella fase di formazione delle microcalcificazioni, il cappuccio fibroso, che copre un nucleo ricco di lipidi, diventa sottile e indebolito, rendendo vulnerabile la placca. Le placche ricche di calcio sono costituite da varie composizioni elementari sottoforma di idrossiapatite e ossalato di calcio<sup>5</sup>. Questa è ancora una fase clinica silente ma diagnosticabile.

Progressivamente le placche sopradescritte possono ingrandirsi occludendo il lume vasale fino al 90% senza dare segni clinicamente evidenti.

Le manifestazioni cliniche dell'aterosclerosi sono dovute soltanto alle complicanze della lesione per trombosi in seguito a ulcerazione della superficie endoteliale, rottura della capsula fibrosa o emorragia dei microvasi interni alla lesione, ossia quando la placca diventa instabile (o vulnerabile).

E' da sottolineare che la vulnerabilità della placca è indipendente dal grado di stenosi del lume vasale, mentre è strettamente correlata alla composizione della placca.



La necessità di individuare lesioni aterosclerotiche importanti già in una fase prepatologica e addirittura quella di scoprire alterazioni vascolari precoci in grado di predire la progressione o l'instabilità della patologia, ha portato all'utilizzo di diverse tecniche diagnostiche<sup>6,7</sup> per comprendere anche le più fini caratteristiche delle placche aterosclerotiche e cercare di valutare in modo più preciso il rischio di progressione o instabilizzazione<sup>5</sup>

## STUDIO DELLA INSTABILITA' DELLE PLACCHE ATEROSCLEROTICHE

Le tecniche diagnostiche basate sulla valutazione del grado di stenosi del vaso, non permettono una valida diagnosi preventiva delle complicanze cliniche della patologia, quali ischemia, infarto del miocardio, ictus.

Si conoscono poco i processi fisiopatologici che rendono una lesione coronarica instabile<sup>6</sup>. Gli studi più recenti hanno attribuito un ruolo importante all'accumulo di lipidi nella parete vasale, ma questo non descrive esattamente quale lesione ricca di lipidi si complicherà e causerà un evento. Nella complessa patogenesi delle Sindromi Coronariche Acute (SCA) non siamo ancora in grado di valutare con precisione il rischio aggiuntivo legato all'infiammazione, all'erosione o all'emorragia della placca stessa<sup>7-9</sup>.

La progressione dell'aterosclerosi è purtroppo molto complessa e si associa, per un meccanismo di apoptosi o di necrosi, alla morte di cellule endoteliali, cellule schiumose (*foam cells*) e cellule muscolari lisce<sup>6</sup>. Questo processo forma il *core* necrotico ed accresce il *pool* lipidico, elemento chiave per la vulnerabilità della placca<sup>9,10</sup>. Col tempo si formano depositi di calcio e nelle fasi avanzate spesso compaiono un'intensa vascolarizzazione della placca ed una neoangiogenesi, fenomeni favorevoli all'infiammazione e la crescita della placca<sup>11</sup>. E' noto che il meccanismo più frequente di trombosi coronarica consiste nella rottura della capsula fibrosa con esposizione del core lipidico al lume vasale<sup>12</sup>.

Le lesioni aterosclerotiche si sviluppano tipicamente a livello della biforcazione della carotide comune in carotide interna ed esterna, in quanto a livello della biforcazione si ha un cambiamento della forza tangenziale (*Shear Stress*) del

flusso ematico, determinando uno stimolo sull'endotelio vascolare e favorendo la deposizione di colesterolo nella zona subintimale del vaso. Dal momento che la presenza di una placca aterosclerotica nel distretto carotideo, con la conseguente stenosi del vaso, è considerata una condizione di elevato rischio di eventi clinici cerebrovascolari, ne consegue che oggi giorno una valutazione del rischio per lo sviluppo di eventi cerebrali si può determinare routinariamente con la valutazione del grado di stenosi carotidea attraverso esami come l'Eco-Color-Doppler che permette di individuare la stenosi esaminando l'aumento della velocità del flusso ematico in corrispondenza della stenosi. Per valutare la vulnerabilità della placca, ossia della possibilità che essa possa andare incontro a fenomeni emorragici, alla rottura del cappuccio fibroso e a trombosi, attualmente si indaga l'ecostruttura della placca: una disomogeneità ecostrutturale o ulcere superficiali sono indice di una placca instabile. La valutazione della placca considerando la sua ecogenicità viene eseguita mediante il "Gray Scale Measurement" cioè la misurazione della scala di grigi della placca durante la valutazione B-mode all' Eco-Color-Doppler, identificando con valori più bassi, dovuti all'ipoecogenicità, le placche ricche in colesterolo, povere di calcio e con poca componente fibrosa nella sua superficie (placche instabili), mentre presentano valori più elevati, dovuti all'iperecogenicità, placche con una componente calcifica maggiore, una minore presenza di colesterolo e una composizione prevalentemente fibrosa, placche stabili a minore rischio embolico<sup>13,14,15,16</sup>.

Tuttavia per una giusta valutazione della vulnerabilità della placca è opportuno individuare all'interno di essa quegli elementi flogistici, quali i macrofagi e le cellule schiumose, che rappresentano un indice della sua instabilità.

Strutturalmente la placca aterosclerotica, localizzata nell'intima, è costituita da un nucleo centrale lipidico (core lipidico) ed è ricoperta da un cappuccio fibroso, (fibrous cap). Inoltre sono costituite principalmente da elementi cellulari: cellule muscolari lisce, macrofagi e leucociti, tessuto connettivo della matrice extracellulare, collagene, fibre elastiche e proteoglicani e depositi lipidici intra ed extra cellulari. Le proporzioni relative di queste componenti variano nelle differenti placche, dando luogo ad un ampio spettro di lesioni con diverso grado di instabilità. Il "fibrous cap" di rivestimento è formato da cellule muscolari lisce,

scarsi leucociti e tessuto connettivo relativamente denso. L'area cellulata situata sotto e al fianco della capsula fibrosa - la "spalla" - è costituita da macrofagi, cellule muscolari lisce e linfociti T. Nel nucleo, più profondo e spesso necrotico, si localizza una massa disorganizzata di materiale lipidico, costituita da cristalli di colesterolo, detriti cellulari, trombi ed altre proteine plasmatiche. I lipidi sono costituiti fondamentalmente da colesterolo e da suoi esteri. Sono presenti cellule che hanno fagocitato questo materiale lipidico, dette "cellule schiumose": principalmente monociti circolanti attivati in macrofagi, e cellule muscolari lisce attivate. Infine, soprattutto nella periferia delle lesioni, sono frequenti aspetti di neovascolarizzazione, rappresentati da proliferazione di vasi sanguigni più o meno maturi. Le variazioni nelle caratteristiche istologiche delle placche dipendono, oltre che dal contenuto in lipidi, dal numero di cellule muscolari lisce e macrofagi, dalla quantità di collagene e dagli altri componenti extracellulari<sup>17</sup>.

**Ruolo del flusso ematico.** A supporto del ruolo del flusso ematico e dell'influenza del basso "Shear Stress" dovuto alla perdita di forza tangenziale conseguente alla variazione da flusso laminare a turbolento nell'insorgenza delle placche aterosclerotiche, è la localizzazione stessa delle placche che si presentano più tipicamente a livello di biforcazioni<sup>18 19</sup>, ovvero si ritiene che il flusso così modificato, con livelli variabili di stress parietali, causi locali disfunzioni endoteliali e predisponga quindi allo sviluppo di lesioni in queste sedi.

**Ruolo dei macrofagi.** Le cellule dell'infiammazione, in particolare i macrofagi e i linfociti T, rappresentano la componente attiva e dinamica all'interno della placca aterosclerotica. Essi si localizzano nella placca grazie all'espressione endoteliale di molecole di adesione (ICAM1 e VCAM1), che ne permettono la migrazione a livello sub-intimale dove maturano in macrofagi<sup>20</sup>. Queste cellule sono elementi fondamentali nello sviluppo della placca, sia nelle fasi iniziali che in quelle successive che determinano le tipiche manifestazioni cliniche. Le funzioni fisiologiche dei macrofagi sono diverse: presentare l'antigene ai linfociti<sup>21</sup>, agire da cellule "spazzino" grazie ai recettori scavenger e ai recettori per la fagocitosi delle sostanze nocive, liberare molecole (radicali) e citochine per rispondere a

stimoli infettivi. In pratica, le molecole di LDL, che si accumulano già nelle fasi iniziali del processo di aterosclerosi, vengono riconosciute come elementi estranei e di conseguenza fagocitate mediante il recettore scavenger. Le LDL internalizzate nei fagosomi, vanno incontro ad ossidazione, formando le LDL-ossidate. I macrofagi accumulano così grandi quantità di colesterolo ossidato si trasformano in cellule schiumose, tipiche della placca aterosclerotica. Quando queste cellule non sono in grado di metabolizzare ulteriormente LDL vanno incontro a morte, liberando nuovamente le LDL-ossidate, assieme a radicali e a molecole interne, stimolando nuovamente il processo. In più i macrofagi agiscono liberando attivamente nell'ambiente interstiziale radicali dell'ossigeno; queste sostanze, agendo sulle molecole di LDL, ne determinano l'ossidazione. Si verifica quindi un ulteriore richiamo leucocitario e un'attivazione maggiore dei macrofagi presenti, stimolandoli alla liberazione di citochine, fattori di crescita e radicali. I macrofagi liberano perossidasi, questi enzimi agiscono sulle LDL formando aldeidi e chetoni i quali si legano ad altre molecole di colesterolo, aumentandone il deposito e la successiva fagocitazione. Il ruolo dei macrofagi nella instabilità della placca è dato anche dalla possibilità di liberare metalloproteinasi di matrice (matrix metalloproteinasi, MMP). Le MMP agiscono sulla componente extracellulare, degradando molecole di collagene e proteoglicani, rendendo così la struttura della placca meno stabile. L'attività delle MMP risulta essere rilevante nella modificazione del *fibrous cap*; questi enzimi sono in grado di ridurre lo spessore favorendo lo sviluppo di lesioni superficiali. Infine i macrofagi liberando citochine che mediano la flogosi, IL1 e TNF, promuovono: il mantenimento dell'infiammazione, con il richiamo di linfociti T e Mast cell, lo stimolo a una maggiore attivazione cellulare, l'inibizione di i processi di riparazione. Tutto ciò instaura un processo lentamente progressivo e autoalimentato, in grado di fare evolvere in maniera negativa la lesione, con conseguenti manifestazioni cliniche, processo in cui è chiaro il ruolo chiave dei macrofagi<sup>22</sup>.

Il riscontro di una maggiore concentrazione di macrofagi in lesioni con "thin-fibrous cap" ed abbondante componente lipidica, confermano anche a livello

carotideo il ruolo di queste cellule nello sviluppo di ulcerazioni di parete e di trombosi della placca. E' stato anche evidenziato come la presenza di elementi macrofagici nella placca si associ a una maggiore incidenza di sintomi, ad ulteriore conferma del ruolo di queste cellule nello sviluppo di complicanze della placca<sup>23</sup> (Fig.1).

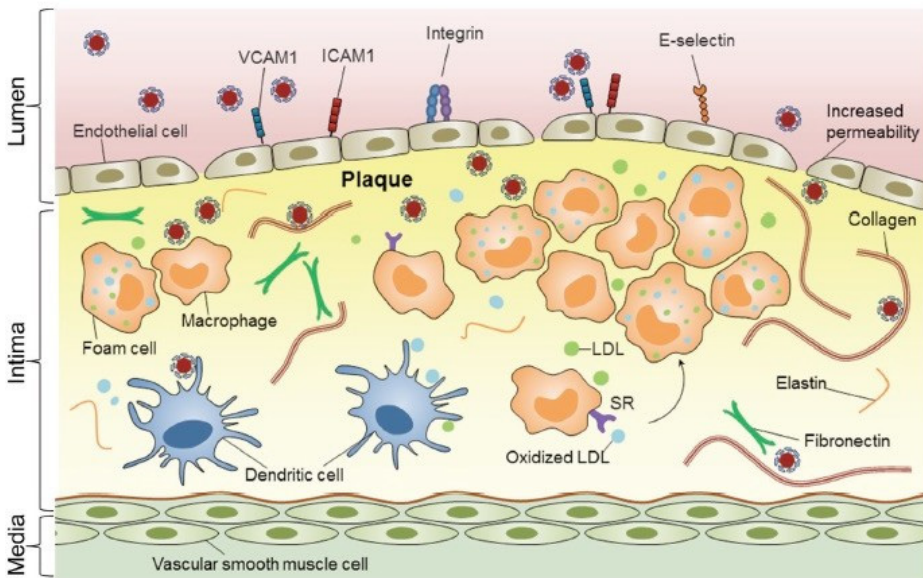
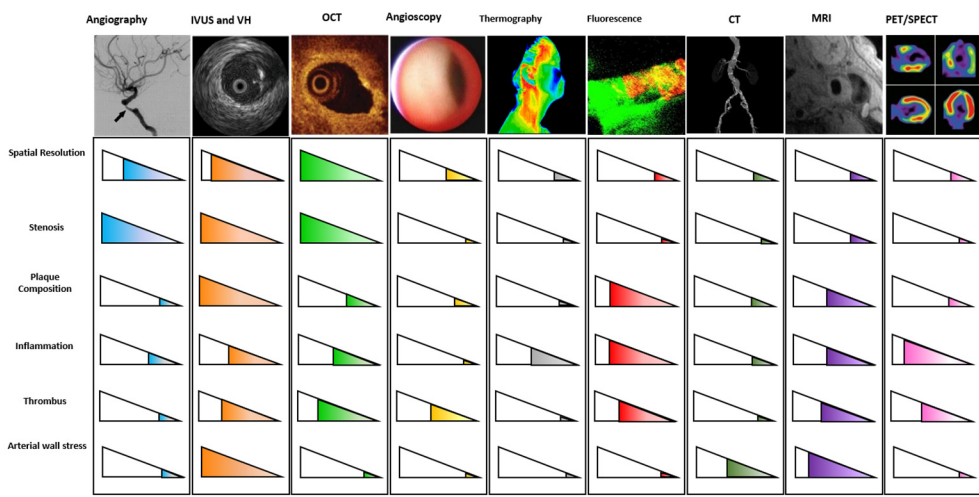


Figura 1. Patogenesi dell'aterosclerosi. L'endotelio disfunzionale consente alle lipoproteine a bassa densità (LDL) di entrare nell'intima, dove sono ossidate (oxLDL). Gli oxLDL sovra-regolano l'espressione di molecole di adesione come E-selectina, molecola di adesione intercellulare (ICAM1) e molecola di adesione vascolare (VCAM1) per reclutare monociti. I macrofagi reclutati inghiottono oxLDL attraverso i recettori scavenger (SR) e si trasformano in cellule schiumose. Le cellule muscolari lisce migrano dallo strato muscolare liscio verso la placca lipidica, quindi secernono collagene ed elastina per formare un cappuccio fibroso per sigillare la placca dal flusso sanguigno. Le placche aterosclerotiche possono rompersi a seguito della rottura del cappuccio fibroso, che può di conseguenza portare a eventi clinici gravi come infarto del miocardio o ictus. Ristampato con il permesso. Chan et al<sup>24</sup>

## LE TECNICHE DI IMAGING NELLO STUDIO DELLE PLACCHE ATEROSCLEROTICHE

L'infiammazione ha un ruolo centrale nella vulnerabilità della placca ed è stata dimostrata una spiccata relazione tra indici infiammatori ed eventi clinici<sup>9,25</sup>. Purtroppo i biomarcatori non individuano la sede anatomica della lesione vulnerabile e questo è un problema visto che nelle coronarie l'occlusione spesso complica improvvisamente placche prima non critiche<sup>7,26</sup>. Pertanto, visto che il rischio di rottura è determinato dalle caratteristiche biologiche della placca e non dall'entità della stenosi, la tecnica di imaging ideale dovrebbe essere così precisa da evidenziare tutti gli elementi strutturali e biologici che possono determinare la rottura della placca e quindi l'evento coronarico. Premesso ciò, data la nota diffusione della patologia (18 milioni di morti l'anno con proiezioni in crescita per il futuro), è evidente l'utilità e la necessità di utilizzare tecniche diagnostiche efficaci durante le fasi silenti della malattia per prevenire ed evitare le complicanze conseguenti alla instabilità della placca. Le tecniche diagnostiche auspicabili dovrebbero dare non tanto informazioni sul grado di stenosi bensì sulla morfologia della lesione aterosclerotica. Nella Fig. 2 sono messe a confronto le diverse tecniche diagnostiche utilizzabili dell'aterosclerosi<sup>27</sup>. Fino ad oggi l'angiografia è stata la tecnica di riferimento per lo studio della malattia coronarica, nonostante si limiti alla semplice valutazione del lume vasale, senza fornire informazioni sulla parete o sulla placca aterosclerotica<sup>28</sup>. Purtroppo la maggior parte degli eventi ischemici è causata dall'instabilizzazione di lesioni coronariche non critiche prima dell'evento<sup>29</sup>. Il nuovo evento coronarico in più del 50% dei casi è dovuto a lesioni prima non complicate<sup>30</sup>. Questo riduce l'utilità della coronarografia per predire l'evoluzione delle lesioni coronariche ed il correlato rischio di eventi clinici gravi. Ne consegue inoltre che tecniche diagnostiche finora ampiamente utilizzate come ecografia carotidea e angiografia risultano poco valide e superate in quanto capaci di rilevare unicamente la stenosi del vaso. Per questo motivo, negli ultimi anni la coronarografia è stata integrata da altre tecniche quali l'ecografia intracoronarica (Intravascular Ultrasound, IVUS), le altre metodiche IVUS-derivate (istologia virtuale e palpografia), l'OCT (tomografia a coerenza ottica) e l'angioscopia, ognuna delle quali ha specifiche peculiarità. L'IVUS studia le parti superficiali e profonde della placca aterosclerotica permettendo di distinguere

una placca con estesa infiltrazione lipidica che presenta una più bassa ecogenicità rispetto a quella della tonaca avventizia, da placche con una composizione prevalentemente fibrotica, maggiormente ecogene rispetto alle placche lipidiche. Mentre la placca calcifica è riconoscibile per la presenza di un'interfaccia chiara che sovrasta una zona d'ombra acustica. L'angioscopia invece studia la superficie delle lesioni e le formazioni trombotiche che le complicano. L'OCT (Optical Coherence Tomography), invece, è una tecnica che utilizza la luce ad infrarossi per generare immagini ad alta risoluzione dello strato superficiale dei vasi e della placca<sup>31,32</sup>. Molte tecniche risultano vantaggiose per certi aspetti e svantaggiose per altri. L'IVUS e l'OCT per esempio riescono a dare informazioni sulla morfologia della placca ma sono di difficile applicazione perché invasive. Mentre la TC (tomografia computerizzata) non è invasiva ma espone il paziente ad alte dosi di radiazioni e agenti di contrasto. La TC sfrutta la trasmissione dei raggi-X come nella radiografia convenzionale, ma la sorgente di raggi-X e il detector ruotano attorno al paziente. Con questa tecnica, il range di densità registrate è amplificato di circa 10 volte rispetto alla radiografia convenzionale pertanto si riescono a distinguere anche i tessuti molli, ma è poco sensibile. La tecnica ad ultrasuoni utilizza onde sonore ad elevata frequenza. Le onde sono dirette attraverso il corpo da un trasduttore a contatto con la pelle, il quale registra l'eco in uscita che viene poi elettronicamente amplificato, gli svantaggi sono una bassa sensibilità, risoluzione e profondità.



**Figura 2. - Tecniche diagnostiche per l'aterosclerosi<sup>27</sup>.** CT: computed tomography; IVUS: intravascular ultrasonography; MRI: magnetic resonance imaging; OCT: optical coherence tomography; PET: positron emission tomography; SPECT: single-photon emission computed tomography; VH: virtual histology.

La tecnica che risponde meglio per una diagnosi precisa e precoce ad oggi è la RM che risulta essere:

- non invasiva
- riproducibile
- non utilizza radiazioni ionizzanti né traccianti radioattivi ma soltanto un forte campo elettromagnetico non ionizzante nella gamma delle onde radio
- da informazioni sulla morfologia della placca
- consente di valutare tutto l'albero vascolare arterioso.

Anche questa presenta però degli svantaggi, quali:

- una bassa sensibilità e
- l'incapacità di discriminare tra tessuto sano e malato.

La RM è una metodica non invasiva che potrebbe individuare le differenti componenti della placca aterosclerotica studiando diversi parametri biochimici e biofisici; infatti le placche fibrose presentano un segnale aumentato, mentre quelle lipidiche e calcifiche attenuato. La RM potrebbe diventare il metodo di prima scelta per studiare l'aterosclerosi coronarica in quanto è una tecnica non invasiva e priva di radiazioni ionizzanti. Purtroppo ancor oggi lo studio delle arterie coronarie è difficile; esse sono piccole, tortuose e mobili con le contrazioni cardiache e gli atti respiratori. A differenza del distretto coronarico, quello carotideo è meglio esplorabile ed in questo contesto la RM ha già avuto importanti applicazioni cliniche sostituendo l'angiografia<sup>33,34</sup>.

## STATO DELL'ARTE

### RM E AGENTI DI CONTRASTO

La Risonanza Magnetica Nucleare (RM) è attualmente un potente strumento di imaging non invasivo per applicazioni diagnostiche. Essa si basa sulle proprietà



magnetiche dei nuclei di idrogeno in acqua e consente di acquisire informazioni tomografiche di tessuti interi (compresi i tessuti molli) in 3D, ad alta risoluzione spaziale e senza l'utilizzo di radiazioni ionizzanti (raggi X) o radiotraccianti<sup>35,36</sup>. Gli svantaggi principali della RM sono la scarsa sensibilità e l'incapacità di discriminare il tessuto sano dal tessuto malato, rendendo la diagnosi precoce impegnativa. Per affrontare questo ostacolo tecnologico, poco tempo dopo la scoperta dei raggi X, non appena ci si rese conto che la maggior parte delle strutture del corpo umano risultavano invisibili e pertanto non documentabili a causa della scarsa radiopacità, sono stati sviluppati agenti o mezzi di contrasto (mdc). Si tratta di sostanze costituite da uno ione metallico (il più utilizzato è il Gd) legato ad una struttura chimica organica che prende il nome di chelante, (Gd-DTPA dietilentriammino pentacetato) il cui compito è quello di ridurre la tossicità intrinseca dello ione metallico stesso. Attualmente ci sono otto agenti di contrasto a base di gadolinio clinicamente approvati. Essi vengono iniettati per via endovenosa determinando a livello dei tessuti (normali e patologici) nei quali si distribuiscono, un miglioramento delle proprietà di rilassamento dei nuclei di idrogeno dell'acqua in quanto, a differenza di altri supporti diagnostici quali radionuclidi, gli agenti di contrasto per RM non sono essi stessi una fonte di un segnale e non sono quindi direttamente visibili, ma colpiscono le molecole d'acqua circostanti che a loro volta influenzano il segnale. I mdc includono una varietà di molecole che possono essere ricondotti a due categorie principali: mdc paramagnetici e mdc diamagnetici<sup>37,38</sup>. La modifica del campo magnetico comporta una variazione dell'intensità del segnale che può essere "positiva" o "negativa", nel senso che si può avere un aumento o una diminuzione dell'intensità del segnale. L'effetto dei mdc si esplica direttamente sui tempi di rilassamento T1 e T2 per cui, a seconda del tipo di mdc e in relazione alla concentrazione ed alla sequenza impiegata, si potranno avere effetti prevalentemente T1 dipendenti o prevalentemente T2 dipendenti. I tessuti malati, come ad esempio quelli tumorali, essendo metabolicamente diversi dai tessuti sani, hanno un più alto grado di assorbimento del mezzo di contrasto e quindi sarà possibile apprezzare un maggiore grado di contrasto nelle immagini di RM, consentendo di fare una diagnosi più accurata<sup>39-41</sup>. L'efficienza con cui un agente di contrasto può accelerare la velocità di rilassamento del protone in un mezzo omogeneo è chiamata relassività ( $r$ ) dell'agente ed è definita da:

$$\frac{1}{T_{1/2}} = \frac{1}{T_{1/2,0}} + r_{1/2}C$$

dove  $T_{1/2}$  indica il T1 o il T2 risultante,  $T_{1/2,0}$  indica il T1 o il T2 originario del tessuto,  $r$  è la rilassività e  $C$  è la concentrazione del mdc nel tessuto. La rilassività dipende da vari fattori tra cui il campo esterno, il numero di molecole d'acqua coordinate al metallo, la velocità di scambio tra le molecole di acqua ( $\tau_M$ ), la diffusione rotazionale ( $\tau_R$ ), la prima e la seconda sfera di idratazione, la distanza tra lo ione metallico e la molecola di acqua.

**AGENTI DI CONTRASTO T1 E MECCANISMO DI AZIONE.** Il gadolinio è l'elemento più noto e più utilizzato della classe dei lantanidi per applicazioni biomedicali, in particolare viene adoperato nel campo dell'imaging di risonanza in qualità di mdc T1. Il suo stato di ossidazione più comune è pari a + III e il suo utilizzo per applicazioni diagnostiche deriva dalla presenza, nella sua struttura chimica, di 7 elettroni spaiati che lo rendono un ione stabile e paramagnetico<sup>42</sup>. Per l'incremento di  $r_1$  le ricerche si sono focalizzate sull'aumento del numero di molecole d'acqua coordinate e sul tempo di correlazione rotazionale (per esempio legando i complessi a macromolecole). Tuttavia è l'aumento del numero di ioni  $Gd^{3+}$  per unità di agente di contrasto legando i complessi a nanoparticelle metalliche, catene peptidiche, lipidi e dendrimeri, che ha portato a migliori risultati. Gli agenti di contrasto a base di gadolinio sono costituiti da piccole molecole chelanti (come DOTAREM, Guerbet o MAGNEVIST<sup>®</sup>, Bayer Healthcare) e vengono utilizzati come agenti di contrasto positivi. In queste strutture (fig. 1a), avendo il Gd (III) ben 9 siti di coordinamento, ne formerà 8 con la molecola chelante e il sito restante sarà disponibile per l'interazione transitoria dipolo-dipolo con una molecola di acqua. La molecola di acqua che si troverà in prossimità del centro metallico (distanza media  $\sim 0.25$  nm) darà luogo a un processo noto come "rilassamento della sfera interna" (Fig. 3b), il fenomeno paramagnetico che è alla base del funzionamento dei mdc odierni. In accordo con la teoria di Solomon–Bloembergen–Morgan<sup>43</sup> lo scambio tra le molecole di acqua della sfera interna, coordinate allo ione metallico, deve essere rapido al fine di trasmettere l'effetto paramagnetico dal Gd al solvente. Un tasso di scambio lento comporta una limitata efficacia del mezzo di contrasto. Tuttavia, se lo scambio, invece, è troppo veloce, la molecola di acqua potrebbe non essere coordinata allo ione Gd abbastanza a lungo per essere "rilassata". Il

paramagnetismo dello ione Gd ha effetti che si estendono ben aldilà della sfera interna, tuttavia, ad una distanza di circa 0.4-0.5 nm si troverà un altro gruppo di molecole di acqua che formeranno “un secondo strato”. Alcune delle molecole di acqua presenti nel secondo strato sono transitoriamente legate a gruppi ossidrilici e carbossilici presenti sulla superficie del chelante, e promuovono continui scambi con le molecole di acqua presenti nell’ambiente circostante. Gli effetti indiretti esplicati dallo ione Gd su queste molecole più esterne prendono il nome di “rilassamento della sfera esterna” (fig. 3c).

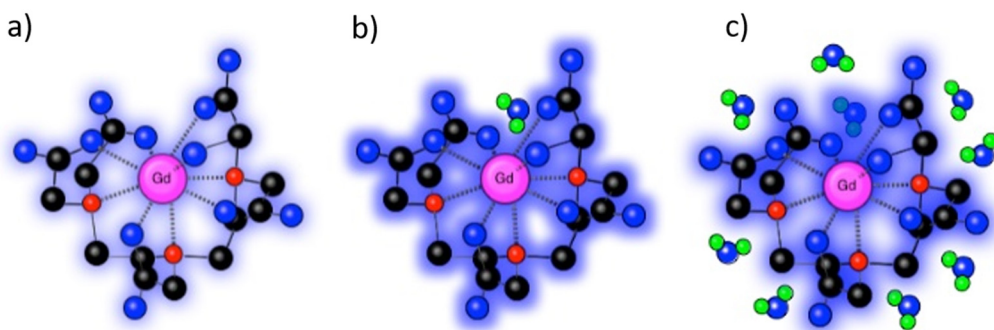


Fig.3: a) Esempio di agente di contrasto T1 a base di Gadolinio (Gd-DTPA); b) fenomeno di rilassamento della sfera interna; c) fenomeno di rilassamento della sfera esterna.

Nonostante gli innumerevoli vantaggi per le applicazioni cliniche, il gadolinio deve essere somministrato con cautela in quanto il suo rilascio nell’organismo può condurre alla fibrosi nefrogenica sistemica<sup>44,45</sup>, patologia che, osservata in pazienti con insufficienza renale che hanno ricevuto gli agenti di contrasto a base di gadolinio, sembra essere dovuta al rilascio di gadolinio da parte delle molecole chelanti nei compartimenti renali. Inoltre recentemente alcuni prodotti contenenti Gd sono stati sospesi dal commercio in seguito alla scoperta di accumuli di questo nel cervello di pazienti che ne avevano fatto uso, accumuli dovuti probabilmente ad una frazione del metallo che in qualche modo riesce a liberarsi dalla molecola chelante. Il gadolinio ha inoltre un’azione aspecifica che richiede l’utilizzo di alte dosi come mezzo di contrasto per avere l’effetto positivo richiesto. Così anche per la sua alquanto bassa rilassività (soprattutto nella forma chelata dove dei nove siti di coordinamento soltanto uno è libero per il

legame con le molecole d'acqua) che non sempre risulta sufficiente per le esigenze diagnostiche. Pertanto durante lo sviluppo di nuovi composti a base di gadolinio, un'attenzione specifica deve essere rivolta a questa problematica.

## NANOMEDICINA, IMAGING E ATEROSCLEROSI

Il cambiamento demografico e l'invecchiamento delle popolazioni hanno determinato un incremento drammatico di incidenza e prevalenza di numerose patologie "tipiche" dell'età avanzata, tra le quali le malattie cardio e cerebrovascolari (infarti, ictus, fibrillazione atriale, scompenso cardiaco) <sup>46-50</sup>. Attualmente, nonostante gli innumerevoli progressi in campo medico-farmacologico, diagnostico e tecnico-strumentale, non sempre risulta possibile intervenire tempestivamente per arrestare la diffusione della patologia. In molti casi i sintomi clinici non insorgono in una fase precoce della malattia e si rende necessario l'uso di tecniche diagnostiche (anche) invasive, biopsie, chirurgia, trattamenti non specifici quali irradiazione e chemioterapia, ecc <sup>48</sup>. Tra le varie tecniche di Imaging, la Risonanza Magnetica (RM)<sup>51</sup> consente un'accurata analisi morfologica e strutturale, anche se risulta efficace in una fase già avanzata del processo patologico. Riuscire ad avere, quindi, una detection precoce della patologia, diventa di fondamentale importanza, tenendo conto del fatto che la terapia è fortemente subordinata alla diagnosi. Potenziali soluzioni a questa "sfida" sono offerte dalla teranostica<sup>52-55</sup>, un settore della nanomedicina<sup>56</sup> incentrato sullo sviluppo di nanoparticelle (NPs) per l'applicazione simultanea di diagnosi e terapia<sup>57-60</sup>. Tali dispositivi nanometrici infatti, potrebbero non solo consentire di allargare la finestra temporale dell'imaging<sup>61</sup> spostando l'asse verso una diagnosi più precoce e mirata della patologia, ma potrebbero anche permettere il monitoraggio del trattamento<sup>62</sup>. Infatti il nanovettore da una parte svolge una funzione protettiva contro la destabilizzazione del Gd chelato, limitandone in tal modo l'accumulo e la tossicità sistemica e celebrale, dall'altra l'utilizzo di un carrier nanometrico per il mezzo di contrasto offre l'opportunità di funzionalizzare ad hoc la superficie del nanovettore per consentirne l'accumulo nel sito di interesse. In tal modo se ne migliora l'efficacia e quindi si possono ridurre le dosi di somministrazione e di conseguenza ridurre la tossicità sistemica, attraverso un'azione selettiva, specifica, efficace. Inoltre la presenza di una struttura polimerica di rivestimento, soprattutto se idrofila, ha effetti

positivi sulla relassività del mdc modulando sia il tempo di scambio delle molecole d'acqua ( $T_m$ ), che il loro tempo rotazionale ( $T_r$ ), in quanto stabilizza gli ioni e crea un intorno più idrofilico. Le NPs sono una classe di materiali con almeno una dimensione inferiore a 100 nm (questo intervallo può essere esteso fino a 1  $\mu\text{m}$  nella letteratura)<sup>63,64</sup> ed offrono innumerevoli vantaggi. Possiedono infatti un elevato rapporto superficie/volume, possono trasportare una considerevole quantità e varietà di agenti terapeutici o di imaging in un singolo carrier per applicazioni multimodali<sup>65-68</sup>; è possibile variare la loro dimensione, forma e superficie al fine di modularne la biodistribuzione<sup>69,70</sup>. Inoltre conservano la capacità di coniugare opportuni ligandi per poter essere veicolate sul sito di interesse, permettendo così agli agenti di imaging e terapeutici di esplicare la loro azione. La progettazione di complessi multifunzionali nanometrici richiede anche la conoscenza di recettori specifici, marcatori, proteine ed enzimi che possono permettere l'assorbimento cellulare selettivo di un agente diagnostico o terapeutico e il conseguente accumulo nel sito di interesse. In campo diagnostico, troviamo alcuni prodotti che sono già stati approvati dalla FDA (Food and Drug Administration)<sup>71,72</sup> e si rivolgono ad alcune patologie specifiche, mentre altri sono ancora in fase di sperimentazione clinica. In contrasto con i tradizionali approcci di imaging, l'imaging molecolare consente di valutare le caratteristiche biologiche delle placche aterosclerotiche in vivo garantendo la prevenzione, lo screening, la diagnosi e il trattamento dei disturbi vascolari. Al giorno d'oggi, come già detto, mancano strumenti di imaging per la diagnosi precoce dell'ateroma clinico basato sulla biologia della placca. Infatti, nonostante ci sia una vasta conoscenza sull'uso delle nanotecnologie nelle malattie cardiovascolari, l'uso di nanovettori per applicazioni di imaging nella pratica clinica rimane limitato, non solo per la sicurezza, ma anche per la natura eterogenea delle placche stessa. Inoltre, è noto che la vecchia generazione di NP non è specifica e, in realtà non esiste un prodotto commercializzato, senza considerare che diversi studi condotti su modelli murini hanno evidenziato in modo significativo che esistono diverse anatomie della malattia vascolare rispetto all'uomo. In questo contesto, quindi, la combinazione di specifici ligandi e nanostrutture diventa un fattore chiave per interagire e / o superare le barriere biologiche, inoltre grazie all'elevato rapporto tra superficie e volume dei nanovettori, possono essere coniugate diverse copie dei ligandi.

## ATEROSCLEROSI E NANOTECNOLOGIA: STATO DELL'ARTE

Lo sviluppo dell'aterosclerosi è lento, dando luogo a una finestra teoricamente lunga di opportunità di diagnosi. A causa della natura asintomatica della patogenesi, l'accurata classificazione delle placche aterosclerotiche attraverso una tecnica non invasiva ad alta risoluzione spaziale e la possibilità di una diagnosi precoce dell'aterosclerosi, rappresentano un'importante opportunità per individuare i pazienti con alto rischio di rottura della placca, in modo da poter avviare un trattamento immediato e un monitoraggio frequente.

Come si evince da uno studio di Chan et al.<sup>24</sup> gli ultimi anni sono stati caratterizzati da un rapido aumento delle applicazioni precliniche dei bio-nanomateriali per la diagnostica per immagini e/o il trattamento dell'aterosclerosi. Ma quello delle applicazioni cliniche dei bio-nanomateriali come carrier di agenti terapeutici e di imaging per il trattamento del cancro è certamente un settore più esplorato.

Analogamente per l'aterosclerosi ci sono tre validi motivi per l'utilizzo di bio-nanomateriali organici e inorganici. In primo luogo, i bio-nanomateriali possono includere blocchi di costruzione su scala nanometrica con proprietà fisico-chimiche che supportano l'imaging in vivo, come i punti quantistici per l'imaging fluorescente nel vicino infrarosso (NIRF), materiali nano- densi di elettroni come le NP in oro per la tomografia computerizzata a raggi X (CT), e NP di ossido di ferro e NP di gadolinio (Gd<sup>3+</sup>) per la risonanza magnetica (MRI). Per esempio Russo et al.<sup>45,73</sup> hanno sviluppato un innovativo processo microfluidico per la produzione di particelle di hydrogel altamente biocompatibili che incapsulano il Gd- DTPA per l'imaging della RM. Il preciso controllo sulla reticolazione dell'hydrogel ha permesso di migliorare il segnale di RM, definendo un nuovo agente di contrasto per questa tecnica diagnostica. Cormode et al.<sup>74</sup> ha sviluppato NP in oro ad alta densità coniugate con una lipoproteina (Au-HDL), come mezzo di contrasto per la caratterizzazione dei macrofagi, delle calcificazioni e delle stenosi di placche in topi apolipoproteina E knockout (ApoE<sup>-/-</sup>) utilizzando un sistema spettrale CT. Nel 2015, Qi et al.<sup>75</sup> hanno valutato l'efficacia anti-aterosclerotica dell'atorvastatina iniettando NPs di ossido di ferro in conigli bianchi neozelandesi trattati con atorvastatina rilevando la riduzione della dimensione della placca mediante risonanza magnetica. In secondo luogo,

i bio-nanomateriali consentono di confezionare elevate quantità di agenti terapeutici in una nanostruttura compatta e ne facilitano la distribuzione alle placche. Per esempio, Mishra et al.<sup>76</sup> hanno mostrato una migliore distribuzione di d-Threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol, un inibitore di sintesi glicosfingolipidica, in topi ApoE<sup>-/-</sup> di quasi 50 volte migliore, tramite incapsulamento in NP polimeriche. A sua volta, la migliore distribuzione dell'inibitore migliora l'efficacia antiaterosclerotica di un ordine di grandezza. Nel 2016 in uno studio di Daminelli et al.<sup>77</sup>, la carmustina, un chemioterapico lipofilico, è stata caricata in NPs lipidiche per il targeting di placche aterosclerotiche. In caso di iniezione endovenosa (i.v.) in conigli bianchi neozelandesi aterosclerotici, le NP incapsulate con farmaci possono ridurre le dimensioni della placca. Inoltre, i bio-nanomateriali sono in grado di legare vari tipi di biomolecole per colpire specificamente diversi tipi di tessuti o cellule nella placca<sup>78</sup>. In precedenza, Nahrendorf et al.<sup>79</sup> hanno iniettato NPs magnetiche coniugate con un peptide per colpire la molecola di adesione cellulare vascolare-1 (VCAM-1) espressa da cellule endoteliali e macrofagi in topi ApoE<sup>-/-</sup>. All'interno della placca hanno osservato segnali elevati delle NPs accumulate nella radice aortica in maniera spazialmente diversa dalle NPs non funzionalizzate. Nel 2016, Wang et al.<sup>62</sup> hanno iniettato NPs di ossido di ferro coniugate con un anticorpo avente per bersaglio la profilina espressa dalle cellule muscolari lisce, in topi ApoE<sup>-/-</sup>, per l'imaging delle placche nell'arteria carotidea. Attualmente, quindi, i ricercatori stanno ora valutando il potenziale uso di essi nel trattamento dell'aterosclerosi o delle complicanze trombotiche, soprattutto a livello preclinico<sup>80</sup>, che ha portato ad un vertiginoso aumento di 6,8 volte delle pubblicazioni sulle nanomedicine aterosclerotiche dal 2005 al 2016, creando così una fiorente area di ricerca "atero-nano" con molte opportunità di innovazione e traduzione clinica nei prossimi anni.

### Obiettivi biologici nell'aterosclerosi: l'endotelio

Alcune aree delle arterie, come le curvature e i punti di ramificazione, sono particolarmente vulnerabili alle placche aterosclerotiche in quanto i loro strati endoteliali sono costantemente esposti al flusso sanguigno oscillatorio. In risposta, queste cellule endoteliali esprimono più chemochine pro-infiammatorie

e molecole di adesione, e sono più sensibili all'adesione dei monociti<sup>81</sup>. Le lipoproteine circolanti hanno maggiori probabilità di penetrare la parete arteriosa e di accumularsi nello strato subendoteliale ricco di proteoglicani all'interno dell'intima<sup>82</sup>. Il VCAM-1 è il più comune bersaglio dei bio-nanomateriali per il targeting delle placche aterosclerotiche<sup>83</sup>. Presente anche sui macrofagi, la VCAM-1 partecipa al reclutamento di cellule infiammatorie sulla superficie dell'endotelio attivato favorendone la loro adesione, una funzione condivisa dalle molecole di adesione intracellulare (ICAM) e da alcune integrine<sup>84</sup>. I ligandi attualmente riportati per il targeting della VCAM-1 sono peptidi, identificati dallo screening tra i peptidi che possono essere internalizzati dalle cellule endoteliali che esprimono VCAM-1 utilizzando fage-display library. Analogamente per l'ICAM-1, altro obiettivo, anche se meno popolare, per il comparto endoteliale.

### Componenti non cellulari

I bio-nanomateriali possono anche essere progettati per colpire componenti non cellulari di placche aterosclerotiche, tra cui il collagene è il più comune. Come parte fondamentale della matrice extracellulare, il collagene modula risposte cellulari e contribuisce alla forza e all'integrità della capsula fibrosa<sup>85</sup>. I precedenti rapporti hanno utilizzato la phage display per individuare peptidi efficaci per il targeting del collagene IV<sup>86</sup>, abbondantemente presenti sulla membrana vascolare interna ed esposti durante le lesioni vascolari a causa della maggiore permeabilità. Sono state prodotte NPs polimeriche contenenti peptidi, oro<sup>87 88</sup> e lipoproteine<sup>89</sup> per il targeting del collagene all'interno di placche aterosclerotiche. Nel 2012, Korin et al.<sup>90</sup> hanno fornito aggregati di NPs polimeriche in scala micrometrica inizialmente tenuti insieme da forze idrofobiche nei vasi sanguigni ostruiti (imitando l'azione fisiologica delle piastrine). È interessante notare che l'alta energia di taglio locale innesca la distruzione degli aggregati in singole NPs per la permeazione attraverso la placca. Nel 2015, Jac-obin-Valat et al.<sup>91</sup> hanno coniugato anticorpi ricombinanti contro le piastrine attivate a NPs di ossido di ferro. Iniettando NPs funzionalizzate nei topi ApoE<sup>-/-</sup>, hanno evidenziato, mediante risonanza magnetica ex vivo, un legame selettivo per le placche aterosclerotiche. La fibrina può essere trovata



sulla superficie o all'interno delle placche; la sua aumentata formazione è legata alla progressione dell'aterosclerosi<sup>92</sup>. Nel 2016, Yoo et al. hanno dimostrato l'uso di micelle che contengono aggregati di peptidi leganti la fibrina per rilevare placche aterosclerotiche mediante RM e imaging NIRF<sup>93</sup>.

### Cellule infiammatorie

I macrofagi sono i principali attori durante lo sviluppo dell'aterosclerosi, perché internalizzano LDL ossidate e si trasformano in cellule schiumose a livello subendoteliale. A causa dell'assorbimento dei lipidi e dell'ipossia, subiscono apoptosi e necrosi secondaria, formando il nucleo necrotico. La crescita del nucleo necrotico e l'assottigliamento della capsula fibrosa possono causare occlusione arteriosa, rottura della placca e trombosi<sup>94,95</sup>. Data la loro abbondanza nella placca e la disponibilità ad assumere NPs, i macrofagi sono tra le cellule immunitarie, il più comune bersaglio dei bio-nanomateriali per accedere alle placche aterosclerotiche. Il biomarker più comune per i macrofagi aterosclerotici è il recettore scavenger, espresso in forme strutturalmente diverse, come il recettore scavenger di classe A (MSR-1) e il recettore scavenger di classe B (SR-BI o CD-36), per riconoscere e internalizzare le LDL modificate che favoriscono il reclutamento del colesterolo<sup>96</sup>.

### Modelli animali nello studio dell'aterosclerosi

I conigli sono uno dei primi modelli animali scelti per la ricerca sull'aterosclerosi, poiché hanno il metabolismo delle lipoproteine e una morfologia delle lesioni simili a quelle dell'uomo e possiedono arterie di grandi dimensioni, utili per determinare la composizione della placca mediante imaging<sup>97</sup>. Tuttavia, l'elevato costo di mantenimento e la facilità di sviluppo dell'epatotossicità derivante dalla dieta aterogena ne distolgono l'utilizzo. L'uso dei conigli è stato sostituito dall'utilizzo di topi geneticamente modificati<sup>95</sup>.

I maiali e i primati non umani sono simili all'uomo in termini di fisiologia cardiovascolare e suscettibilità alle malattie cardiovascolari<sup>98</sup>. I maiali a dieta aterogena possono sviluppare rapidamente le placche<sup>99</sup>, ma non sono

facilmente reperibili nella maggior parte degli impianti sperimentali e comportano costi di mantenimento molto più elevati. I ratti non sono modelli animali comuni per gli studi atero-nano, anche se possono essere utilizzati in studi su lesioni vascolari senza formazione di placca.

I topi sono i modelli animali più utilizzati nella ricerca atero-nano a causa del loro rapido tasso di riproduzione e dell'alta somiglianza di genotipo tra topi e umani<sup>100</sup>. E' consolidato l'uso di due modelli di topo geneticamente modificati che hanno elevati livelli plasmatici di colesterolo per innescare la formazione di ateroma, topi ApoE<sup>-/-</sup> generati dall'abbattimento di ApoE per prevenire la clearance di lipoproteine a bassissima densità, e topi Ldlr<sup>-/-</sup><sup>101</sup> generati dall'abbattimento del recettore LDL responsabile della clearance di LDL. Entrambi non solo hanno contribuito alla nostra comprensione dell'aterosclerosi, ma hanno anche contribuito allo sviluppo di numerose piattaforme di produzione di NPs per l'aterosclerosi. Oltre a studiare le placche nell'aorta, è stata eseguita anche una legatura parziale della carotide per studiare come il flusso sanguigno alterato con caratteristiche di basso e oscillatorio "wall shear stress" può indurre in maniera acuta l'aterosclerosi nei topi ApoE<sup>-/-</sup> e Ldlr<sup>-/-</sup><sup>102,103</sup>.

Questi studi dimostrano come diversi percorsi patologici determinano la genesi di lesioni aterosclerotiche senza la necessità di creare doppi o tripli knockouts, spesso un compito difficile e che richiede tempo.

#### Progettazione di bio-nanomateriali per il targeting di placche aterosclerotiche: proprietà dei materiali

Data l'elevata variabilità delle proprietà dei bio-nanomateriali disponibili (ad esempio stereochimica, gruppo funzionale, lunghezza delle catene laterali e composizione), i ricercatori potrebbero non essere a priori a conoscenza del parametro più critico per le NP per il targeting delle placche aterosclerotiche. Inoltre, può essere costoso e richiedere tempo chiarire sistematicamente l'effetto in vivo di ogni proprietà del biomateriale. Per indagare efficacemente lo spazio di ricerca, gli studi emergenti hanno caratterizzato la costruzione di librerie di NP per lo screening di esse con i materiali migliori per il targeting della placca in vitro prima di procedere a esperimenti in vivo. Nel 2016, Kamaly et al.<sup>87</sup>

hanno preparato una libreria di 24 tipi di NPs polimeriche per fornire IL-10, una citochina anti-infiammatoria, a macrofagi atero-genici. Mentre tutti i tipi di NPs hanno un diametro idrodinamico di 80-200 nm e una carica superficiale negativa (da -32 a -8 mV), i loro blocchi di costruzione polimerici sono costituiti da diversi tipi di polimeri, gruppi funzionali e lunghezze delle catene. Alcuni tipi di NPs contengono anche glucosamina, che stabilizza e crioprotette IL-10. Gli autori hanno anche analizzato la capacità dei diversi tipi di NPs di attivare il fosforilato STAT3, una molecola a valle attivata da IL-10. Nel 2015, Lewis et al.<sup>104</sup> hanno preparato macromolecole anfifiliche a base di zucchero con diversi tipi di funzionalità e stereochimica. Queste macromolecole possono auto-assemblarsi per formare NP con una dimensione idrodinamica di 130-375 nm. Gli autori hanno osservato che le NPs a base di acido mucico (M12PEG NPs) con gruppi carbossilati possono inibire i recettori degli scavenger e promuovere l'assorbimento di NP mediato dai recettori degli scavenger in modo più efficace rispetto alle NP contenenti gruppi amminici o aromatici.

Andando oltre lo screening in vitro si è recentemente assistito a studi di screening in vivo per identificare NPs con le caratteristiche dei materiali ottimali per il targeting delle placche. Nel 2016, Tang et al.<sup>105</sup> hanno preparato 15 tipi di HDL-NPs (contenenti peptidi ApoA), micelle e liposomi con diverse dimensioni idrodinamiche (da 7 a >100 nm), forme (sfere e dischi), componenti centrali (fosfolipidi, trigliceridi e polimeri) e composizioni lipidiche. Il loro obiettivo era quello di capire nei topi ApoE<sup>-/-</sup> come la distribuzione nella placca in vivo e l'ingresso delle cellule immunitarie dipendono da parametri fisico-chimici. NPs che imitano l'HDL possono accumularsi all'interno delle placche in modo più efficace rispetto ai liposomi. Tutte le NPs testate riescono ad entrare nella placca indipendentemente da dimensioni, forma e composizione lipidica.

## Dimensione

Un attento esame della letteratura atero-nano rivela un'ampia finestra di NP utilizzate per il targeting di placche aterosclerotiche, che vanno da 2 a 500 nm. La scelta di dimensioni più diffusa scende sotto i 50 nm, ma le ragioni per la loro scelta sono controverse. Per esempio, quando alcuni ricercatori hanno utilizzato NP diossido di ferro sub-20 nm per sfruttare le loro proprietà

superparamagnetiche per la risonanza magnetica <sup>106</sup>, altri hanno scelto questa finestra di dimensione con la premessa che le NP più piccole tendono ad attraversare l'endotelio per entrare più facilmente nella placca<sup>107</sup>. Tuttavia, la maggior parte della letteratura atero-nano fino a poco tempo fa non riportava l'emivita di circolazione delle NP stesse, né quantificava l'efficienza di distribuzione nelle placche. Nel 2016, Tang et al. <sup>108</sup> hanno sistematicamente chiarito l'effetto delle dimensioni sulla farmacocinetica iniettando 17 diversi tipi di NP in topi ApoE<sup>-/-</sup>. Gli autori hanno anche osservato che le NPs più piccole hanno emivita di circolazione più lunga (NP1: 7 nm; 5.0 h; NP10: 30 nm; 6.3 h) rispetto alle più grandi NPs come NP12 (≈400 nm; 0.71 h) e NP14 (70 nm; 0.67 h). Un'eccezione al rapporto inverso tra la dimensione delle NPs e il tempo di dimezzamento nel sangue è costituito da NPs anfifiliche a base di acido mucico, con un tempo di dimezzamento di ≈28 h nonostante il suo grande diametro di 160 nm nei topi ApoE<sup>-/-</sup> <sup>104</sup>. Nella finestra delle dimensioni inferiori a 50 nm, è stato osservato che NPs più grandi (ad esempio, 17,7 h per l'ossido di ferro NPs con una dimensione di ≈38 nm) hanno una circolazione più lunga rispetto a NPs più piccole (ad esempio, 2,8 h per NPs lipidiche con una dimensione di ≈8,6 nm)<sup>109</sup>, coerentemente con l'idea che biomacromolecole<sup>110</sup> o NPs<sup>111</sup> più piccole di 10 nm abbiano una clearance renale in pochi minuti.

Molti studi non hanno quantificato l'efficienza di somministrazione di NPs nelle placche, impedendo un'analisi comparativa dell'effetto delle dimensioni sulla biodistribuzione. Ad esempio, Taniguchi et al. <sup>112</sup> hanno affrontato in modo qualitativo l'effetto della dimensione delle NPs nel 2016, iniettando micelle polimeriche di diverse dimensioni in ratti dopo lesione all'arteria carotidea utilizzando un catetere a palloncino, hanno riportato che NPs di 40 nm possono accumularsi più abbondantemente e più persistentemente di NPs di 100 o 200 nm, mostrando chiaramente l'effetto della dimensione delle NPs sul targeting della placca. In luogo dell'efficienza di distribuzione in termini di percentuale di dose iniettata (%ID) o %ID per grammo di tessuto (%ID g<sup>-1</sup>), ci sono dati NIRF e di imaging confocale per confrontare qualitativamente l'efficienza di distribuzione di NPs di dimensioni diverse. In effetti, un ostacolo fondamentale per valutare il ruolo della dimensione delle NPs confrontando la letteratura atero-nano sta nell'incoerenza dei tempi selezionati in vari studi. L'efficienza di erogazione può differire drasticamente tra 1 e 24 ore dopo l'iniezione <sup>112</sup>, ma la

maggior parte degli studi non ha offerto dati di biodistribuzione dipendenti dal tempo. Anche se le placche aterosclerotiche si localizzano in diversi punti del sistema circolatorio, misure quantitative sull'aorta, uno dei principali siti per le placche aterosclerotiche, sono validi per valutare la biodistribuzione di diversi tipi di NPs. Nel 2016, Tang et al.<sup>108</sup> hanno studiato l'effetto della dimensione delle NPs sulla distribuzione nell'aorta. Con l'imaging NIRF ex vivo, hanno osservato un rilascio più pronunciato di NPs per NPs inferiori a 20 nm (NPs 1-4, 9-10, e 16) rispetto a quelle più grandi di 40 nm (NPs 12-15 e 17). Per affrontare la selettività della somministrazione delle NPs, gli autori hanno riportato i rapporti di intensità di NIRF tra l'aorta e il fegato, una destinazione comune delle NPs iniettate per via endovenosa. E' emerso che NPs più piccole di 20 nm hanno rapporti aorta-livello fegato più alti rispetto a quelli più grandi di 40 nm.

Tuttavia, a fronte di questi studi, bisogna considerare che particelle molto piccole tenderebbero a marginalizzare meno nel vaso, probabilmente perchè verrebbero intrappolate dai globuli rossi nella zona centrale del circolo sanguigno, riducendo così l'efficienza del loro legame con l'endotelio. Pertanto la dimensione di 200 nm sembra il miglior compromesso dal punto di vista della biodistribuzione nel cardiovascolare.

### Forma

Negli ultimi anni l'effetto della forma sulla distribuzione delle NPs negli animali aterogenici è stato studiato molto meno approfonditamente e riportato in modo più coerente rispetto all'effetto delle dimensioni. Nel 2016, Tang et al.<sup>108</sup> hanno preparato NPs discoidali e sferiche a base di HDL, composte da 1,2-dimiristoil-sn-glycero-3-phospho-choline (DMPC) o POPC. Un attento esame dei dati in vivo sia del DMPC- e POPC-based HDL NPs HDL in topi ApoE-/- non rivela differenze consistenti tra le due forme nella farmacocinetica, nella distribuzione nell'aorta, e nell'associazione ai macrofagi aortici. Nel 2016, Yi et al.<sup>113</sup> hanno studiato l'effetto della geometria delle NPs sulla distribuzione a livello di organi e a livello cellulare, preparando NPs con la stessa chimica polimerica ma con forme diverse. Nei topi Ldlr-/-, i polimersomi che hanno come bersaglio aortico le cellule dendritiche, sono più specifiche di micelle e filomicelle che nell'aorta si legano più facilmente dei polimersomi ai macrofagi, cellule B e cellule NK. I polimersomi

si accumulano maggiormente anche nell'avventizia laminare di topi Ldlr-/- più che nei topi normali.

### Densità del ligando

Il ruolo della densità del ligando nel bersaglio della placca è ambiguo per diversi motivi. Mancano indagini sistematiche sull'effetto della densità del ligando sulla farmacocinetica e sulla somministrazione nelle placche in modelli animali. Inoltre, molti studi sul targeting di NPs hanno quantificato l'efficienza di distribuzione nella placca in termini di %ID g<sup>-1</sup>, ma non hanno quantificato la densità del ligando sulla superficie delle NPs; al contrario, altri studi hanno quantificato la densità del ligando bersaglio delle NPs, ma non hanno rivelato la loro efficienza di distribuzione. Alcuni bio-nanomateriali come HDL e NPs a base di acido ialuronico (HA), possono naturalmente e preferibilmente entrare nella placca senza portare ulteriori ligandi bersaglio. Alcuni autori hanno scelto di riportare il rapporto tra i vari componenti delle NPs (ad esempio, HDL vs. polimero vs. lipide) al posto della densità del ligando. Sulla base di rapporti che hanno rivelato un valore per la densità dei ligandi, da un'analisi comparativa di Chan et al<sup>86</sup> è evidente che il peptide è il tipo più comune di ligando utilizzato. Nonostante l'ampiezza del range della densità dei ligandi riportato (da  $4,2 \times 10^{-5}$  a 0,24 peptidi per nm<sup>2</sup> della superficie del NP), una densità tra  $10^{-3}$  e  $10^{-2}$  peptide nm<sup>-2</sup> è tipicamente sufficiente per il targeting della placca, con un'efficienza di consegna tra 0,9<sup>79</sup> e 6,1% ID g<sup>-1</sup><sup>114</sup>.

### Applicazioni biomediche precliniche: Imaging

#### RISONANZA MAGNETICA

Per le applicazioni di risonanza magnetica sono state spesso utilizzate NP all'ossido di ferro, la cui dimensione è stata mantenuta al di sotto dei 20 nm per sfruttare le loro proprietà superparamagnetiche (SPIONs). Tali SPIONs, rivestite prevalentemente da destrano sulla superficie, possono legare peptidi<sup>115</sup>, anticorpi<sup>116</sup>, o proteine<sup>117</sup> per colpire vari componenti delle placche. Mentre per le NPs a base di Gd i ricercatori sfruttano il grande rapporto superficie-volume

per incapsulare elevate quantità di ioni  $Gd^{3+}$  al fine di aumentare la sensibilità di rilevamento. Infatti, il caricamento di ioni  $Gd^{3+}$  nelle NPs ( $\approx 300\,000\text{ Gd}/300\text{ nm NP}$ ) può generare segnali RM significativamente più forti di quelli ottenibili coniugando a peptidi ( $\approx 4\text{ Gd per molecola}$ ) o anticorpi ( $\approx 20\text{ Gd per molecola}$ ). Le classiche NPs cariche di  $Gd^{3+}$  per la rilevazione di placche aterosclerotiche mediante risonanza magnetica includono micelle polimeriche<sup>118</sup> e lipoproteine<sup>107</sup>. Nel 2014, Bruckman et al.<sup>119</sup> hanno studiato NPs modificate a base del virus del mosaico del tabacco e ioni Gd chelati per facilitare il targeting delle molecole VCAM-1 espresse dalle cellule endoteliali e la visualizzazione della placca nei topi ApoE<sup>-/-</sup>. Nello stesso anno, Xing et al.<sup>120</sup> hanno iniettato per via endovenosa nanodots di  $NaGdF_4$  in conigli aterosclerotici. La piccola dimensione di 2 nm conferisce loro un'elevata dispersione in acqua e rilassamento longitudinale r1. Questa piccola dimensione facilita anche l'ingresso delle NPs in vasi più piccoli e la clearance renale senza ritenzione prolungata all'interno del corpo. Sorprendentemente, gli autori hanno osservato l'accumulo di NPs nella placca dopo 3 ore di iniezione, delineando chiaramente l'aorta addominale e la vena cava inferiore. Nel 2015, Palekar et al.<sup>121</sup> hanno iniettato fluorocarbonio-NPs per risonanza magnetica in topi ApoE<sup>-/-</sup> e hanno quantificato il grado di permeabilità della placca e il danno vascolare con la spettroscopia MR. Hanno scoperto che i topi con una dieta ad alto contenuto di grassi per 12 settimane sviluppano un endotelio più permeabile molto più velocemente.

#### Biomateriali polimerici: l'acido ialuronico, HA

Nel 2015, Sanchez-Gaytan et al.<sup>122</sup> hanno combinato peptidi di ApoA con polimeri biodegradabili per formare NP che mimano le HDL e hanno dimostrato che queste per iniezione endovenosa possono mimare i macrofagi nella placca. Infine, secondo le ultime indagini, i bio-nanomateriali sintetici a base di zuccheri possono colpire le placche aterosclerotiche e mostrare effetti anti-aterosclerotici. L'HA, una componente chiave della matrice extracellulare e attualmente testato in studi atero-nano, può riconoscere il CD44, un recettore dell'HA presente sui macrofagi attivati<sup>123</sup>. CD44 contribuisce al rimodellamento vascolare interagendo con cellule vascolari muscolari lisce, cellule endoteliali e piastrine per promuovere l'aterogenesi. Nel 2015, Lee et al.<sup>124</sup> hanno dimostrato

che le NPs a base di HA si accumulano in placche aterosclerotiche in modo più preferenziale rispetto all'aorta normale 24 ore dopo la loro iniezione sistematica in topi ApoE<sup>-/-</sup>. Nel 2017, Beldman et al.<sup>125</sup> hanno fornito prove dirette delle proprietà ateroprotettive delle NPs basate sull'HA in combinazione con la loro capacità di mirare i macrofagi all'interno di placche aterosclerotiche<sup>126</sup>. Dopo aver somministrato HA-NPs in topi ApoE<sup>-/-</sup> per 12 settimane consecutive, le placche mostrano un numero ridotto di macrofagi e un contenuto di collagene maggiore rispetto ai topi non trattati o ai topi trattati con HA libero.

### NPs e terapia farmacologica

Per quanto riguarda il trattamento farmacologico dell'aterosclerosi, le statine rappresentano la scelta di prima linea per abbassare i livelli di colesterolo LDL e i rischi di malattie cardiovascolari<sup>127</sup>. Tuttavia, alte dosi di statine possono indurre epatossicità e miopatia, inoltre le statine assunte per via orale di solito si accumulano nel fegato. Nel 2014, Duivenvoorden et al.<sup>128</sup> hanno utilizzato NP HDL (rHDL) per aumentare la concentrazione locale di simvastatina consegnata a placche aterosclerotiche in topi ApoE<sup>-/-</sup>. Sulla base dei dati della risonanza magnetica, gli autori hanno concluso che un regime di trattamento a bassa dose di statina-rHDL per 3 mesi inibisce la progressione dell'infiammazione della placca. L'esame istologico delle radici aortiche conferma inoltre che un regime ad alto dosaggio di 1 settimana riduce sostanzialmente l'infiammazione nelle placche aterosclerotiche avanzate. In uno studio di follow-up nel 2015, Tang et al.<sup>105</sup> hanno inoltre illustrato che la combinazione di trattamento a base di NPs e trattamento con statina orale per 8 settimane non ha indotto epatossicità, mentre l'infiammazione della placca è comunque soppressa. I bio-nanomateriali possono anche facilitare la somministrazione di altre forme di statina alle placche. Nel 2014, Katsuki et al.<sup>129</sup> hanno preparato NP polimeriche caricate con pivalastatina e le hanno iniettate i.v. in topi ApoE<sup>-/-</sup>. Gli autori hanno osservato l'inibizione della destabilizzazione della placca e della rottura associata ad una diminuzione dell'infiltrazione di monociti. I ricercatori hanno anche usato farmaci approvati per indicazioni relative all'aterosclerosi. Il Pioglitazone è utilizzato per il trattamento del diabete, una malattia spesso accompagnata dallo sviluppo di patologie cardiovascolari. Nel 2013, Saremi et al.<sup>130</sup> hanno riportato che il trattamento con pioglitazone ritarda l'ispessimento dell'intima della carotide di pazienti con prediabete. Nel 2016, iniettando NPs polimeriche caricate con



pioglitazone in topi ApoE<sup>-/-</sup>, Nakashiro et al.<sup>126</sup> hanno osservato la ritenzione di NPs nei monociti circolanti e nei macrofagi aortici. Iniezioni settimanali in 4 settimane riducono il cappuccio fibroso, un marcatore della rottura della placca.

### Interazioni in vivo atero-nano

Mentre le placche aterosclerotiche possono essere strutturalmente meno complesse o eterogenee dei tumori, i volumi delle placche significativamente inferiori rispetto ai tumori ne rendono più complessa la somministrazione in vivo. In linea con l'effetto EPR, studi recenti hanno valutato l'importanza della permeabilità vascolare nella somministrazione di NP alle placche. Nel 2015, Lobatto et al.<sup>131</sup> hanno riportato una forte correlazione tra la permeabilità dei vasi sanguigni, accertata dalla risonanza magnetica e l'accumulo di NPs liposomiali fluorescenti determinato dalla microscopia a fluorescenza nei conigli.

Molti aspetti meccanicistici delle interazioni atero-nano sono ancora senza risposta. Come interagiscono le NPs iniettate con le proteine sieriche in circolazione? In che modo le NPs iniettate influenzano la marginalizzazione, l'uscita dei leucociti circolanti per il contatto con l'endotelio, in animali aterosclerotici? Quali sono la cinetica di diffusione tissutale, cellulare e subcellulare e di internalizzazione all'ingresso di NPs nella placca? Se le NPs sopportano ligandi che prendono di mira una particolare componente della placca, in che modo la natura dei ligandi di targeting influisce sull'associazione delle NPs con diversi tipi di cellule e componenti extracellulari delle placche? Quali percorsi o recettori regolano l'assorbimento di NPs da diversi tipi di cellule all'interno della placca? Qual è il destino delle NPs dopo essere entrati nella placca? Sono rilevate ed eliminate dalle cellule immunitarie (che innescano una risposta pro-infiammatoria), o rimangono permanentemente all'interno della placca?

Inoltre, è fondamentale sondare le interazioni atero-nano in più specie animali e verificare se i risultati di una specie sono traducibili da una specie all'altra. Nel 2016, Perez-Medina et al.<sup>109</sup> hanno accertato la distribuzione di HDL-NP iniettate per iniezione i.v. in topi aterosclerotici, conigli e maiali mediante imaging multimodale. Gli autori hanno costantemente osservato il miglioramento

dell'accumulo di NPs nelle placche ed il rene come sito primario di accumulo delle NPs.

### Traduzione clinica di nanomedicine aterosclerotiche

Nonostante la prevalenza di bio-nanomateriali nelle applicazioni precliniche per l'aterosclerosi, il loro uso clinico è evidentemente meno diffuso. Nel 2012, Alam et al.<sup>132</sup> hanno riportato uno studio clinico che ha coinvolto pazienti affetti da infarto miocardico acuto che hanno ricevuto l'infusione di SPIONs (NCT01323296). 48 ore dopo l'infusione le risonanze magnetiche dei pazienti dimostrano che le NPs si accumulano preferenzialmente nel miocardio ischemico, come evidenziato da un aumento di valori di rilassività rispettivamente di 3 e 1,7 volte nell'infarto del miocardio e nel miocardio remoto. In uno studio clinico randomizzato riportato nel 2015, van der Valk et al.<sup>133</sup> hanno utilizzato liposomi a lunga circolazione per la somministrazione sistemica di prednisolone a pazienti con aterosclerosi (NCT01039103, NCT01647647685, NCT01601601106). Il prednisolone, un glucocorticoide antinfiammatorio, presenta generalmente un profilo farmacocinetico scadente e non si accumula nella placca in quantità sufficientemente elevate da produrre un risultato terapeutico favorevole<sup>134</sup>. Con questa formulazione liposomiale, gli autori hanno fornito prednisolone in quantità più elevate ai macrofagi all'interno di placche iliofemorali e con prolungamento dell'emivita del prednisolone nel sangue. Anche se il loro approccio liposomiale consente un rilascio specifico nella placca e può superare gli effetti collaterali sistemici, non riduce l'infiammazione o la permeabilità della parete arteriosa.

### Conclusione

Il campo della ricerca atero-nano è in forte crescita, come confermato dall'aumento delle applicazioni precliniche dei bio-nanomateriali per il targeting, l'imaging e il trattamento dell'aterosclerosi negli ultimi cinque anni. La traduzione clinica rimane limitata, in parte a causa della mancata comprensione delle interazioni tra i bio nanomateriali e i vari componenti della placca. Sono necessari studi sulla progettazione e lo screening di bionanomateriali per modulare la

progressione dell'aterosclerosi attraverso un targeting più specifico, una diagnosi sensibile e un trattamento efficace delle placche.

## TARGETING DELLE NANOPARTICELLE NELL'ATEROSCLEROSI

La presenza di diverse barriere biologiche richiede l'utilizzo di carrier specifici per il trattamento e la diagnosi dell'aterosclerosi. L'utilizzo di strategie di targeting efficienti evita l'eliminazione rapida da parte di filtri biologici intrinseci come fegato, reni e linfonodi ed evita la sistematica comparsa di effetti collaterali. La conoscenza dei marker aterosclerotici e la coniugazione con ligandi complementari al sistema nanocarrier, può guidare e concentrare l'agente terapeutico nel sito d'azione<sup>135</sup>. In alternativa, l'infiammazione e l'angiogenesi all'interno delle arterie malate consentono l'uso del targeting passivo attraverso l'effetto di permeabilità e ritenzione (EPR) potenziato<sup>136</sup>. La propagazione delle lesioni nell'aterosclerosi porta alla neovasculogenesi simile a quella osservata nella crescita tumorale cancerosa. L'elevata attività metabolica della struttura della placca richiede un elevato nutrimento e apporto di ossigeno alle cellule sottostanti. Per soddisfare questo bisogno nutrizionale, le cellule endoteliali proliferano rapidamente e formano vasi sanguigni atipici che sono difettosi e immaturi. Questo stato modifica la dinamica del trasporto macromolecolare da e verso la lesione ed è noto come effetto EPR. L'effetto EPR è stato studiato soprattutto nel cancro; le caratteristiche dei tumori comprendono i vasi sanguigni permeabili, il cui endotelio è fenestrato con lacune tra 100 e 780 nm di dimensioni e drenaggio linfatico disfunzionale<sup>137,138</sup>. La maggiore permeabilità della vascolarizzazione tumorale anormale consente alle NP lo stravasamento nello spazio interstiziale del tumore, mentre il drenaggio linfatico inefficace provoca la ritenzione delle NPs all'interno del tessuto e consente loro di rilasciare farmaci in prossimità delle cellule tumorali<sup>139,140</sup>. Sebbene non sia mai stato studiato a fondo nell'aterosclerosi, il targeting non specifico basato sull'effetto EPR può essere sfruttato a causa della maggiore permeabilità dell'endotelio disfunzionale, dell'espansione angiogenica e della perdita dei *neovessel del vasa vasorum*<sup>141</sup>. In generale, le NPs con diametro inferiore a 200 nm sono considerate le più efficaci per l'effetto EPR<sup>138,142,143</sup>.

La vascolarizzazione alterata consente alle macromolecole o ai nanoassemblati di passare nel tessuto interstiziale, mentre un sistema di drenaggio linfatico non sviluppato favorisce l'accumulo, e quindi una maggiore concentrazione terapeutica locale<sup>135,144</sup>. Oltre alla neovascolarizzazione, l'infiammazione dei tessuti provoca un continuo reclutamento dei leucociti attraverso il rilascio di citochine proinfiammatorie. Questa condizione aumenta anche la permeabilità endoteliale e consente l'erogazione selettiva di carrier terapeutici nell'area infiammata<sup>135,145</sup>.

Per il **targeting attivo**, l'endotelio disfunzionale è una caratteristica patofisiologica chiave nell'aterosclerosi e serve naturalmente come candidato per il targeting in quanto esiste un ampio spettro di bersagli vascolari disponibili per la consegna mirata di sistemi terapeutici sitospecifici per stabilizzare e regredire la placca (Figura 2). Ad esempio, le molecole di adesione cellulare (come le molecole di adesione intercellulare 1 (ICAM 1) e le molecole di adesione cellulare vascolare 1 (VCAM 1), le selectine o le integrine come l'integrina  $\alpha V\beta$  rappresentano un'importante classe di target attraenti per il rilascio di farmaci antiaterosclerotici<sup>20,25</sup>, poiché queste molecole di adesione sono tipicamente sovraesprese sull'endotelio angiogenico / attivato della parete luminale.

Allo stesso modo, anche il recettore delle lipoproteine a bassa densità ossidato simile alla lectina (LOX-1) presente nelle cellule endoteliali è un sito bersaglio dell'aterosclerosi. Le lipoproteine ossidate a bassa densità (oxLDL) contribuiscono alla formazione e alla progressione della placca aterosclerotica attraverso l'induzione di disfunzione endoteliale, formazione di cellule macrofagi/cellule schiumose, migrazione e proliferazione di cellule muscolari lisce,(SMC). LOX-1 è il principale recettore LDL ossidato (oxLDL) delle cellule endoteliali, ed è anche espresso in macrofagi e SMC<sup>146</sup>.

Inoltre, i macrofagi rappresentano un altro componente importante per il targeting specifico di placche con nanoparticelle funzionalizzate. Ad esempio, i recettori scavenger SR-A1 e CD36, espressi prevalentemente sui macrofagi, sono entrambi obiettivi desiderabili per le NPs. Inoltre, le lipoproteine come LDL e lipoproteine ad alta densità (HDL), sono potenziali candidati per il targeting aterosclerotico. Queste lipoproteine interagiscono con le placche attraverso un condotto naturale, pertanto le nanoparticelle ingegnerizzate che possiedono le

proprietà delle lipoproteine possono accumularsi nella placca attraverso un targeting intrinseco <sup>128,143,147</sup>.

L'endotelio vascolare funge da candidato naturale per il targeting in quanto è strategicamente posizionato tra il sangue circolante e la lesione in crescita, oltre ai suoi molteplici ruoli nella patogenesi dell'aterosclerosi <sup>148</sup>. Nelle prime fasi della malattia, l'endotelio altera la sua superficie cellulare mediante l'espressione di proteine che a loro volta avviano il reclutamento delle cellule infiammatorie dal flusso sanguigno all'intima. I ligandi che riconoscono queste proteine sulla superficie cellulare proinfiammatoria possono quindi servire da marcatori specifici per guidare nuovi sistemi diagnostici e terapeutici. Ad esempio, le molecole di adesione cellulare (CAM) sono di particolare interesse per il rilascio mirato per il loro importante ruolo nel reclutamento dei leucociti e nell'internalizzazione dei ligandi legati ai recettori attraverso l'endocitosi mediata da CAM <sup>135,148,149</sup>. Attuali recettori della superficie cellulare che svolgono un ruolo nella patogenesi dell'aterosclerosi e anche esemplificare obiettivi interventistici adeguati sono illustrati nella Figura 4.

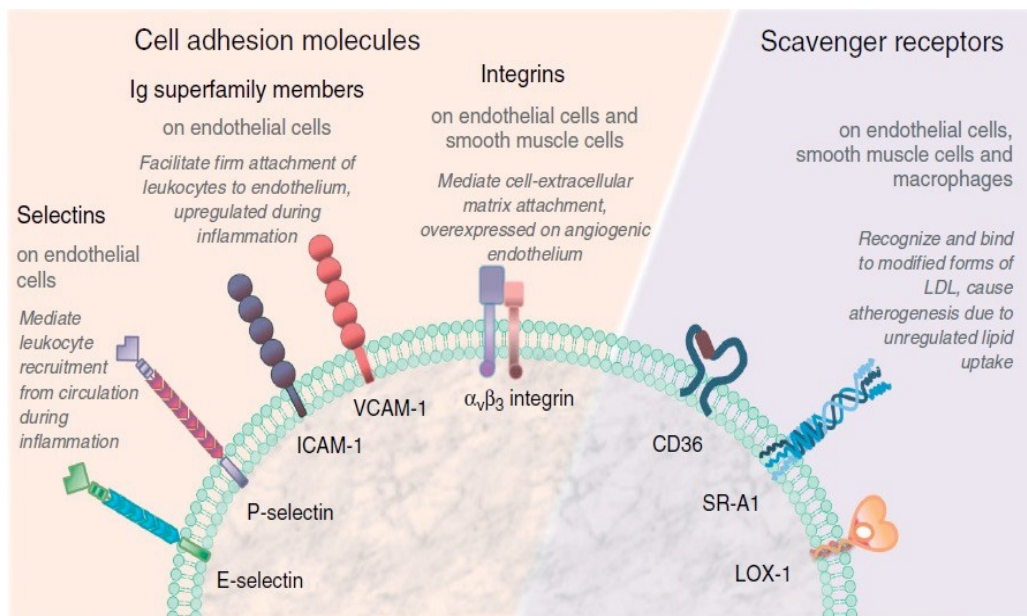


Figura 4. Recettori bersaglio della superficie cellulare per applicazioni terapeutiche dell'aterosclerosi. Lewis et al 2011<sup>135</sup>

La molecola-1 di adesione intercellulare delle cellule (ICAM-1) è un membro della superfamiglia delle immunoglobuline CAM delle glicoproteine. L'ICAM-1 è normalmente espresso sul lato luminale dell'endotelio e significativamente (~ 20-50 volte <sup>150</sup>) sovraregolato dopo l'infiammazione. L'analisi immunoistochimica delle lesioni umane ex vivo ha mostrato una forte espressione dell'ICAM-1 nelle cellule vascolari che formano l'ateroma, stabilendo così il suo ruolo nella progressione della malattia <sup>151</sup>. Per il trattamento di malattie infiammatorie, compresa l'aterosclerosi sono stati impiegati per lo sviluppo di strategie di targeting anticorpi <sup>135,150,152-154</sup> e piccole sequenze di peptidi <sup>135,155</sup> derivati da ligandi endogeni di ICAM-1, analogamente la molecola di adesione cellulare vascolare (VCAM-1), simile all'ICAM-1. VCAM-1 è espresso su superfici endoteliali in condizioni patologiche ma anche prima dell'inizio di lesioni visibili <sup>135</sup>. Le nanoparticelle coniugate a sequenze di peptidi che si legano a VCAM-1 (ottenute mediante fage display da ligandi noti di VCAM-1) hanno dimostrato di essere efficaci per imaging della progressione iniziale della malattia nei topi knock-out ApoE <sup>135,156</sup>. Inoltre, a parte gli usi terapeutici o diagnostici, i nanosistemi decorati con ligandi mirati CAM offrono un ulteriore vantaggio per l'aterosclerosi poiché tali ligandi possono anche attenuare l'adesione leucocitaria all'endotelio e di conseguenza ridurre l'ateroinfiammazione<sup>135</sup>.

Anche i recettori di Selectin (E- e P-selectin) sono considerati potenziali target endoteliali<sup>135,157,158</sup> considerando i loro ruoli importanti nell'infiammazione. Sfortunatamente, la loro espressione transitoria e la bassa densità della superficie cellulare, anche alla massima attivazione, ne limitano l'uso nel targeting dell'aterosclerosi. Inoltre, i carrier terapeutici specifici per P-Selectin potrebbero non essere specifici per l'endotelio delle placche aterosclerotiche poiché questo recettore è anche espresso nelle piastrine attivate <sup>159</sup>. Tuttavia, come bersaglio è stato usato il doppio targeting di P-selectina e VCAM-1 con particelle di ossido di ferro di dimensioni micron, strategia di successo per l'imaging della RM delle placche aterosclerotiche nei topi knockout ApoE. In questo studio è stato dimostrato che il doppio targeting determina un aumento da 5 a 7 volte del legame dell'agente di contrasto alla lesione<sup>135,160</sup>.

Come accennato in precedenza, è stato anche dimostrato che c'è una neovascolarizzazione associata all'aterosclerosi<sup>135,161,162</sup>. Oltre a causare l'effetto EPR, i vasi sanguigni di nuova formazione che circondano la placca mostrano anche un aumento dell'espressione dell'integrina  $\alpha\beta3$ . Sono state utilizzate nanoparticelle paramagnetiche che incorporano un farmaco angiostatico e/o sistemi "teranostici", specifiche per l'integrina, in conigli nutriti con colesterolo<sup>135,163</sup>. Questo sistema integrato ha dimostrato il potenziale dei nanosistemi, non solo di fornire un effetto terapeutico, ma anche fornire contemporaneamente un mezzo di contrasto, fornendo così uno strumento per visualizzare la risposta locale della lesione aterosclerotica nel tempo.

Oltre alle proteine della superficie cellulare endoteliale, ci sono poi recettori scavenger specifici dei macrofagi<sup>135,164,165</sup>, epitopi specifici per ossidazione, fibrina, e la matrice extracellulare o anche le proteine<sup>135</sup> come potenziali candidati per lo sviluppo di ligandi bersaglio. Ad esempio, il targeting dei recettori scavenger endoteliali o dei macrofagi può bloccare l'inizio della attivazione infiammatoria poiché questi recettori mediano l'assorbimento di oxLDL e stabiliscono la cascata dell'infiammazione. I recettori scavenger di SR-A1 e CD36, espressi principalmente sui macrofagi, sono entrambi partecipanti all'aterogenesi e all'ateroinfiammazione<sup>86,135</sup>. LOX-1, un recettore scavenger endoteliale, internalizza oxLDL ed è stato dimostrato causa disfunzione endoteliale con un'ulteriore progressione della malattia<sup>135,146</sup>. I residui di ossidazione specifici della fosfocolina sono riconosciuti da CD36 e possono essere incorporati nelle micelle per indirizzare i nanosistemi ai macrofagi delle lesioni.<sup>135,166</sup>

### CD36, un recettore scavenger implicato nell'aterosclerosi

Il CD36 è una glicoproteina di membrana presente su vari tipi di cellule, inclusi monociti, macrofagi, cellule endoteliali microvascolari, adipociti e piastrine<sup>167</sup>. Il CD36 del macrofago partecipa alla formazione della lesione arteriosa aterosclerotica attraverso la sua interazione con lipoproteine ossidate a bassa densità (oxLDL), innescando la segnalazione di cascate per risposte infiammatorie. Il CD36 funziona nella captazione di oxLDL e nella formazione di cellule schiumose, che è lo stadio critico iniziale dell'aterosclerosi. Inoltre, oxLDL

via CD36 inibisce la migrazione dei macrofagi, che può essere un meccanismo di intrappolamento dei macrofagi nelle lesioni aterosclerotiche. Il CD36 piastrinico promuove anche i processi infiammatori aterosclerotici ed è coinvolto nella formazione di trombi dopo la rottura della placca aterosclerotica. Poiché il CD36 è un componente essenziale dell'aterosclerosi, la definizione della sua funzione e il relativo targeting può portare a una nuova strategia di trattamento per l'aterosclerosi.

Il CD36, un recettore della glicoproteina transmembrana di 88 kDa, è espresso su vari tipi di cellule, inclusi monociti e macrofagi, piastrine, cellule endoteliali microvascolari, adipociti, cellule epiteliali nei miociti renali e cardiaci<sup>168</sup>. Appartiene alla famiglia dei recettori scavenger di classe B. La proteina CD36 è composta da una singola catena peptidica di 472 aminoacidi ed è organizzata in due domini transmembrana: due domini citoplasmatici molto corti e un grande dominio extracellulare glicosilato. L'ampia glicosilazione di CD36 è necessaria per il passaggio intracellulare attraverso la membrana cellulare. Il legame con il CD36 endoteliale inibisce l'angiogenesi inducendo l'apoptosi<sup>169</sup>.

La formazione di cellule schiumose è la fase critica iniziale dell'aterosclerosi. Il processo aterogenico inizia con la tras migrazione dei monociti circolanti dal sangue all'intima arteriosa, dove si differenziano in macrofagi<sup>170</sup>. I macrofagi si legano e interiorizzano oxLDL attraverso CD36<sup>171</sup>. I macrofagi attivati secernono ossidasi, compresa la mieloperossidasi, che ossida LDL e quindi ingrandisce il pool di oxLDL. L'interazione tra CD36 e oxLDL induce anche la secrezione di citochine che reclutano infiltrati di cellule immunitarie nell'intima arteriosa e l'infiammazione arteriosa provocata da cellule schiumose induce il restringimento arterioso, provocando la patologia vascolare aterosclerotica. L'interazione tra il recettore del fattore di attivazione piastrinica e il CD36 media anche l'assorbimento di oxLDL e la produzione di IL-10.

Pertanto, il macrofago CD36 si coordina con molti altri partner di segnalazione e funziona come una molecola di segnalazione che promuove l'aterosclerosi mediando la formazione di cellule espanse e il rilascio di mediatori infiammatori.

La modulazione citoscheletrale mediata da CD36 induce il l'intrappolamento del macrofago nella placca aterosclerotica<sup>168</sup>.



Tipicamente, l'infiammazione aterosclerotica non si risolve spontaneamente, il che porta a un rimodellamento arterioso irreversibile. L'attivazione dei macrofagi è un attributo tipico dell'infiammazione aterogena. Contrariamente all'infiammazione acuta, in cui le risposte infiammatorie sono risolte dall'emigrazione delle cellule immunitarie infiltrate nei linfonodi drenanti, durante l'infiammazione aterogena, i macrofagi sono intrappolati nelle lesioni aterosclerotiche e continuano a propagare la risposta infiammatoria senza risoluzione.

E' stato isolato anche un isotipo CD36 non legato alle cellule dal plasma umano indicato come CD36 solubile (sCD36). Il livello di sCD36 rappresenta il livello di espressione di CD36 in vari tipi di cellule e tessuti nei modelli umani e roditori di insulino-resistenza e portatori di diabete di tipo 2. In accordo con il ruolo di CD36 nell'infiammazione aterogena, il livello di sCD36 è risultato correlato alla mortalità cardiovascolare<sup>172</sup>, anche se ci sono ancora pochi studi sul sCD36 nell'uomo. Pertanto per le caratteristiche e le funzioni del recettore CD36, questo può essere considerato un ottimo bersaglio per il targeting attivo delle placche aterosclerotiche.

## Capitolo 2: OBIETTIVO DEL PROGETTO DI DOTTORATO e CONDUZIONE DELLA CAMPAGNA SPERIMENTALE.

Le preparazioni farmacologiche convenzionali soffrono di alcune limitazioni come alte dosi e bassa disponibilità, instabilità e bassa specificità. Pertanto la possibilità di veicolare una sostanza attiva nel sito di interesse utilizzando nanovettori funzionalizzati con ligandi specifici permette di avere un'azione più efficace. Come indicato nella sezione introduttiva, un nanovettore ideale per applicazioni di somministrazione di farmaci o di mezzi di contrasto deve essere biodegradabile e biocompatibile, in grado di riconoscere il sito target, possedere proprietà biofisico-chimiche ottimali per il caricamento dei farmaci/mezzi di contrasto, avere lunghi tempi di circolazione, indice terapeutico favorevole ed infine, in relazione al costo effettivo, commercializzabile. L'obiettivo principale della nanomedicina è racchiudere queste proprietà in un nanocarrier<sup>173</sup>. Per quanto riguarda l'imaging, in contrasto con i tradizionali approcci, l'imaging molecolare consente di valutare le caratteristiche biologiche delle placche aterosclerotiche in vivo permettendo la prevenzione, lo screening, la diagnosi e il trattamento dei disturbi vascolari. Ad oggi mancano strumenti di imaging per la diagnosi precoce dell'ateroma clinico basato sulla biologia della placca. Infatti, nonostante ci sia una vasta conoscenza sull'uso delle nanotecnologie nelle malattie cardiovascolari, l'uso di nanovettori per applicazioni di imaging nella pratica clinica rimane limitato, non solo per la sicurezza, ma anche per la natura eterogenea delle placche aterosclerotiche che non consente una corretta selezione dei diversi tipi di pazienti. Inoltre, è noto che la vecchia generazione di NPs

non è specifica e in realtà non esiste un prodotto commercializzato, senza considerare che esistono diverse anatomie della malattia vascolare nell'uomo.

In questo contesto, quindi, la combinazione di specifici ligandi e nanostrutture diventa un fattore chiave per interagire e / o superare le barriere biologiche e rendere specifica l'azione dei nanocarrier. In particolare, tra i ligandi, gli anticorpi

hanno una elevata specificità e affinità per i siti bersaglio. Inoltre, grazie all'elevato rapporto tra superficie e volume dei nanovettori è possibile modulare la densità superficiale dei ligandi.

L'obiettivo della seguente attività di ricerca è rivolto alla produzione e caratterizzazione di nanostrutture biocompatibili costituite da polimeri altamente idrofilici di origine naturale e molecole attive (in particolare mezzi di contrasto per RM), per la realizzazione di nanostrutture da impiegare in ambito clinico che, una volta funzionalizzate, consentiranno di migliorare la specificità verso il target (organo, tessuto, ecc...). In particolare, scopo del progetto è la progettazione, produzione e caratterizzazione di nanoparticelle per l'imaging diagnostico dell'aterosclerosi.

Per quanto detto in precedenza, essendo l'aterosclerosi una malattia evolutiva, è evidente che per una diagnosi precoce è fondamentale lo studio della "placca vulnerabile", soprattutto da un punto di vista morfologico, e che la tecnica più promettente è la RM mediante l'utilizzo di mdc. Inoltre l'ideale sarebbe poter somministrare il mdc in modo da migliorarne l'efficienza e garantirne l'accumulo nel sito di interesse per poterne ridurre così la dose di somministrazione e di conseguenza gli effetti tossici collaterali. Per questi aspetti la Nanomedicina, ed in particolare le nanoparticelle, possono venire incontro con l'impiego di carrier. Infatti il nanovettore da una parte svolge una funzione protettiva contro la destabilizzazione del Gd chelato, dall'altra offre l'opportunità di funzionalizzare ad hoc la superficie del nanovettore stesso in modo da veicolare attivamente il mdc per consentirne l'accumulo nel sito di interesse, nel caso specifico la placca aterosclerotica, e ridurre così come evidenziato, le dosi di somministrazione e di conseguenza la sua tossicità sistemica, potenziando allo stesso tempo le prestazioni del mdc nell'imaging delle placche aterosclerotiche, per le caratteristiche intrinseche del carrier polimerico legate al concetto di Hydrodenticity<sup>2</sup>, cioè al miglioramento della rilassività del mdc in presenza di strutture idrofiliche.

## PROGETTAZIONE DEL NANOVETTORE

Molto importante è la scelta dei materiali e dei metodi per la progettazione del nanovettore, in quanto da essi derivano caratteristiche di esso quali forma,

dimensione, carica e proprietà superficiali che ne influenzano la sua biodistribuzione e la relassività del mdc.

## DIMENSIONE

La biodistribuzione di sistemi nanoparticolati iniettati per via intravascolare è di fondamentale importanza per la progettazione razionale di sistemi per drug delivery. Una delle maggiori sfide nella progettazione di carrier per il targeting dal lume del vaso è che questi devono essere in grado di muoversi nel sistema di circolazione e marginarsi o localizzarsi in modo efficiente sull'endotelio per interagire con i recettori target.

Particolare attenzione è stata data all'effetto di forma e dimensione della particelle sulla loro biodistribuzione, in quanto recenti studi in letteratura hanno messo in evidenza una stretta correlazione tra esse<sup>174-176</sup>.

Premesso che le caratteristiche di un carrier per targeting vascolare devono essere:

- avere dimensioni non superiori a 500 nm in modo da poter circolare nel sistema vascolare evitando di rimanere intrappolato nei capillari<sup>174</sup>.
- evitare la fagocitosi da parte delle cellule del reticolo endoteliale, in modo da permetterne la sua circolazione per un tempo abbastanza lungo da favorire l'interazione con il sito bersaglio
- avere la capacità di spostarsi lateralmente verso le pareti del vaso in modo da poter interagire abbastanza a lungo con i recettori dell'endotelio e rimanere legato ad essi il tempo necessario da permetterne l'azione del mdc o di essere internalizzato nell'endotelio senza essere trascinato via dal flusso ematico.

Una volta iniettate in circolo, le particelle vengono trasportate lungo il sistema vascolare e si accumulano in vari organi attraverso diversi meccanismi (Fig. 5). Le particelle di dimensioni maggiori di 5-7  $\mu\text{m}$  rimangono intrappolate nei capillari più piccoli dei polmoni in maniera abbastanza rilevante, mentre particelle di dimensioni maggiori di 4-5  $\mu\text{m}$  vengono inghiottite dalle cellule fagocitiche negli

organi del sistema reticolo-endoteliale (RES) come fegato, milza e polmoni, pertanto è sicuramente auspicabile utilizzare carrier di dimensioni inferiori a tali range<sup>174</sup>. A livello endoteliale la grandezza dei pori dei vasi normali è compresa tra 6 e 12 nm , il che suggerisce che le nanoparticelle dovrebbero essere più grandi di questo range di dimensione. Inoltre, l'eliminazione dal circolo sanguigno avviene mediante filtrazione renale o attraverso il sistema reticoloendoteliale nel fegato e nella milza. La clearance renale è molto rapida per particelle con diametro idrodinamico inferiore a 5–6 nm, mentre la clearance da parte del fegato e della milza è rapida per particelle di grandi dimensioni, superiori a 200 nm in diametro. Per le nanoparticelle nell'intervallo da 6 a 200 nm, gli studi hanno dimostrato che l'emivita del sangue diminuisce all'aumentare del diametro delle particelle, a condizione che la chimica superficiale rimanga lo stessa<sup>177</sup>. Inoltre particelle molto piccole tenderebbero a marginalizzare meno nel vaso, probabilmente perché le dimensioni nanometriche determinano un loro maggior intrappolamento da parte dei globuli rossi nella zona centrale del circolo sanguigno, riducendo così l'efficienza del loro legame all'endotelio, ma è anche vero che le dimensioni nanometriche permettono una circolazione più lunga nell'organismo perché vengono riconosciute meno dalle cellule fagocitiche del RES (sistema reticolo endoteliale soprattutto nel fegato, milza, polmoni) migliorando per questo l'azione farmacologica/diagnostica.

Per tali considerazioni la dimensione ottimale dovrebbe essere intorno ai 200 nm<sup>176</sup> (Fig. 5a).

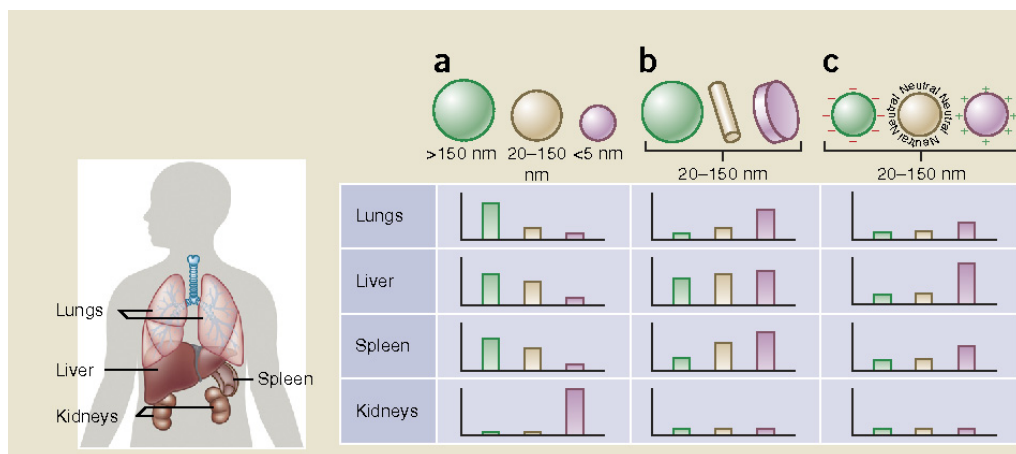


Figura 5a. Distribuzione delle particelle nei diversi organi in relazione a forma e dimensione<sup>176</sup>.

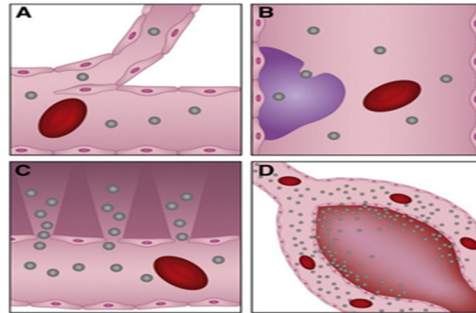


Figura 5b. Meccanismi di sequestro delle particelle dalla circolazione dopo iniezione endovenosa: A) intrappolamento in piccoli capillari (5-7  $\mu\text{m}$ ) B) inghiottimento da parte delle cellule fagocitiche (4-5  $\mu\text{m}$ ) C) stravasato attraverso endotelio fenestrato (max 500nm) D) escrezione attraverso i reni glomeruli e adesione alle pareti dei vasi sanguigni<sup>174</sup>.

## FORMA.

Per quanto riguarda la forma, le particelle di forma allungata hanno un tempo di circolazione circa dieci volte più lungo delle loro controparti sferiche. Tuttavia le particelle allungate con diametri superiori a 10 nm non possono essere eliminate facilmente dalla rete vascolare<sup>177</sup>.

Inoltre sembra che la forma allungata determini una fagocitosi trascurabile rispetto alle particelle di forma sferica, in quanto l'internalizzazione da parte dei macrofagi avviene soltanto alle estremità per la forma allungata, mentre per le sferiche può avvenire ovunque, quindi le prime riescono a rimanere più a lungo in circolo. Inoltre ruotano meno (maggiore inerzia rotazionale) sotto l'effetto del flusso ematico, permettendo un tempo più lungo di interazione con il recettore dell'endotelio; marginalizzano di più lateralmente verso la parete del vaso pertanto determinano una migliore interazione tra ligandi e recettori dell'endotelio per la maggiore superficie di contatto accessibile (superficie di adesione) rispetto alla forma sferica<sup>175</sup> (Fig 6).

Sebbene le prove attuali dimostrino che le microparticelle non sferiche mostrano una maggiore marginalizzazione e adesione alle pareti vascolari a parità di velocità di taglio, non si può concludere che queste particelle siano ottimali per il rilascio di farmaci nelle patologie cardiovascolari (CVD). Inoltre, anche se le particelle con diametro sulla scala del micrometro hanno dimostrato di aderire in modo più efficiente alla superficie delle cellule endoteliali, tuttavia sono

potenzialmente suscettibili di intrappolamento fisico nei capillari in vivo. D'altra parte le nanoparticelle sferiche hanno caratteristiche che le rendono interessanti per l'uso nella somministrazione di farmaci, compresa la loro facilità di sintesi e fabbricazione e la loro capacità di sottoporsi a endocitosi e transitosi al contatto con l'endotelio<sup>175</sup>.

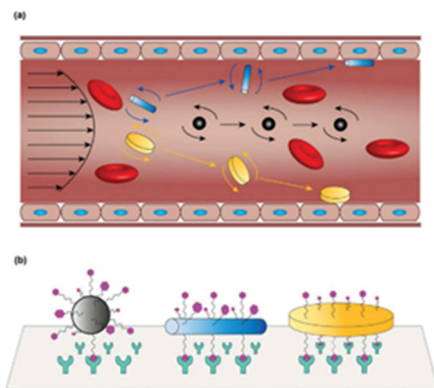


Figura 6. Effetti della morfologia delle particelle sulla loro marginalizzazione e interazione<sup>175</sup>.

**HYDRODENTICITY:** la presenza di una struttura polimerica di rivestimento, soprattutto se idrofilica, ha effetti positivi sulla rilassività del mdc, quindi sull'efficienza della sua azione, per un effetto definito Hydrodenticity. Le strutture scelte permettono il confinamento delle molecole di acqua all'interno della loro architettura consentendo un irrigidimento dei protoni con conseguente diminuzione dei tempi di rilassamento ed aumento della rilassività del segnale di risonanza. E' possibile traslare lo stesso principio da una molecola di Gd chelato a una molecola di Gd "chelata e confinata" all'interno di una nanostruttura idrofilica, con il vantaggio che a parità di concentrazione di Gadolinio si otterrà un aumento della rilassività. Pertanto le conoscenze acquisite sui sistemi mdc-polimerici sono state utilizzate per applicare il concetto di Hydrodenticity alla progettazione di NPs polimeriche a base di Gd con proprietà rilassometriche avanzate<sup>2</sup>.

## CARICA SUPERFICIALE

Infine, la chimica superficiale e la densità di carica giocano a ruolo cruciale per il trasporto vascolare delle nanoparticelle. Maggiore è la carica delle particelle (anionica o cationica), maggiore è la loro eliminazione dal sistema reticoloendoteliale<sup>177</sup>

Inoltre, le particelle cationiche inducono opsonizzazione, cioè il legame delle proteine plasmatiche alle loro superficie che segnala le cellule immunitarie. Quindi, sarebbe preferibile per la formulazione delle nanoparticelle per avere una carica quasi neutra/anionica.

## FUNZIONALIZZAZIONE DELLA SUPERFICIE CON POLIETILEN GLICOLE

Una pratica comune di funzionalizzazione superficiale è la passivazione della particella aggiungendo uno strato neutro di polietilen glicole (PEG) sulla sua superficie<sup>177</sup>. Essa impedisce l'opsonizzazione e la fagocitosi da parte delle cellule del sistema reticolo endoteliale (ad es. Cellule di Kupfer, fagociti, ecc.) creando nanoparticelle "invisibili", permettendo così un prolungamento della loro circolazione.

Il peso molecolare e la densità PEG del rivestimento sono fattori determinanti per l'efficienza della funzionalizzazione. PEG con peso molecolare compreso tra 2000 e 5000 g/mol determina la massima riduzione dell'adsorbimento quando è stato applicato a particelle polimeriche di grandi dimensioni con un intervallo di dimensioni di 160–270 nm<sup>178</sup>. La densità ideale di PEG è fortemente dipendente dal materiale di cui la nanoparticella è composta. Oltre al PEG, altri polimeri idrofili e neutri sono stati usati per prolungare i tempi di circolazione ematica, compresi i rivestimenti zwitterionici e di carboidrati<sup>177</sup>.

In conclusione, nanoparticelle funzionalizzate con PEG con un diametro idrodinamico superiore a 12 nm ma inferiore oltre 200 nm in generale possono garantire una circolazione sufficiente<sup>177,179</sup>.



## FUNZIONALIZZAZIONE SUPERFICIALE

La capacità di rendere funzionale la superficie dei nanovettori con ligandi mirati gioca un ruolo chiave nella diagnosi in tempo reale delle malattie vascolari. Una varietà di peptidi mirati per l'ateroma sono stati già testati preclinicamente, ma è necessaria la ricerca di nuovi e performanti biomarcatori per discriminare un paziente a rischio da un paziente che invece deve essere monitorato solo nel tempo. Per questo motivo, viene selezionato un ligando specifico per l'imaging MRI delle malattie cardiovascolari.

Dal punto di vista della bioingegneria, la prima fase del disegno sperimentale di nuova sonda consiste nella selezione di un ligando appropriato.

La seconda parte della strategia prevede che le NP HA caricate, sintetizzate come riportato, siano coniugate con il ligando identificato utilizzando la strategia di funzionalizzazione convenzionale (reazione di ammidazione). Dopo questa fase, ci sono caratterizzazioni chimico-fisiche, misure di rilassamento e valutazioni in vitro / in vivo eseguite al fine di stabilire non solo la sicurezza ma anche la potenziale efficacia diagnostica della nuova sonda.

Infine, la sonda viene testata per esperimenti ex-vivo utilizzando lo specimen carotideo dell'endarterectomia umana (CEA) al fine di valutare l'efficacia diagnostica e contemporaneamente l'immunoistochimica del campione biologico.

Il legame efficace tra tessuto e sonda viene anche valutato mediante analisi al microscopio elettronico. Particolare attenzione viene data alla morfologia ultrastrutturale di questi tessuti.

Il ligando scelto è l'anticorpo anti CD36.

## PIANIFICAZIONE SPERIMENTALE

### 1° STEP:

- Produzione di NPs con caratteristiche progettate ad hoc per l'imaging delle placche aterosclerotiche (AP) ossia biocompatibili, di dimensioni circa 200 nm, idrofile.
- Validazione e caratterizzazione delle loro proprietà (dimensione, forma, carica superficiale) e del loro effetto sulle proprietà rilassometriche del mezzo di contrasto.
- Sperimentazione ex-vivo mettendo a contatto nanoparticelle e placche e valutando gli effetti della veicolazione mirata e internalizzazione nella placca aterosclerotica, intesi come miglioramento delle prestazioni del MRI delle placche aterosclerotiche.

### 2° STEP

- Funzionalizzazione superficiale delle NP mediante bioconiugazione con l'anticorpo anti CD36.
- Caratterizzazione delle placche aterosclerotiche. La placca aterosclerotica asportata è stata incorporata nella formaldeide al 2% per indagini sperimentali successive o in fisiologica al 4% per essere studiata appena prelevata. Le placche fibrose e ateromatose sono state prelevate dalla carotide umana mediante endoarterectomia, procedura di trattamento standard per la malattia aterosclerotica dell'arteria carotide<sup>180</sup> utilizzata tutt'oggi per ridurre il rischio di ictus. Esistono studi che ricercano le caratteristiche della placca<sup>181</sup> e vari altri per la previsione di eventi cerebrovascolari<sup>182</sup> in base alla struttura della placca, attraverso l'utilizzo della risonanza magnetica. La struttura istopatologica delle placche ateromatose, comprese le placche carotidi, è stata ampiamente studiata. Esistono poche informazioni sulle proprietà ultrasotturali, sulla composizione chimica e sulla componente minerale di questi materiali<sup>183</sup>. Oltre

alla limitazione legata alla indisponibilità di dati di correlazione delle placche a pazienti sintomatici e asintomatici, la principale limitazione dello studio è il piccolo numero di campioni, tuttavia confrontando risultati simili ottenuti con diverse tecniche di microscopia ad alta tecnologia, è stato possibile raggiungere una conclusione sommaria relativa alla composizione ultrastrutturale delle placche carotidiche ateromatose. Sezioni di tessuto, ottenute sulla base dell'analisi morfologica al microscopio ottico e del diverso spessore, fissate secondo i protocolli riportati di seguito per la caratterizzazione al microscopio confocale ed elettronico.

-Studio ex-vivo. Sono stati utilizzati 12 prelievi di campioni provenienti da altrettanti pazienti sottoposti ad endoarterectomia carotidea. Tutti i soggetti indagati sono uomini (età media di 65 anni). Ciascuna placca aterosclerotica è stata poi classificata in base all'anatomia in I, II, III, IV, V, VI secondo la classificazione AHA, American Heart Association. Tutti i campioni (dopo l'intervento) sono immersi immediatamente in soluzione fisiologica (4 °C, 2 ore) e sono iniettati con soluzioni di particelle sia tal quali che coniugate, e successivamente sottoposti a studi di risonanza magnetica nucleare al fine di valutare l'interazione nanovettore-placca aterosclerotica.

### **Scelta dei materiali e dei metodi**

Anche se nella tecnologia farmaceutica sono utilizzati diversi polimeri sintetici, poli (ossido di etilene) (PEO), poli (glicole etilenico) (PEG), poli (alcool vinilico) (PVA) e poli (metilmetacrilato) (PMMA)<sup>184</sup> ed è molto più semplice usare i polimeri sintetici in campo biomedico, tuttavia negli ultimi anni la ricerca scientifica si è concentrata su biopolimeri, biomolecole prodotte da organismi viventi (piante verdi, animali, batteri e funghi)<sup>185</sup>. Caratteristiche come la biocompatibilità, la biodegradazione e la non citotossicità rendono questi materiali eccellenti candidati da utilizzare in applicazioni biomediche, in particolare per lo sviluppo di carrier terapeutici e diagnostici. I principali biopolimeri utilizzati in campo biomedico sono il collagene, la chitina, il chitosano (CS) e l'acido ialuronico (HA)<sup>184</sup>. L'acido ialuronico (Hyaluronic Acid, HA)<sup>186</sup> in particolare, è stato ampiamente studiato nelle applicazioni di somministrazione di farmaci, in particolare con lo scopo di curare il cancro<sup>187</sup>. Come è noto, questo

è un polisaccaride lineare biocompatibile, biodegradabile, non tossico e non infiammatorio ad alto peso molecolare prodotto di ripetute unità disaccaridiche di acido D-glucuronico e N-acetilglucosamina legate da legami glucosidici  $\beta$  (1,4) e  $\beta$  (1,3)<sup>188,189</sup>, è biocompatibile in quanto normalmente metabolizzato nel nostro organismo così come i relativi prodotti della sua degradazione, che risultano quindi atossici. Inoltre l'HA è altamente idrofilico introduce pertanto l'effetto peculiare di Hydrodenticity della conformazione del polimero, ossia della formazione di compartimenti idrofilici stabili responsabili del potenziamento del segnale RM<sup>2</sup>, cioè di come il confinamento delle molecole di acqua all'interno dell'architettura delle particelle influenza l'irrigidimento dei protoni diminuendo così i tempi di rilassamento e aumentando di conseguenza la rilassività del segnale di risonanza del mdc. In condizioni fisiologiche, è ampiamente distribuito nella matrice extracellulare sotto forma di sodio ialuronato e mostra una carica negativa. Inoltre, grazie alla sua elevata capacità di trattenere l'acqua, gli idrogel a base di HA sono materiali promettenti non solo per l'ingegneria dei tessuti, ma anche per la nanomedicina<sup>190</sup>. La sua breve emivita, tuttavia, richiede modifiche chimiche e trattamenti fisici per migliorare la sua stabilità e mantenere le funzioni biologiche native<sup>191</sup>.

Gli idrogel reticolati fisicamente hanno i vantaggi di formare idrogel senza l'aggiunta di agenti reticolanti, ma hanno anche limitazioni in termini di dimensioni dei pori, funzionalizzazione chimica e tempo di degradazione. La reticolazione chimica, invece, consente di realizzare una rete 3D con auspicabile proprietà meccaniche basate sulla natura dei reagenti chimici e tempo di degradazione controllabile<sup>192</sup>. Un esempio di agente di reticolazione chimica è rappresentato da divinilsolfone (DVS), che reagisce con il gruppo idrossile sulla spina dorsale di HA per creare una rete intramolecolare e intermolecolare<sup>186,193</sup>. Pertanto, le strutture reticolate chimicamente hanno giunzioni permanenti e queste modifiche possono essere introdotte per fornire un biomateriale con le proprietà funzionali desiderate<sup>189</sup>. Inoltre, l'uso di questi biopolimeri su dimensioni nanometriche consente di ottimizzare ulteriormente le loro proprietà a seconda dell'applicazione specifica.

Al fine della produzione di nanoparticelle è stata scelta un'emulsione acqua in olio (water in oil, W/O), la cui fase dispersa funge da "template" per controllare la formazione di strutture specifiche e per ottenere particelle del diametro

desiderato. Adoperando un agente reticolante, il cui grado di reticolazione nei confronti della matrice polimerica può essere opportunamente modulato in base alle esigenze, in modo da variare il livello di idratazione della matrice polimerica e confinare all'interno della struttura polimerica la molecola attiva (nel caso in oggetto un agente di contrasto) ed ottenere conseguentemente una variazione delle proprietà rilassometriche dell'hydrogel.

Alla fine, al fine di ottenere le proprietà di interesse, la modalità di preparazione gioca un ruolo essenziale. Al momento sono disponibili diverse tecniche per la produzione di micro e nanoparticelle a base di HA. Tra questi, il processo di emulsificazione<sup>194</sup>. Il metodo di emulsificazione adoperato prevede un'elevata energia meccanica. Molti prodotti a base di emulsioni sono ampiamente utilizzati in campo farmaceutico come precursori per preparare vettori per applicazioni diagnostiche e di somministrazione di farmaci. Diversi lavori scientifici riportano particelle a base di HA, preparate mediante processo di emulsione acqua-in-olio (W / O), in cui la reazione avviene all'interno delle goccioline acquose (contenenti HA) che vengono disperse in una fase organica continua con l'aiuto di tensioattivi liposolubili<sup>195</sup>.

E' noto che le proprietà funzionali e il comportamento di rigonfiamento degli idrogel sono influenzati dal grado di idratazione, che può essere modulato probabilmente modificando la composizione chimica del sistema<sup>196-201</sup> e conseguentemente il suo grado di reticolazione.

In questo contesto, l'HA<sup>188</sup> viene scelto e utilizzato come polimero modello grazie alla sua biocompatibilità e alta idrofilia al fine di ottenere NP polimeriche che incapsulano Gd con proprietà rilassometriche migliorate. Qui, viene riportato un metodo basato su un singolo sistema di emulsione (w / o) che è stato sviluppato per preparare NP-HA con una struttura ben definita per applicazioni di risonanza magnetica. Le catene polimeriche sono confinate nelle goccioline acquose, che agendo da nanoreattori di una nanoemulsione acqua-in-olio, rendono possibile la reazione di reticolazione da parte di reagenti chimici (DVS). Il controllo della distribuzione e della stabilità delle dimensioni dell'emulsione viene ottenuto mediante un'attenta scelta della composizione dell'emulsione e del processo di emulsificazione. Le condizioni della reazione di reticolazione vengono modulate modificando la concentrazione, il tempo di reazione e la

modalità di aggiunta del DVS. Le proprietà delle NP risultanti vengono analizzate utilizzando una combinazione di tecniche chimico-fisiche. Volendo realizzare un hydrogel, si è utilizzato un agente reticolante che conferisse stabilità, quale il divinil solfone per la reticolazione del polimero (crosslinking), perchè anche se di per se tossico, studi di tossicità in vitro hanno dimostrato la sicurezza dei suoi prodotti di reazione.

Mentre come agente di contrasto è stato utilizzato Magnevist (Gd-DTPA dietilenetriamina pentacetico acido), uno dei mezzi di contrasto a base di gadolinio maggiormente utilizzato nella pratica clinica.

## Capitolo 3: PARTE SPERIMENTALE

### PARAGRAFO 3.1: PRODUZIONE DELLE GD-HA-NPS E LORO CARATTERIZZAZIONE

#### MATERIALI E METODI

##### MATERIALI

Tutte le sostanze chimiche utilizzate presentano un grado di purezza elevata e vengono utilizzate senza ulteriori trattamenti. Sorbitan monooleato (Span<sup>®</sup> 80) (S80), poliossietilenesorbitan trioleato (Tween<sup>®</sup> 85) (T85), olio minerale (olio leggero, 0,8 gr/cm a 25°C), divinil sulfone (DVS, 118,15 Da), acido dietilentriamminopentaacetico gadolinio (III) diidrogeno sale idrato (Gd-DTPA, 547,57 Da), granuli di idrossido di sodio (NaOH), acetone ed etanolo sono acquistati da Sigma Aldrich Chemical (Italia). Il sodio ialuronato, con un peso molecolare medio di 850 kDa (purezza del 99%, Hyasis<sup>®</sup> 850P) e 42 kDa, è rispettivamente fornito da Novozymes Biopharma e Bohus Biotech (Svezia) come polvere disidratata e utilizzato senza purificazione. Magnevist<sup>®</sup> (Bracco Imaging, Italia), un mezzo di contrasto disponibile in commercio, viene utilizzato in questo studio come controllo. L'acqua viene purificata per distillazione, deionizzazione e osmosi di riserva (Milli-Q Plus) e utilizzata sistematicamente per la preparazione, la purificazione e l'analisi dei campioni.

##### PREPARAZIONE DELL'EMULSIONE

Le emulsioni acqua-in-olio (water-in-oil, W/O) sono preparate con due diversi rapporti acqua/olio (10/90 e 20/80 v/v). L'olio minerale viene utilizzato come fase oleosa (o fase continua, FC) e le emulsioni W/O vengono prodotte variando la concentrazione di tensioattivi per FC e fase acquosa (o Fase Dispersa, FD). In particolare, due tensioattivi non ionici, Span-80 (S80) e Tween-85 (T85), vengono utilizzati per preparare miscele con un intervallo da 4,3 a 7,65 di valori di Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB). A seconda dell'HLB iniziale da utilizzare, le miscele di S80 e T85 sono pre-diolte nei rapporti di massa S80/T85 appropriati (da 50/50 a 75/25) rispettivamente in FC e FD. Dovendo avviare la reazione di reticolazione in condizioni basiche, viene fatta variare anche la concentrazione di

NaOH (da 0 a 0.2 M) nella fase dispersa al fine di valutare l'effetto del sale sulla stabilità dell'emulsione. La FD contenente T85 e NaOH, viene aggiunta goccia a goccia alla FC e le emulsioni W/O vengono preparate utilizzando un omogeneizzatore a elevata azione di taglio (Silverson L5M-A, Silverson Machines Ltd, Waterside, UK). L'omogeneizzazione dell'emulsione viene eseguita ad una velocità compresa tra 5000 a 7000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente (25°C).

#### DETERMINAZIONE DELLA STABILITÀ TEMPORALE DELL'EMULSIONE

La stabilità delle emulsioni viene valutata, a intervalli di tempo regolari, mediante osservazione visiva, misurando la separazione delle fasi in funzione del tempo (Fig.7). Inoltre, una caratterizzazione ottica della stabilità dell'emulsione, preparata utilizzando un turboemulsore, viene eseguita attraverso l'utilizzo del Turbiscan (Turbiscan LabThermo), mediante *scattering* multiplo statico (Multiple Light Scattering, MLS), che invia un raggio di luce da un diodo elettroluminescente ( $\lambda = 880 \text{ nm}$ ) attraverso una cella cilindrica di vetro contenente il campione. Due sensori ottici sincroni ricevono la luce trasmessa attraverso il campione (180 ° dalla luce incidente) e/o la luce retrodiffusa dalle goccioline nel campione (45 ° dalla luce incidente). La testina di lettura ottica analizza l'altezza del campione nella cella (circa 40 mm), acquisendo dati di trasmissione e retrodiffusione ogni 40  $\mu\text{m}$ . Le luci trasmesse e retrodiffuse sono monitorate ad una T costante di 25°C in funzione del tempo e dell'altezza della cella per un periodo di 24 ore ad intervallo di 30 minuti (Figura 8).



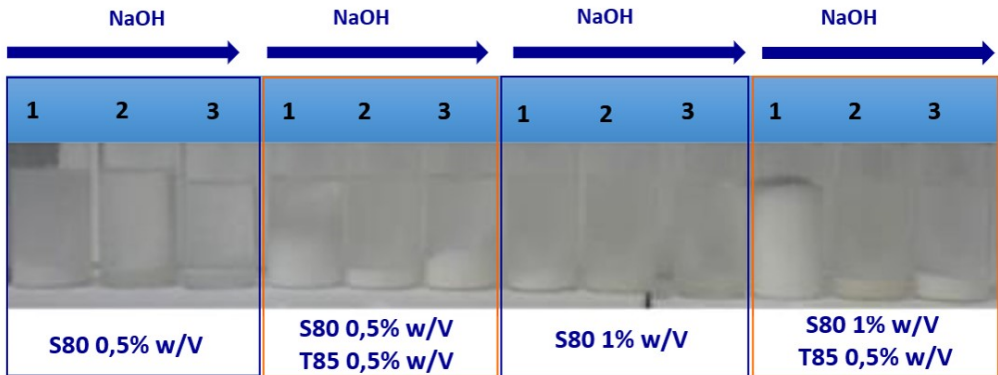


Figura 7. Osservazione fotografica dell'aspetto delle emulsioni W/O (10/90) e (20/80) a 25 °C dopo 12 ore. L'immagine mostra la stabilità della emulsione al variare della della concentrazione crescente di tensioattivi e NaOH, rispettivamente: TW85 (0- 0,5v/v), S80 (0,5- 1 v/v) e NaOH: [(a) 0 M; (b) 0,1 M; (c) 0,2 M] sulla stabilità dell'emulsione)

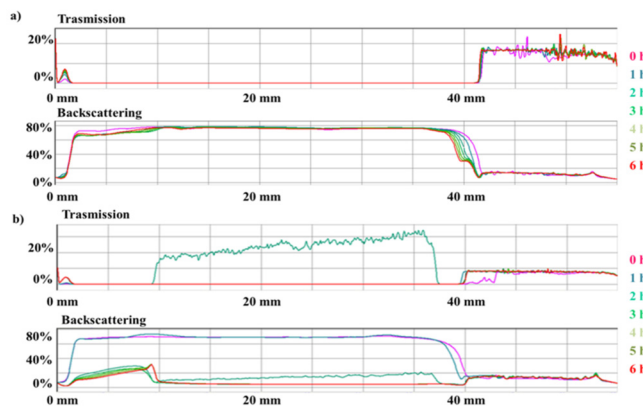


Fig.8. Spettri di trasmissione e retrodiffusione di emulsione W / O (10/90) (volume totale, 20 ml, 5000 rpm, 10 min) con 1% v/v di S80 senza (a) e con (b) 0,2 M NaOH

### PREPARAZIONE DI NANOPARTICELLE RETICOLATE CON DVS

Sulla base di questi risultati preliminari, il rapporto FD/FC in tutti i campioni è impostato a 10/90 v/v. In particolare, per la preparazione di NP reticolate, la polvere di HA (Mw = 850 kDa) viene disciolta a diverse concentrazioni (da 0,1 a 0,5% p/v) in condizioni alcaline (NaOH compreso tra 0 e 0,2M – pH 12-14) mediante vigorosa agitazione a Tamb per 4 ore fino ad ottenere una soluzione

omogenea. Olio minerale e S80 (dallo 0,5 al 2% p/v) vengono mescolati separatamente per agitazione. La FD viene aggiunta goccia a goccia alla PC senza agitazione e tutti i componenti sono completamente miscelati per omogeneizzazione in vari momenti (5-15 minuti) e velocità (5000-7000 rpm). Quindi, l'agente reticolante (DVS) viene aggiunto all'emulsione finale (40 ml), che viene tenuta in agitazione su ruota di laboratorio per 24 ore al fine di ottenere una distribuzione DVS omogenea nel PD. Per testare l'effetto del DVS, vengono esplorate varie condizioni di reazione di reticolazione: (1) a diverse concentrazioni di DVS (da 0,01 a 0,5% v/v); (2) a tre tempi dall' inizio della reazione (inizio, durante e post omogeneizzazione) e (3) a temperature diverse (4 e 25°C). Le migliori condizioni sperimentali per la produzione di HA-NPs reticolate sono riportate nella Tabella 1

FD / FC <sup>a)</sup>	HA [% w/v]	NaOH [M]	DVS [% v/v]	S80 [% w/v]
		0		
	0.1	0.1		
		0.2		
		0		
10 / 90	0.25	0.1	0.045	1
		0.2		
		0		
	0.5	0.1		
		0.2		

Tab.1 Condizioni sperimentali per la produzione di HA-NP.

## CARICAMENTO DI NPs HA CON MEZZI DI CONTRASTO

Dopo aver identificato il protocollo per ottenere NPs, Gd-DTPA viene scelto come mdc e miscelato nel FD prima dell'omogeneizzazione. Le NP HA caricate con Gd (NP HA-Gd) vengono preparate utilizzando diversi rapporti di massa HA/mdc (1:1, 1:2 e 1:5). Il DVS viene aggiunto a temperatura ambiente dopo la omogeneizzazione utilizzando la stessa procedura riportata nel paragrafo precedente.

## RACCOLTA E PURIFICAZIONE DELLE NANOPARTICELLE

Il recupero delle NP e la loro separazione dal sistema di emulsione W/O viene effettuato mediante dialisi e/o ultracentrifugazione. Nella procedura di dialisi, l'emulsione ottenuta viene posta in una di membrana in cellulosa prelavata (Spectra / Por<sup>®</sup>, cut-off di 25 kDa). Le impurità organiche (olio minerale e S80) vengono rimosse prima per dialisi con solventi organici, come acetone e/o etanolo, ai quali, in seguito, viene sostituita gradualmente acqua milliQ. Le soluzioni di dialisi sono cambiate a intervalli di tempo di 3 h. In caso di ultracentrifugazione, 1 ml dell'emulsione viene aggiunto a 5 ml di etanolo e miscelato per 2 ore. Quindi, questa miscela viene ultracentrifugata (Beckman-Coulter OPTIMA MAX-XP) a 55000 rpm per 20 minuti a 15 ° C. La procedura viene ripetuta 2 volte, a seguito della formazione del pellet. Il pellet risultante, infine, risospeso in acqua MilliQ. La sospensione ottenuta viene sottoposta ad una seconda fase di ultracentrifugazione (70000 rpm, 10 min, 15 ° C) al fine di ottenere NP purificate e concentrate.

## CARATTERIZZAZIONE DELLE NANOPARTICELLE

Le reticolazioni chimiche del polimero ottenute mediante DVS sono identificate attraverso l'uso della spettroscopia a infrarossi (Thermo). I picchi caratteristici per DVS sono: 1310 cm<sup>-1</sup> (S = O vibrazioni di stretching asimmetriche), 1130 cm<sup>-1</sup> (S = O vibrazioni simmetriche di stretching) e 794 cm<sup>-1</sup> (S-C stretching vibrazioni) e attraverso il legame etereo a 1255 cm<sup>-1</sup> (vibrazioni di allungamento C-O-C). Per determinare la distribuzione delle dimensioni delle NP viene eseguita la misura della diffusione dinamica della luce (DLS) a 25°C, utilizzando uno Zetasizer S-90 1000 HS (Malvern Instruments, Regno Unito). L'operazione

consiste nel prelevare 100 uL di campione e diluirli (1:10) con acqua deionizzata per prevenire gli effetti della dispersione multipla. La morfologia e la dimensione delle NP vengono studiate utilizzando un microscopio a scansione elettronica ULTRA PLUS a emissione di campo (Field Emission- SEM, FE-SEM Carl Zeiss, Oberkochen, Germania) e microscopio a trasmissione di elettroni (Transmission Electron Microscope, TEM, TECNAI). Nel primo caso, i campioni sono ricoperti di uno strato di nanoparticelle di oro spesso circa 7 nm..

#### ANALISI DEL CARICO DI GADOLINIO ATTRAVERSO ICP-MS

La determinazione quantitativa del Gd-DTPA caricato in NP HA viene valutata mediante Spettroscopia di Massa Induttivamente Accoppiata (Induced Coupled Plasma- MS (ICP-MS, NexION 350, Perkin Elmer). Il campione viene analizzato senza ulteriori trattamenti di digestione per separare il polimero dal mdc. Per tutti gli esami vengono utilizzate sospensioni NP purificate.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### Studio della stabilità dell'emulsione

Confrontando le emulsioni ottenute ad un diverso rapporto W/O, 10:90 e 20:80, ma con la stessa concentrazione di tensioattivo, la stabilità è maggiore per le emulsioni con contenuto di acqua inferiore. In particolare, la formulazione ottenuta con un rapporto di volume 10/90 W/O e contenente S80 (1% p/v) e T85 (0,5% p/v) risulta più stabile. Tuttavia, anche se la stabilità dell'emulsione è fondamentale per ridurre la polidispersione, è necessario un ambiente alcalino (aggiunta di NaOH) perché si verifichi la reazione di reticolazione. Infatti, Balazs e Leshchiner<sup>193</sup> hanno dimostrato che la reazione di reticolazione inizia poco dopo l'aggiunta di DVS (5-10 minuti) e che 1 ora è sufficiente per il completamento della reazione<sup>202,203</sup>. Sulla base di questi requisiti è stata scelta la formulazione con S80 (1% p/v) e NaOH (0,2 M) come il compromesso ottimale per ottenere un'emulsione stabile per almeno 3 ore (Figura 7 e 8), sufficiente per far avvenire la reazione del DVS.

### Preparazione di nanoparticelle reticolate con DVS con e senza CA.

Sono state individuate le migliori condizioni di processo per progettare nanostrutture biocompatibili basate su Hydrodenticity e controllare i loro

parametri di rilassamento per l'applicazione nella risonanza magnetica. In particolare, viene valutato l'effetto dell'omogeneizzazione, del ruolo della reazione di reticolazione e della concentrazione di HA, testando diversi parametri e condizioni sperimentali.

OMOGENIZZAZIONE. La miscelazione preliminare viene eseguita a due diverse velocità, a 5000 e 7000 giri/min per 10 minuti, mantenendo costante la temperatura a 25°C. Si preferisce una velocità di 5000 giri/min per ottenere un controllo più efficace della temperatura.

REAZIONE DI RETICOLAZIONE. Dopo l'omogeneizzazione, viene eseguita la reazione di reticolazione a valori di pH elevati (12-14) con formazione di legami solfonil bis-etilici tra i gruppi ossidrilici di HA <sup>204</sup>. Questo metodo di reticolazione ha il vantaggio di verificarsi a temperatura ambiente, il che limita la degradazione di HA in soluzioni alcaline. Inoltre, anche se il reagente di partenza DVS è altamente reattivo e tossico, la biocompatibilità degli idrogel HA-DVS è confermata dall'analisi istologica <sup>205</sup>.

Nel nostro protocollo, uno studio delle modalità di iniezione dell'agente di reticolazione in diverse fasi del processo di omogeneizzazione ha dimostrato che solo quando viene aggiunto DVS dopo la fase di omogeneizzazione si ottengono NP sferiche. Al contrario, quando l'aggiunta del reticolante viene eseguita in qualsiasi altro momento della fase di omogeneizzazione, si osserva che la sollecitazione di taglio della fase polimerica interferisce con la formazione di tali particelle. Per quanto riguarda la concentrazione di agente reticolante da aggiungere, la migliore condizione sperimentale per la produzione di NP reticolante viene raggiunta aggiungendo 0,045% v/v di DVS.

CONCENTRAZIONE HA. E' stato studiato l'effetto sulla produzione delle NPs di tre diverse concentrazioni di polimero HA, (a) 0,5% w/v; (b) 0,25% w/v and (c) 0,1% w/v (Figura 9).

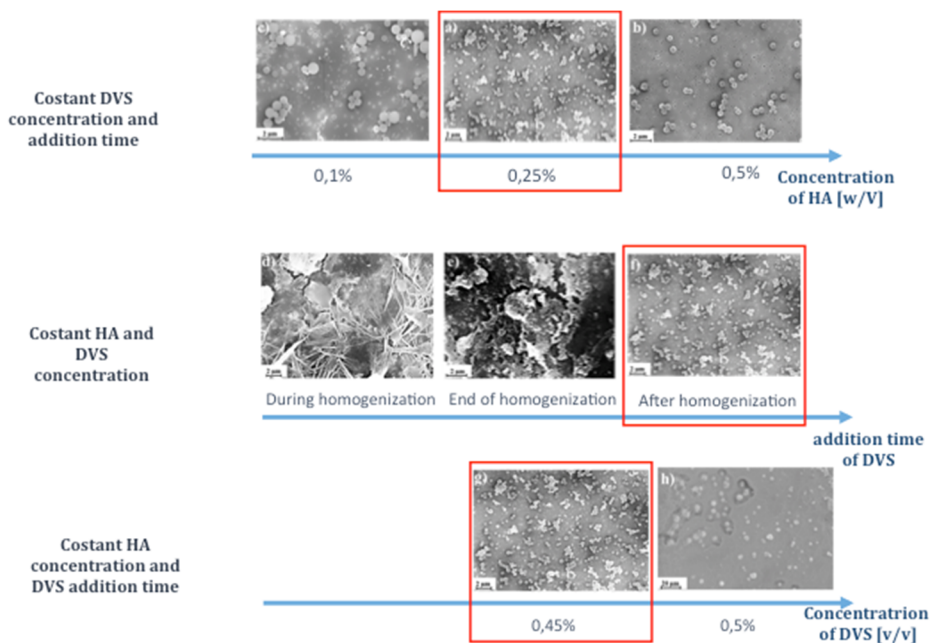


Figura 9. Ottimizzazione della sintesi di HA NP. Immagini SEM di nanoparticelle reticolate (0,5% p / v HA; 18  $\mu$ L (0,045% v/v) di DVS; 40 mL di emulsione W/O (10/90); 5000 rpm, 10 min, RT, usando omogeneizzatore ad alta forza di taglio) in varie condizioni: Concentrazione di HA, (a) 0,5% p/v; (b) 0,25% p/v e (c) 0,1% p/v. Tempi di aggiunta dell'agente reticolante (DVS), inizio (d), durante (e), a fine (f) omogeneizzazione. Concentrazione di DVS: (g) 18  $\mu$ L e (h) 200  $\mu$ L (0,5% v/v).

Sulla base di questi risultati (Tabella 1) e utilizzando le stesse condizioni di processo, le NP caricate si ottengono aggiungendo l'mdc nella fase acquosa dell'emulsione., scegliendo di incapsulare un Gd chelato, Gd-DTPA (9.13 mM), approvato dalla FDA.

### Purificazione e caratterizzazione di HA-NPs

Per purificare le NP HA si utilizza il metodo dell'ultracentrifugazione (UC) e dialisi. Per valutare le dimensioni delle NPs , le sospensioni acquose diluite (1:10) vengono analizzate mediante misurazioni Dynamic Light Scattering (DLS). Risulta che allo 0,25% p/v della soluzione di HA si ottengono NP senza CA con dimensioni più piccole ( $217,57 \pm 34,65$  nm). Aumentando la concentrazione di polimero (0,5% p/v) la dimensione delle particelle aumenta ( $401,67 \pm 77,65$  nm), tuttavia

la formulazione con lo 0,1% p/v HA mostra un fenomeno inverso con particelle più grandi ( $760,15 \pm 86$  nm), effetto probabilmente dovuto ad una minore stabilità dei nuclei delle NP ad una concentrazione di polimero troppo bassa, che pertanto tendono a coalizzarsi. Quando Gd-DTPA viene aggiunto al processo, la dimensione delle particelle in HA 0,25% p/v è leggermente aumentata ( $258,77 \pm 15,65$  nm) alle stesse condizioni di processo. Dopo la purificazione, le NP vengono studiate mediante tecniche di microscopia elettronica (SEM e TEM). La morfologia delle NP osservate ha rivelato che le particelle sono di forma sferica e monodisperse (Figura 9). Inoltre, per confermare che la reazione di reticolazione è stata completata con successo, vengono eseguite analisi IR. Le modificazioni chimiche di HA sono identificate negli spettri IR delle NP HA per la presenza di picchi caratteristici per DVS che appaiono tra  $1384$  e  $1280$   $\text{cm}^{-1}$ , che sono attribuiti al gruppo solfone ( $\nu\text{SO}_2 = 1350, 1310$   $\text{cm}^{-1}$ ). Capacità di carico (LC) ed efficienza di incapsulamento (EE) sono ottenute tramite ICP-MS confrontando la quantità teorica inizialmente utilizzata per preparare le particelle e il Gd incapsulato nel sistema dopo l'ultracentrifugazione. I risultati di incapsulamento più elevati corrispondono allo 0,25% p/v di HA (rapporto 1:2 in w/w HA/Gd-DTPA). I risultati mostrano che probabilmente la natura ionica di Gd-DTPA influisce sul suo incapsulamento. Il valore potenziale corrispondente, con e senza CA, indica una superficie carica negativamente ( $-37,4 \pm 1,34$  mV e  $-31,8 \pm 0,88$  mV, rispettivamente), a causa del gruppo carbossilico di HA.

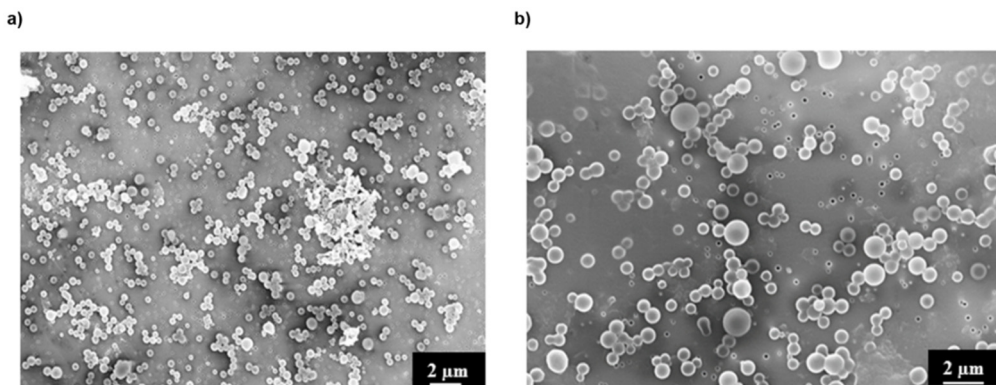


Figura 10. Immagini SEM di nanoparticelle di HA reticolato (0,5% p/v di HA, 1% p/v di S80, 0,045% v/v di DVS) senza (a) e con (b) agente di contrasto

## CONCLUSIONI

Sono state ottimizzate le condizioni per combinare un MdC con un biopolimero idrofilo, identificate e applicate alla nanoscala, per produrre nanostrutture di interesse biomedico con alta relassività. In particolare, sono state ottenute NP HA reticolate stabili che incapsulano Gd-DTPA utilizzando un metodo che sfrutta l'uso delle nanoemulsioni W/O come modelli. Le gocce di emulsione acquosa rappresentano un buon ambiente per la formazione delle NP e sembrano limitare in modo efficiente le loro dimensioni. Le NP ottenute dalle goccioline di emulsione mediante di purificazione hanno mostrato una dimensione di circa 200 nm e una forma sferica. Le condizioni del protocollo utilizzato per produrre queste NP biocompatibili offrono vantaggi per l'incapsulamento di un ampio spettro di biomolecole e forniscono una potenziale via sintetica per progettare una vasta gamma di MdC a sistemi nanostrutturati altamente efficienti, lasciando disponibile la superficie per una possibile funzionalizzazione. In conclusione, questo lavoro dimostra che è possibile sviluppare una nuova generazione di mdc più efficienti. Può essere fatto usando MdC biocompatibili e già approvati nella pratica clinica. Inoltre, le dimensioni delle NP risultanti sono in un intervallo che le rende idonee per la diffusione nelle cellule e la distribuzione in determinati tessuti e a livello vascolare. Inoltre, si può ottenere un ulteriore aumento della relassività può essere potenzialmente raggiunto scegliendo la combinazione biopolimero-MdC ottimizzando la concentrazione e il grado di reticolazione della struttura. Da un punto di vista biomedico, la possibilità di migliorare le proprietà rilassometriche dell'MDC controllando i parametri strutturali dell'idrogel, può aprire la strada a nuovi progressi nella progettazione di nanovettori per la diagnosi e la terapia. Inoltre, studi preliminari sull'acquisizione MRI, evidenziano il potente effetto delle nanostrutture prodotte per l'applicazione nell'imaging clinico. Nonostante i risultati promettenti, sono necessari ulteriori studi per condurre un'indagine più approfondita e una piena convalida della nostra promettente ipotesi.



## PARAGRAFO 3.2: FUNZIONALIZZAZIONE

### INTRODUZIONE

La nanomedicina governa il modo in cui i nanomateriali ingegnerizzati interagiscono con l'ambiente umano. In particolare, la modificazione superficiale delle NP gioca un ruolo chiave nelle scienze biomediche. Diversi risultati clinici hanno suggerito che la presenza di specifiche funzioni chimiche di riconoscimento, garantisce l'accumulo della sonda nel sito di interesse, nel caso specifico la placca aterosclerotica. Questo riduce l'effetto collaterale di tossicità sistemica legato da un lato ad una biodistribuzione aspecifica dell'ndc, e dall'altro alla necessità di elevate dosi di somministrazione di ndc, che in questo modo possono essere ridotte. Per questo motivo, qui, viene riportato un esempio di funzionalizzazione di NP di HA funzionalizzate con un biomarker specifico, l'anticorpo anti CD36 (AbCD36) per il target della placca aterosclerotica.

L'imaging mirato dei macrofagi come possibile mezzo per rilevare e caratterizzare l'aterosclerosi è stato studiato utilizzando più modalità di imaging<sup>206,207</sup>. L'uso di particelle marcate con CD36 che colpiscono specificamente il recettore scavenger dei macrofagi per rilevare l'aterosclerosi mediante risonanza magnetica è stato precedentemente studiato in un modello murino di aterosclerosi<sup>165,208</sup>. Uno studio di Lipinski et al<sup>207</sup> ha dimostrato che nanoparticelle a base lipidica caricate con Gd destinate a CD36, un recettore scavenger di classe B, hanno avuto un assorbimento significativo da parte dei macrofagi umani in vitro, hanno migliorato l'intensità del segnale della placca aterosclerotica aortica ex vivo e hanno dimostrato di legarsi ai macrofagi residenti nella placca aterosclerotica su confocale microscopia.

Il CD36 ha dimostrato di avere un ruolo nello sviluppo dell'aterosclerosi e ed è coinvolto nel legame e nell'assorbimento del 75 - 90% di lipoproteine a bassa densità mediato dai macrofagi<sup>209</sup>. Numerosi studi hanno messo in luce l'importanza del CD36 per lo sviluppo della placca dimostrando una significativa riduzione dello sviluppo a breve e lungo termine dell'aterosclerosi nei topi con knockout Apo-E e knockout CD36 rispetto ai topi knockout Apo-E<sup>210,211</sup>. Inoltre, il trapianto di cellule staminali con CD36 nei topi knockout doppi (CD36 - / -, Apo-E - / -) ha determinato un aumento dello sviluppo dell'aterosclerosi. Tuttavia,

Moore e colleghi<sup>212</sup> hanno scoperto che i topi knockout Apo-E privi di CD36 avevano uno sviluppo maggiore dell'aterosclerosi del seno aortico rispetto ai topi knockout Apo-E. Questo studio dimostra il potenziale utilizzo della RM molecolare con NP rivolte a CD36 per migliorare il rilevamento e la caratterizzazione della placca aterosclerotica e può servire come modo per studiare il ruolo del CD36 nella progressione o nella regressione dell'aterosclerosi.

Le particelle utilizzate in questo studio sono le nanoparticelle di acido ialuronico reticolate realizzate in microfluidica<sup>45,213</sup>. Questa tecnica di produzione ha permesso di modulare finemente la struttura del nanovettore, garantendo un controllo preciso sulla reticolazione dell'hydrogel. In particolare, il controllo sulla reazione tra acido ialuronico e divinil sulfone permette di raggiungere un grado di reticolazione ottimale, che, creando "maglie" di hydrogel attorno al Gd-DTPA, permette di migliorarne il grado di idratazione concentrando le molecole d'acqua nel suo intorno<sup>2,213</sup>. Ne consegue un miglioramento dell'efficacia dell'agente di contrasto per effetto dell'hydrodenticity.

LIMITI: Una limitazione nell'uso di particelle che colpiscono CD36 è che la somministrazione endovenosa di questo agente di imaging subirà l'effetto di primo passaggio nel fegato legandosi parzialmente ai recettori scavenger espressi sulla superficie delle cellule di Kupffer <sup>206</sup>. Mancano anche dati sulla tossicità per la piattaforma particellare a base lipidica, tuttavia gli studi indicano che l'assorbimento epatico delle particelle marcate con gadolinio può limitare la traduzione clinica <sup>214</sup>. Allo stesso modo, questo studio ha valutato solo la colocalizzazione con i macrofagi e non ha valutato il legame delle particelle targetd anti-CD36 con altre cellule che esprimono CD36 come cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, adipociti e piastrine. Un'ulteriore limitazione di questo agente nella sua forma attuale è l'uso di anticorpi di coniglio destinati al CD36 umano. Questi anticorpi probabilmente comporteranno una risposta immunitaria contro la porzione di anticorpo dell'agente di imaging e quindi limiterebbero l'uso di questo agente nel tracciare la progressione / regressione della placca aterosclerotica. Gli studi futuri dovrebbero includere anticorpi abbinati agli isotipi per testare ulteriormente la specificità del targeting degli anticorpi. Infine, il ruolo dell'imaging con nanoparticelle destinate al CD36 rimane da validare per il rilevamento della placca aterosclerotica in vivo.

## MATERIALI E METODI

### Materiali

(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride EDC ( $C_8H_{17}N_3 \cdot HCl$ ;  $M_w=191,70 \text{ g/mol}$ ), N-Hydroxysuccinimide NHS (formula  $C_4H_5NO_3$ ;  $M_w=115,09 \text{ g/mol}$ ), Streptavidina-atto633 (1 mg/ml), il kit di analisi QuantiPro™ BCA, l'anticorpo anti CD36 sono stati acquistati da Merck KGaA (Germany).

### PRODUZIONE E CARATTERIZZAZIONE

Coniugazione diretta e indiretta, determinazione del numero di gruppi carbossilici

Caratterizzazione morfologica: TEM, BCA, confocale, Minispec, ICP

### FUNZIONALIZZAZIONE DELLE NP HA

La strategia di funzionalizzazione delle NP prevede le seguenti fasi: 1) modifica chimica delle NP HA; 2) legame covalente dell'anticorpo Ab-CD36 per coniugazione indiretta o coniugazione diretta; 3) formazione di coniugati "HA NPs-biotina-AbCD36" o "HA NPs-AbCD36"; 4) caratterizzazione dei prodotti e analisi dei punti critici di controllo.

### QUANTIFICAZIONE DEI GRUPPI CARBOSSILICI SULLA SUPERFICIE DELLE NP-HA

Per quantificare in maniera diretta i gruppi carbossilici presenti sulla superficie delle NP è stato utilizzato il metodo della titolazione. 0,1 mg / ml di NP vengono dispersi in soluzione di NaOH (20 ml di 0,01 M) e HCl (0,01 M) viene usato come agente titolante. La concentrazione molare dei siti carbossilici è ottenuta dalla differenza di concentrazione al punto di equivalenza tra HCl e NaOH<sup>45</sup>.

### CONIUGAZIONE DIRETTA DI NP HA

Le NPs cariche di Gd vengono raccolte e caratterizzate morfologicamente mediante analisi SEM. La superficie delle NPs è stata attivata utilizzando una reazione di amidazione con EDC (0,02 M) e NHS (0,01 M) in soluzione acquosa sull'agitatore rotante<sup>189</sup>. Dopo 10 minuti 5  $\mu\text{L}$  di anticorpo AbCD36 (0,0025  $\mu\text{g/mL}$ ) vengono aggiunti direttamente al campione lasciato in agitazione per ulteriori 4 ore. Successivamente si procede alla rimozione dei reagenti in eccesso

mediante centrifugazione mediante l'uso di tubi da centrifuga tipo corning da 50 KDa alle seguenti condizioni: 3000 RPM 4°C 20 minuti.

#### CONIUGAZIONE INDIRECTA STREPTAVIDINA-BIOTINA-ANTICORPO

La superficie delle NP è stata attivata utilizzando una reazione di ammidazione con EDC (0,02 M) e NHS (0,01 M) per 10 minuti in soluzione acquosa sull'agitatore rotante<sup>189</sup>. Successivamente, 25 µg di Streptavidina (25 µg/mL) sono aggiunti e lasciati reagire per un'ora sull'agitatore rotante. Dopo aver rimosso i reagenti in eccesso con il metodo della centrifugazione utilizzando tubi da centrifuga tipo corning (Corning® Spin-X® UF Concentrators) da 50 KDa a 2000 RPM 4°C per 10', 10 µL di anticorpo (0,005 µg/mL) da coniugare sono aggiunti alla soluzione risultante. La reazione viene condotta per 4 ore su agitatore rotante e infine un'ulteriore purificazione viene effettuata per rimuovere l'eccesso di anticorpo (tipo corning da 50 KDa alle seguenti condizioni: 3000 RPM 4°C 20 minuti).

#### DOSAGGIO ACIDO BICINCONINICO

Il dosaggio dell'acido bicinconinico (saggio BCA, sensibilità: 0,5 µg/ml), noto anche come saggio Smith, viene utilizzato per la quantificazione della proteina totale in un campione, in questo caso consente di misurare la concentrazione dell'anticorpo sulla superficie del NP HA. Si basa sul principio che in condizioni alcaline gli ioni rame  $Cu^{+2}$  formano un complesso con legami peptidici di proteine e vengono ridotti a  $Cu^{+1}$ . Inoltre, la presenza di uno specifico composto chimico (colore viola) consente di quantificare la quantità di proteine presenti nel campione di interesse. La variazione di intensità è determinata dalla misura dell'assorbanza con uno spettrofotometro a 562 nm (Enspire Multimode Plate Reader PerkinElmer) 150 µl della sospensione di HA NPs vengono fatti reagire con una quantità uguale di soluzione di reagente di lavoro e la miscela viene incubata a 60°C per 1 ora. I risultati sono confrontati con una curva di calibrazione dell'albumina sierica bovina (BSA) e il valore di concentrazione viene quindi estrapolato da una linea retta di calibrazione costruita utilizzando campioni BSA di concentrazione nota (0 - 30 µg / mL). Tutte le misure sono eseguite in duplice copia

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### Quantificazione dei gruppi carbossilici sulla superficie delle NP HA reticolato

Il primo passo per la funzionalizzazione delle NP è rappresentato dalla valutazione del numero di gruppi -COOH presentati sulla superficie delle NP attraverso l'applicazione della retrotitolazione con HCl-NaOH, i cui risultati riportano la presenza di gruppi -COOH di circa 26 nmol / ml di soluzione NP.

### Ottimizzazione streptavidina NPs

Due diversi tipi di coniugazione delle cHANPs con l'anticorpo Ab-CD36 sono stati oggetto di studio. In questo lavoro: Coniugazione indiretta, mediata dalla formazione di un legame per affinità biologica, e coniugazione diretta mediata dalla formazione di un legame chimico di natura ammidica.

La prima strategia, in particolar modo, prevede una reazione di coupling indiretto mediato, dalla presenza di uno strato di rivestimento di streptavidina sulle NPs capace di interagire con la porzione biotinilata dell'anticorpo Ab-CD36.

Per ottimizzare il processo di bioconiugazione senza intaccare la stabilità strutturale e funzionale delle NPs alcuni importanti parametri sono stati valutati:

- Quantità di streptavidina da coniugare alla superficie carbossilata
- tempi di contatto,
- metodo di purificazione post reazione da applicare per concentrare le NPs, mantenendo integra la struttura ed il carico di Gd, e contestualmente allontanare l'eccesso di materiale non reagito

A seguito della quantificazione dei gruppi carbossilici disponibili effettuata mediante una semplice titolazione acido-base è emerso che il numero di COOH esposti in superficie si trova in un range tra le 7- 10 nmoli.

Per questo motivo in uno studio preliminare abbiamo deciso di lavorare con un leggero eccesso di streptavidina investigando, in particolar modo, tre punti sperimentali: 100, 50 e 25 ug/mL.

Per quanto riguarda i tempi di contatto, da uno studio di letteratura è emerso che, data l'elevata affinità biologica del legame streptavidina-biotina, i tempi di

contatto necessari per un'interazione stabile ed efficiente non sono superiori alle 24h.

Anche in questo caso abbiamo scelto tre punti sperimentali. 4-8-24 h testati per le tre differenti concentrazioni stabilite.

Le analisi SEM, TEM, DLS hanno dimostrato in tutti i casi il mantenimento dell'integrità strutturale delle particelle ma un eccesso di materiale non reagito nel caso delle più alte concentrazioni di streptavidina (50-100 ug/mL).

Nello specifico, la quantificazione del legame peptidico formatosi post reazione ha infatti rivelato che tra le 4, 8 e 24h non c'è una variazione della quantità di streptavidina legata che infatti, indipendentemente dalla concentrazione utilizzata e già a partire dalle 4h di contatto, si attesta sempre intorno ai 25 ug/mL.

#### Coniugazione diretta con anti-cd36

Nel caso di coniugazione diretta con l'anticorpo anti-CD36 da un'analisi morfologica mediante microscopia a trasmissione (TEM), i risultati mostrano che le NPs di HA hanno mantenuto la loro morfologia e stabilità dopo la reazione (Fig. 11b).

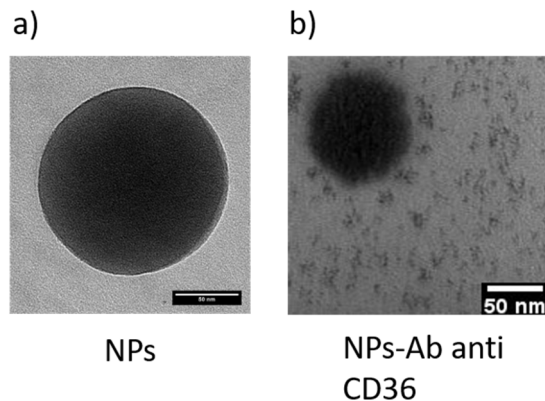


Figura 11. Caratterizzazione morfologica delle NP Ab-CD36-HA. Immagini TEM che mostrano a) il controllo; b) la coniugazione diretta con l'anticorpo Anti-CD36.

### Coniugazione indiretta con l'anticorpo anti cd36

Le NP HA sono state sottoposte anche alla coniugazione indiretta. Anche in questo caso, i risultati mostrano che la morfologia dei nanovettori è preservata. Come mostrato nell'immagine, dopo solo 1 ora di reazione è visibile la presenza del rivestimento STR mediante analisi TEM (Figura 11b)

La via di coniugazione alternativa e aspecifica basata sull' interazione streptavidina-biotina può essere utile per superare le limitazioni legate alla bioconiugazione sintetica.

Le superfici ricoperte con streptavidina si presentano infatti come uno strumento potente ed universale per legare ogni tipo di molecola biotinilata: la streptavidina è una proteina tetrameric (P.M. 60.000) con un'altissima affinità per la biotina ( $K_a = 10^{15} M^{-1}$ ) comunemente usata per la sua piccola dimensione che non altera le funzioni dei ligandi. La loro interazione biologica è il più forte legame di tipo non covalente che si conosca. Lo svantaggio di questo metodo è che può causare immunogenicità per la presenza della proteina esogena sulla superficie e anche perché la streptavidina può legare la biotina in modo polivalente.

Le NPs rivestite con streptavidina mostrano interazioni complementari con ligandi biotinilati<sup>215</sup>. Il protocollo che abbiamo messo a punto si basa quindi sulla formazione del legame peptide-streptavidina. L'interazione avviene tra il gruppo biotinico legato al carbossile terminale della cisteina presente nella catena amminoacidica del peptide e la streptavidina.

La concentrazione di anticorpo sulla superficie delle NP HA viene valutata mediante saggio BCA (Figura 20). Nel caso di coniugazione indiretta, viene eseguita una doppia quantificazione (la coniugazione con streptavidina e coniugazione con l'anticorpo). Nel caso della coniugazione con STR, la resa del processo è di circa il 96% .

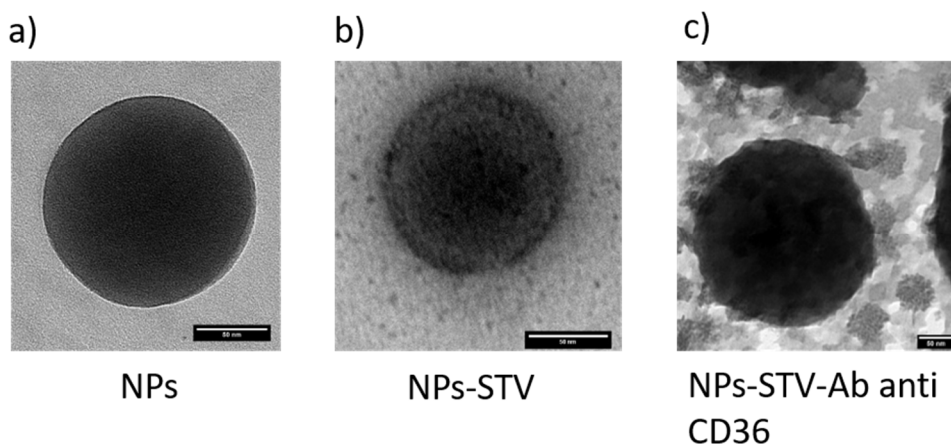


Figura 12. Caratterizzazione morfologica delle NP Ab-CD36-HA Immagini TEM coniugazione indiretta con proteina STR. a) NP-HA non rivestite (controllo); b) NP-HA dopo 1 h di reazione STR; c) NP HA dopo coniugata post coniugazione indiretta

### Caratterizzazione delle NPs

#### *Scanning Electron Microscope (SEM)*

Una prima caratterizzazione morfologica delle Nps viene effettuata con un microscopio elettronico a scansione (Carl Zeiss UltraPlus Field Emission Scanning Electron Microscope).

100  $\mu$ L dei campioni purificati sono depositati su membrane in policarbonato (cut-off: 0.05  $\mu$ m) mediante un sistema di ultrafiltrazione da vuoto e successivamente ricoperti con uno strato metallico (oro, 7 nm) per sputtering.

#### *Transmission Electron Microscope (TEM) (Fig.12)*

Una seconda analisi morfologica viene eseguita con l'ausilio del microscopio elettronico a trasmissione (TEM Tecnai FEI® transmission electron microscope).

I campioni sono preparati in modalità dry disponendo su dei retini Formvar/Carbon 200 mesh Cu Agar® 20  $\mu$ l della sospensione di HA-NPs.



### *Confocal Laser Scanning Microscope*

Per rilevare la fluorescenza delle NPs dopo bioconiugazione con Streptavidina-atto633 ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 630/651$ ) è stato utilizzato un microscopio confocale (Leica TCS SP5 Confocal Laser Scanning Microscope).

Per la visualizzazione al microscopio, 10  $\mu\text{l}$  della sospensione di NPs sono stati depositati su Fluorodish (25 mm di diametro) .

### CONCLUSIONI

In questa sezione, è dimostrato che le NP HA possono essere funzionalizzate con successo senza comprometterne la struttura e la stabilità. Infatti, la presenza di un gruppo carbossilico sulla superficie consente di rendere funzionanti questi nanovettori con biomarcatori idonei al fine di garantire la specificità tissutale e l'azione di mdc. In conclusione, il nuovo nanocarrier consente potenzialmente di rilevare in vivo una patologia specifica, come l'aterosclerosi, sfruttando il targeting attivo.

## PARAGRAFO 3.3: CARATTERIZZAZIONE PLACCA ATEROSCLEROTICA

### MATERIALI E METODI

#### PREPARAZIONE CAMPIONI PER MICROSCOPIA ELETTRONICA

Le placche sono state fissate in gluteraldeide 2.5% in tampone sodio cacodilato 0,1 M e tenute a 4°C overnight. Una volta rimosso il fissativo sono stati effettuati 3 lavaggi da 10 minuti nel tampone cacodilato di sodio 0,1M a 4°C. Al fine di stabilizzare i fosfolipidi e quindi le membrane, i campioni sono stati successivamente post fissati in tetrossido di osmio 1% (OsO<sub>4</sub>) in tampone cacodilato in presenza di 1% potassio ferrocianide utilizzato come coadjuvante della riduzione dell'OsO<sub>4</sub>. Dopo una incubazione di 1 ora al buio a 4°C i campioni sono stati lavati abbondantemente in cacodilato di sodio sempre a 4°C ed incubati per circa 3 minuti in una soluzione acquosa acido tannico 0.15%. Successivamente a 3 lavaggi da 5 minuti in acqua bidistillata, le placche sono state trasferite in acetato di uranile 1% e conservate in frigo a 4°C overnight al fine di ottenere uno staining "en-bloc". Il giorno successivo i campioni sono stati lavati abbondantemente in acqua e sezionati in pezzi più piccoli prima di iniziare la disidratazione in una serie ascendente di etanolo. Nello specifico 30, 50 e 70%, 1 ora a 4 ° C; 95% (due volte) e 100% (tre volte) EtOH, 1 ora a 4 ° C. Una volta arrivati nell'ultimo step di disidratazione in etanolo assoluto ciascuna placca viene divisa al fine di procedere con la preparativa TEM e SEM.

Per la Preparativa TEM, i campioni vengono tenuti in una miscela di etanolo assoluto- resina Spurr nel rapporto di 2:1 per circa 2 ore. Successivamente vengono trasferiti in in miscela etanolo/resina 1:1 overnight a temperatura ambiente. Il giorno successivo la miscela è stata sostituita con resina assoluta, nello specifico 1: 2 Epon/EtOH 2 ore; 1: 1 Epon/EtOH overnight; 2: 1 Epon/EtOH e due ulteriori passaggi (3 ore), Epon overnight, Epon due ulteriori lavaggi (3 ore), prima dell'incorporazione. Dopo polimerizzazione in stufa a 70°C per 48 ore, i campioni sono stati sezionati utilizzando un cryoultramicrotomo EM UC7-FC7Leica e sono state prodotte fette da circa 80 nm di spessore. Le fette sono state ottenute utilizzando un coltello diamantato e sono state recuperate su retini di rame da 300 mesh e lasciate ad asciugare a temperatura ambiente per un minimo di 12 ore. L'osservazione dei campioni così ottenuti è stata effettuata al microscopio elettronico a trasmissione (Tecnai G2-20\_Fei) ad un voltaggio di

120 KV. Le immagini TEM sono state acquisite con telecamera CCD 2K-HS \_Eagle ad una risoluzione di 2048 x 2048.

Per la microscopia elettronica a scansione (Field Emission, FE SEM, Ultraplus Zeiss), vengono analizzati piccoli blocchi di tessuto della regione di interesse. Tutti i campioni sono trattati secondo lo stesso protocollo riportato sopra per l'analisi TEM. Dopo le fasi di disidratazione, viene applicata la procedura di asciugatura a punti critici (CPD Leica) al fine di preservare la struttura superficiale dei campioni per la successiva analisi. Una volta disidratati, i campioni sono stati trasferiti nella camera del critical point drying (CPD\_EM300) riempita preventivamente con etanolo assoluto al fine di procedere con l'eliminazione del solvente dal campione preservando la struttura e la morfologia dei tessuti. Le placche così trattate vengono ancorate a stub di alluminio mediante dello scotch grafite e ricoperti da uno strato di 20 nm di oro (sputter coating HR208, cressington) al fine di renderli conduttivi all'osservazione al microscopio elettronico a scansione. L'imaging è stato effettuato con microscopio field emission sem (ultraplus-zeiss) ad un voltaggio tra 10-15 kV con detector per elettroni secondari del tipo SE ed InLens con una magnification fino a 1 mm.

#### INDAGINE DI CONTROLLO SULLE NANOPARTICELLE

I diversi reagenti chimici utilizzati durante la preparazione dei protocolli per l'analisi al microscopio elettronico, sono testati su NP HA non caricate al fine di stabilire se la loro morfologia e stabilità sono preservate durante gli esperimenti ex-vivo.

In particolare, 5 aliquote (500 µl) di NP HA scaricate in soluzione acquosa vengono incubate per 1 ora con le seguenti sostanze: sodico cacodilato (0,1 M), Gluteraldeide (2,5% v/v), tetrossido di osmio (1% v/v) e paraformadehyde (4% v/v).

Quindi, vengono eseguiti tre lavaggi rapidi con soluzione acquosa (RT, 5 minuti).

I campioni risultanti vengono filtrati, rivestiti con 10 nm di oro e osservati al SEM (Fig. 13).

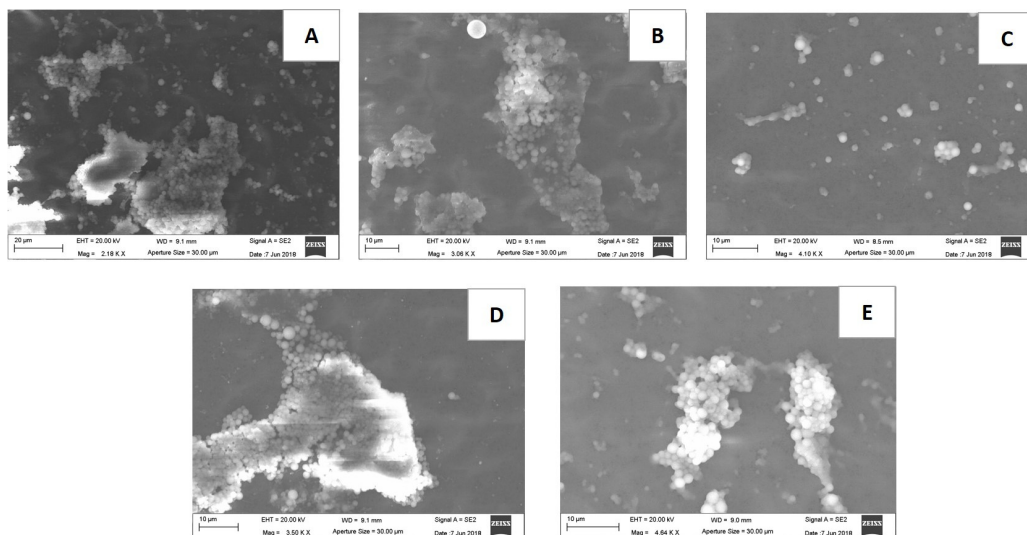


Figura 13. Immagine dell'elettrone di scansione delle NP HA non caricate testate con reagenti chimici per 1 ora a RT: A) controllo delle NP NP; B) paraformaldeide (4% v / v); C) Glutaraldeide (2,5% v / v); D) osmio tetrossido (1% v / v) ed E) sodico cacodilato (0,1 M).

## RISULTATI E DISCUSSIONI

### Caratterizzazione della placca aterosclerotica

Il processo aterosclerotico è attivato da alterazioni delle cellule endoteliali. Pertanto, è necessario utilizzare la microscopia per visualizzare l'intera superficie intimale e per comprendere meglio la fisiopatologia di questa malattia.

In questo lavoro, l'analisi microscopica a scansione viene eseguita sulla superficie luminale della parete del vaso carotideo umano (Figura 14a). L'esame mostra che lo strato endoteliale è preservato anche se è possibile notare un'architettura non regolare. Diverse piastrine e leucociti aderenti all'endotelio (Figura 14b) e fibre di collagene (Figura 14c) sono visibili in tutti i campioni.

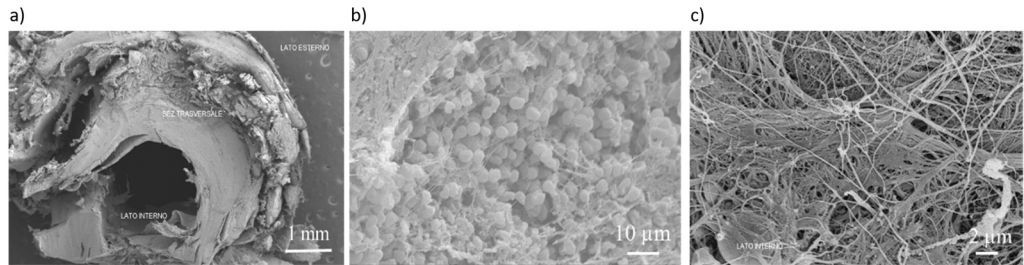


Figura 14. Immagini SEM di placca aterosclerotica umana. a) Immagine SEM dsezione trasversale dell'arteria carotide umana che mostra come lo spessore delle pareti vari nello stesso tessuto Immagine della superficie subendoteliale – è visibile il cappuccio fibroso formato da fibrina e fibre di collagene. b) Immagine SEM della superficie dell'endotelio - sono visibili piastrine e leucociti che aderiscono all'endotelio

## PARAGRAFO 3.4: STUDIO EX-VIVO INTERAZIONE Gd-HA-NP<sub>s</sub>/PLACCA ATEROSCLEROTICA

### INTRODUZIONE

In uno studio di Lipinski et al.<sup>207</sup> condotto sulle nanoparticelle di natura lipidica a base di Gd funzionalizzate con un anticorpo anti-CD36, un recettore scavenger di classe B, si è avuto un assorbimento significativo da parte dei macrofagi umani in vitro, un miglioramento dell'intensità del segnale della placca aterosclerotica aortica ex vivo e hanno dimostrato di legarsi ai macrofagi residenti nella placca aterosclerotica tramite microscopia confocale. Tale studio ha dimostrato la potenziale applicazione di nanoparticelle funzionalizzate con l'anticorpo anti-CD36 nel targeting attivo delle placche aterosclerotiche. Queste evidenze hanno creato le premesse per implementare uno studio ex-vivo delle nanoparticelle di acido ialuronico contenenti Gd-DTPA, bioconiugate con l'anticorpo anti CD36 (Gd-HA-NPs-anti CD36) su placche aterosclerotiche umane mediante imaging di risonanza magnetica.

### MATERIALI E METODI

In questo studio di ricerca sono state utilizzate particelle Gd-HA-NPs di forma sferica, dimensione media di 141.8 nm e relaxività  $r_1 = 0,44 \text{ s}^{-1}$ , (Figura 15) corrispondente ad una concentrazione di Gd-DTPA libero di circa  $69 \mu\text{M}$ . Il loro contenuto di soli  $12,3 \mu\text{M}$  di Gd-DTPA, rivela un miglioramento delle proprietà rilassometriche di oltre 5 volte. Le Gd-HA-NPs sono state utilizzate sia nude che funzionalizzate in superficie con l'Ab anti CD36.

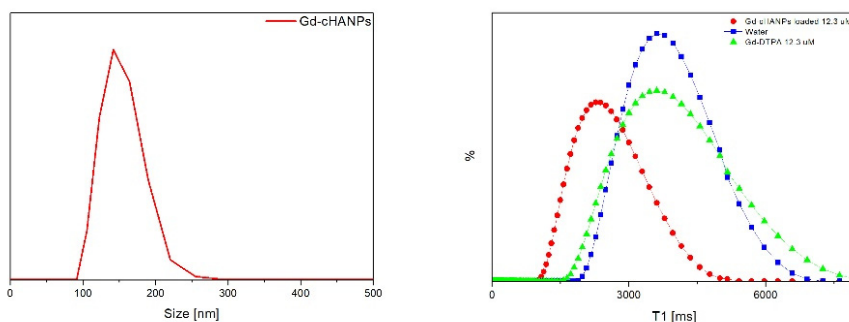


Figura 15. Caratterizzazione delle HA-NPs-Gd loaded. a) La misura di Dynamic light scattering che riporta la distribuzione della dimensione delle particelle; b) Misura con rilassometro da banco (1,5T) per ottenere la distribuzione dei tempi di rilassamento longitudinali  $T_1$  delle particelle nude e funzionalizzate.

Le placche aterosclerotiche sono state ottenute per endoarterectomia da pazienti con aterosclerosi da moderata a grave (grado di stenosi pari al 70% asintomatici o del 50% sintomatici). Le aorte sono state utilizzate appena espianate o dopo scongelamento progressivo nell'arco di 24 ore circa, da azoto liquido, a -80°C (10h), a -20°C (12h), a +4°C (2h) in soluzione fisiologica isotonica (NaCl 0,9%). Prima dell'imaging, le placche rimosse dalla fisiologica, sono state pulite, tamponate e immerse in FOMBLIN® (perfluoropolietere; Sigma Aldrich) per la risonanza magnetica. Il Fomblin® è stato utilizzato al fine di preservare il tessuto biologico dalla deidratazione con il vantaggio di non avere segnale RM residuo o interferenza con il segnale del tessuto biologico stesso. Ogni esperimento di risonanza è stato condotto con i seguenti parametri: TR = 2500 ms; TE = 12 ms; TI = 50, 100, 200, 400, 800, 1100, 1800 ms; FOV= 180x146 mm; slice thickness = 4 mm, acquisition matrix = 360x292. L'acquisizione è stata effettuata contemporaneamente su 6 campioni di placca aterosclerotica, suddivisi in tre gruppi. Il primo gruppo (1) è stato studiato utilizzando Gd-DTPA libero in soluzione acquosa (10 µM) come controllo, il secondo gruppo (2) è stato trattato invece con Gd-HA-NPs non funzionalizzate, il terzo gruppo (3) con Gd-HA-NPs-Ab-antiCD36. Le particelle nude o funzionalizzate sono state concentrate ed iniettate in bolo (150 µL – contenenti una concentrazione di Gd di 12 µM) nella parte luminale della placca e successivamente sottoposte a risonanza mantenendo le stesse posizioni della risonanza di controllo, ossia delle placche senza il bolo del mdc. Questo ha permesso di individuare l'enhancement del segnale di risonanza magnetica dovuto alla sola iniezione di NPs o mdc libero rispetto al segnale del tessuto non trattato. In tabella 2 sono riportati schematicamente gli esperimenti condotti e in tabella 3 i risultati dello studio MRI ex vivo.

Tabella 2- Pianificazione sperimentale degli esperimenti *ex-vivo*

	Numero di Placche	Agente di Contrasto	Gd-DTPA iniettato [ $\mu\text{M}$ ]	Volume di iniezione [mL]
<b>Esperimento 1</b>	6	Gd-DTPA	12	150 $\mu\text{L}$
		HA-NPs-Gd		
		Ab-HA-NPs-Gd		
<b>Esperimento 2</b>	6	Gd-DTPA	12,3	150 $\mu\text{L}$
		HA-NPs-Gd		
		Ab-HA-NPs-Gd		

Successivamente le placche, opportunamente sezionate per isolare il tessuto in corrispondenza del punto di iniezione, come mostrato in Figura 16, sono state sottoposte al protocollo per l'analisi alla microscopia elettronica a trasmissione (TEM) descritto in precedenza.



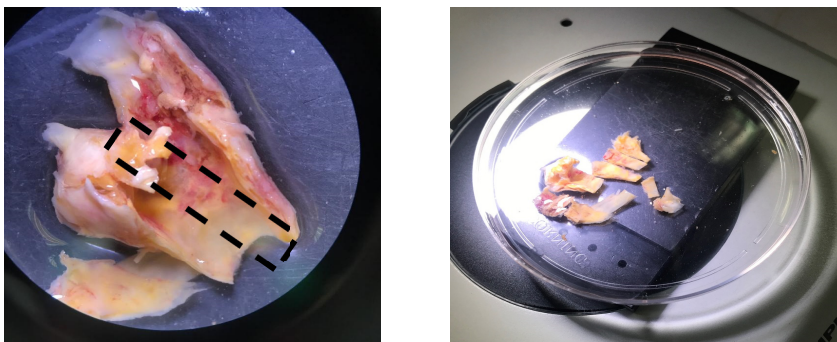


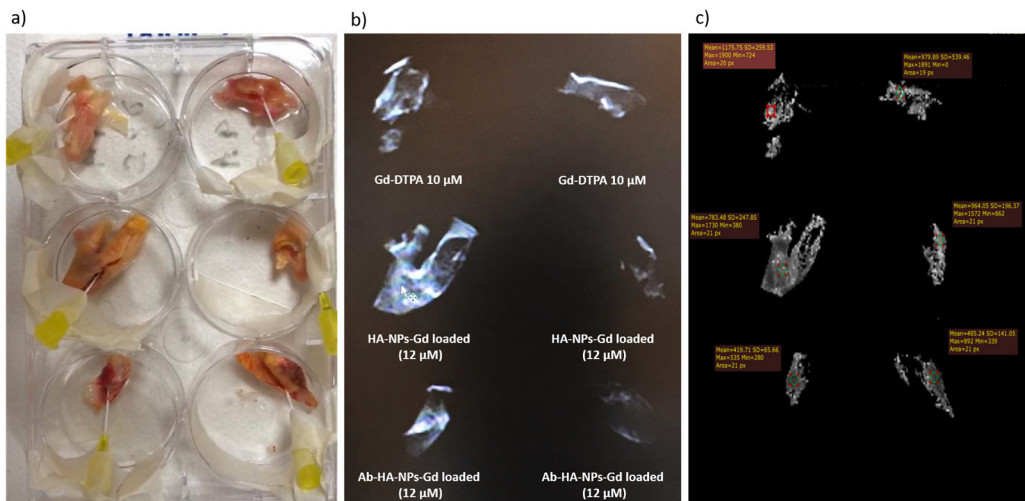
Figura 16. Sezionamento delle placche e isolamento dei campioni per la microscopia elettronica.

## RISULTATI E DISCUSSIONI

### Ex-vivo imaging – risultati preliminari

Le placche aterosclerotiche sono caratterizzate da un'elevata variabilità anatomica che ne determina la vulnerabilità<sup>9</sup>. Pertanto una tecnica diagnostica come la risonanza magnetica nucleare, che permette lo studio della composizione della placca, è certamente una auspicabile tecnica di elezione per la diagnosi e la prevenzione degli eventi clinici correlati all'aterosclerosi. A tale proposito è stato condotto uno studio preliminare ex-vivo in cui le Gd-HA NPs, funzionalizzate e non, sono state iniettate in placche aterosclerotiche umane ottenute per endoarterectomia carotidea di soggetti aterosclerotici, e successivamente sottoposte a risonanza magnetica. La prima fase dello studio è stata dedicata alla ottimizzazione della sequenza di osservazione per la visualizzazione delle placche alla risonanza. Successivamente, è stato individuato il volume di iniezione adeguato del mezzo di contrasto, in modo da garantirne il trattenimento e la permeazione nel tessuto stesso senza danneggiarlo. Per minimizzare gli effetti della variabilità intrinseca delle placche legata alla loro composizione, ciascuna iniezione è stata condotta in duplice copia. Così in ogni esperimento sono state utilizzate n.6 placche nelle quali a gruppi di due sono state iniettate soluzioni acquose di Gd-DTPA libero, Gd-HA NPs, Ab-Gd-HA NPs. Successivamente sono state sottoposte a risonanza magnetica nucleare ed è stato indirettamente valutato l'aumento di rilassività indotto dal mezzo di

contrasto tramite la misura di T1 “pesata”<sup>215</sup> all’interno di una regione di interesse (ROI) quando sottoposta a sequenze di inversion recovery. Per l’acquisizione delle immagini delle placche prima dell’iniezione è stata utilizzata una sequenza volumetrica con sottrazione del segnale lipidico, in grado di restituire un’immagine tridimensionale della placca al fine di ricostruirne l’anatomia. A seguito dell’iniezione e per i successivi 30 minuti, le placche sono state sottoposte a sequenze bidimensionali che hanno permesso di migliorare la risoluzione spaziale dell’immagine ed osservare la distribuzione del mdc iniettato all’interno del tessuto in maniera tempo dipendente. Le acquisizioni sono state sottoposte a post-processing ed è stata valutata l’intensità dei pixel all’interno di una ROI opportunamente scelta Figura 17.



**Figura 17: Ex-vivo MRI delle placche aterosclerotiche umane. a) Posizionamento campioni; b) Ricostruzione tridimensionale delle placche tramite RM; c) Post-processing delle intensità.**

La tabella 3 riporta i valori di T1 misurati prima e dopo le iniezioni rispettivamente di: Gd-DTPA libero, Gd-HA-NPs e Ab-Gd-HA-NPs.

L’elevata eterogeneità anatomica delle placche si è perfettamente riflessa nei valori di intensità misurati per le stesse a monte dell’iniezione, i quali sono caratterizzati da variabilità nell’ordine delle centinaia di punti. Pertanto, tutti i confronti tra le placche trattate con i diversi agenti di contrasto, sono stati effettuati su valori di intensità normalizzati al valore ottenuto delle placche pre-iniezione. I valori normalizzati sono riportati in tabella 4. All’esame dei valori di

intensità media nella ROI a seguito dell'iniezione si evidenzia un andamento prevalentemente parabolico per quasi tutti i campioni analizzati. Questo andamento suggerisce che come atteso, l'agente di contrasto diffonde all'interno del tessuto, entrando ed uscendo dalla ROI per cui, a seguito di un iniziale incremento attribuibile all'iniezione stessa, il segnale medio subisce un decremento. Tale ipotesi è ulteriormente validata dall'aumento della deviazione standard della misura, indice di una distribuzione non omogenea dell'agente di contrasto nella ROI stessa. La diffusione, e quindi la velocità con cui l'agente di contrasto diffonde all'interno del tessuto, risulterà influenzata non solo dalla dimensione della molecola in questione (molecole di Gd-DTPA libero o nanoparticelle), ma anche dall'ambiente circostante e quindi dalla composizione della placca stessa. Pertanto, le placche prevalentemente fibrotiche offriranno una resistenza alla diffusione maggiore di quelle a principale componente lipidica o trombotica, con conseguente variazione dell'intensità meno evidente. Inoltre è possibile supporre che la meno spinta variazione in intensità nelle placche trattate con nanoparticelle, ed in particolare con Ab-Gd-HA-NPs rispetto al bianco, sia dovuto ad un preferenziale accumulo delle NPs in una particolare regione della placca, la regione target ricca di macrofagi. Per confermare questi ipotesi derivanti dall'osservazione e dall'analisi dei dati di Risonanza magnetica, si rendono necessarie indagini di microscopia al fine di valutare la localizzazione di eventuali accumuli di nanoparticelle in regioni specifiche del tessuto e confrontarne la diversa distribuzione rispetto a quelle non funzionalizzate.

**Tab 3 Intensità pixel nella ROI a seguito dell'EX-VIVO IMAGING**

<b>Esperimento 1</b>	<b>Gd-DTPA 10 uM</b>	<b>Gd-DTPA 10 uM_2</b>	<b>HA NPs-Gd (12 uM)</b>	<b>HA NPs-Gd_2</b>	<b>Ab-HA NPs Gd</b>	<b>Ab-HA Gd_2</b>	<b>NPs-</b>
Intensità Pre-iniezione	1175,75	979,89	964,05	485,24	783,48	419,71	
St Dev	259,53	593,86	196,37	141,05	247,85	65,66	
Intensità Post-iniezione	1346,45	903,48	773	733,62	782,6	480	
St Dev	317,1	641,49	281,84	264,06	144,94	62,75	
Intensità 15 min Post- iniezione	1142,45	875,81	831,05	604	754,45	480,22	

St Dev	245,65	573,13	262,04	182,16	109,38	63,77
Intensità - 30 min Post- Iniezione	1137,4	1117,43	816,05	668,95	746,4	479,67
St Dev	332,94	471	261,43	231,12	255,17	47,94

Esperimento 2	Gd-DTPA 10 uM	Gd-DTPA 10 uM_2	HA NPs- Gd	HA NPs- Gd_2	Ab-HA NPs- Gd	Ab-HA NPs-Gd_2
Intensità Pre-iniezione	378,17	893,8	1431,25	711,55	1210,74	516,1
St Dev	50,11	215,61	258,2	457,91	420,38	93,65
Intensità Post-iniezione	347,68	810,94	1500,39	1156,11	1118,95	704,59
St Dev	86,4	387,64	470,06	296,72	371,42	234,77
Intensità 15 min Post- iniezione	378,68	734,5	1024,17	1031,37	1221,86	643,91
St Dev	129,78	394,05	567,68	366,27	350,97	170,93
Intensità - 30 min Post- Iniezione	370,11	872,2	1196,67	907,26	1347,81	635,64
St Dev	130,21	387,87	546,8	478,34	280,94	167,78

**Tabella 4. Valori normalizzati di intensità all'interno delle ROI**

	Gd-DTPA 10 uM	Gd-DTPA 10 uM_2	HA-NPs-Gd	HA-NPs- Gd_2	Ab-HA-NPs- Gd	Ab-HA-NPs- Gd_2
Intensità Pre- iniezione	0	0	0	0	0	0
Intensità Post- iniezione	0,080625116	-0,092705303	0,048307424	0,624776896	0,075813139	0,365219919

Intensità						
15 min						
Post-						
iniezione	0,0013486	-0,178227791	0,284422707	0,449469468	0,009184466	0,247645805
Intensità -						
30 min						
Post-						
Iniezione	0,021313166	-0,02416648	-0,16389869	0,275047432	0,113211755	0,231621779

### Caratterizzazione interazione placca aterosclerotica umana-NPs-Gd

Come anticipato, per ricevere conferma delle nostre ipotesi abbiamo eseguito degli studi sulla localizzazione delle Ab-HA-NPs-Gd, quindi sulla loro abilità di veicolare specificamente l'agente di contrasto verso i macrofagi della placca aterosclerotica.

A seguito dell'osservazione in Risonanza Magnetica, le stesse placche iniettate con Ab-HA-NPs-Gd sono state trattate seguendo il protocollo riportato nel paragrafo "*Ex-VIVO Imaging*" sulle placche tal quali. Indagini di microscopia elettronica sono state condotte al fine di verificare e localizzare l'accumulo del mdc nella placca se veicolato con NPs funzionalizzate o non, con l'anticorpo specifico per il recettore CD36 dei macrofagi presenti nella placca aterosclerotica.

Dall'osservazione delle immagini TEM a seguito l'iniezione di Gd-HA-NPs Figura 18 e Ab-Gd-HA-NPS Figura 19, si evidenzia la scarsa presenza di NPs nelle placche trattate con Gd-HA-NPs, ossia NPs non funzionalizzate con l'anticorpo. Questa osservazione potrebbe essere il risultato di una scarsa interazione tra NPs e tessuto, in quanto i numerosi lavaggi necessari nella fase preparativa del campione per la microscopia elettronica potrebbero aver allontanato gran parte delle particelle iniettate che non hanno interagito con il tessuto. Diversamente, a seguito dell'iniezione con le particelle funzionalizzate, se ne osserva una più elevata presenza nel tessuto con una quasi esclusiva localizzazione a livello cellulare. Pertanto è possibile ipotizzare che le Ab-HA-NPs-Gd, rispetto alle HA-NPs-Gd non funzionalizzate, presentano un accumulo preferenziale nella componente cellulare della placca aterosclerotica, indice di una interazione specifica, ossia di un potenziale targeting attivo della placca.

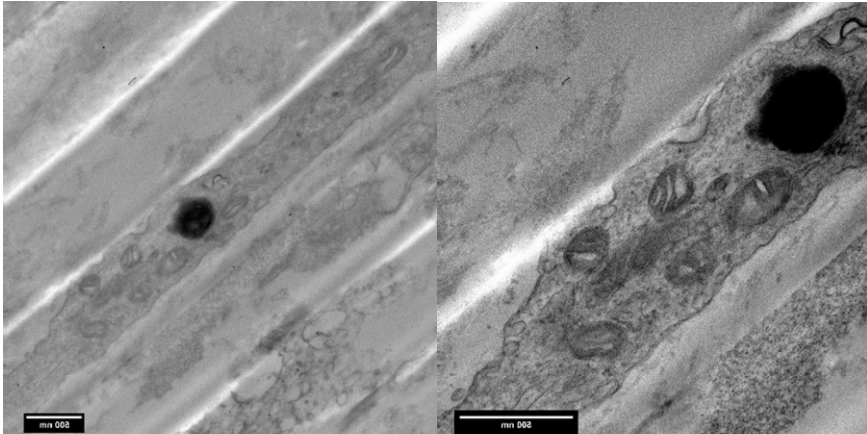


Figura 18. Immagine TEM Gd- HA-NPs e placca aterosclerotica

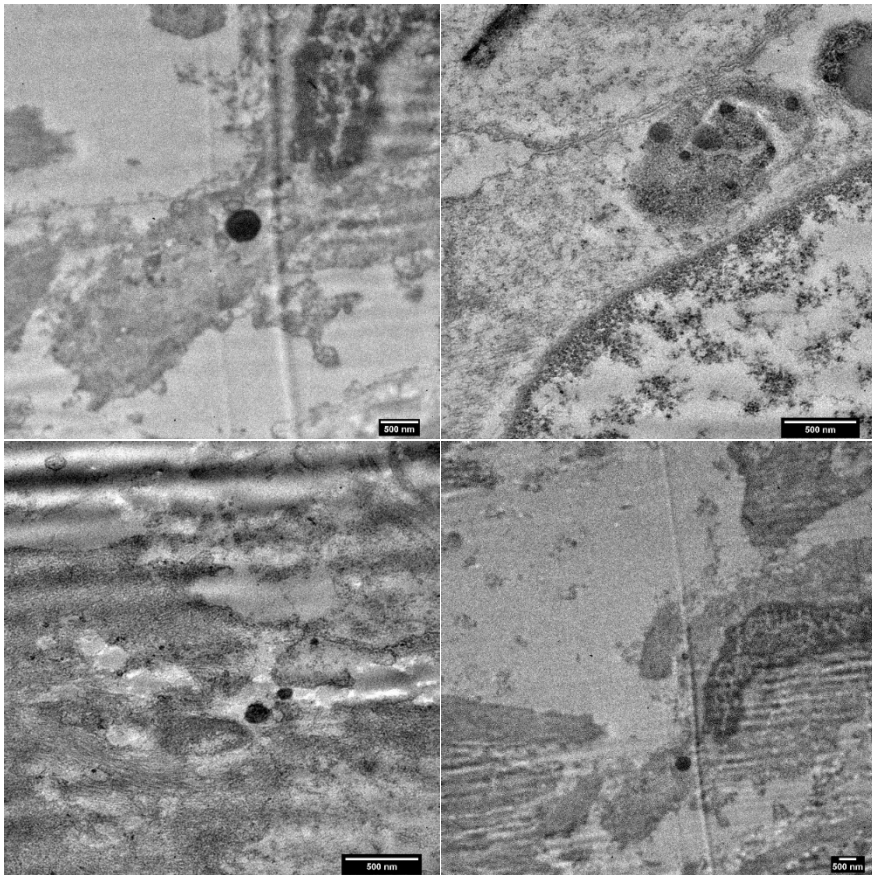


Figura 19. Immagine TEM interazione Ab-HA-NPs-Gd e placca aterosclerotica

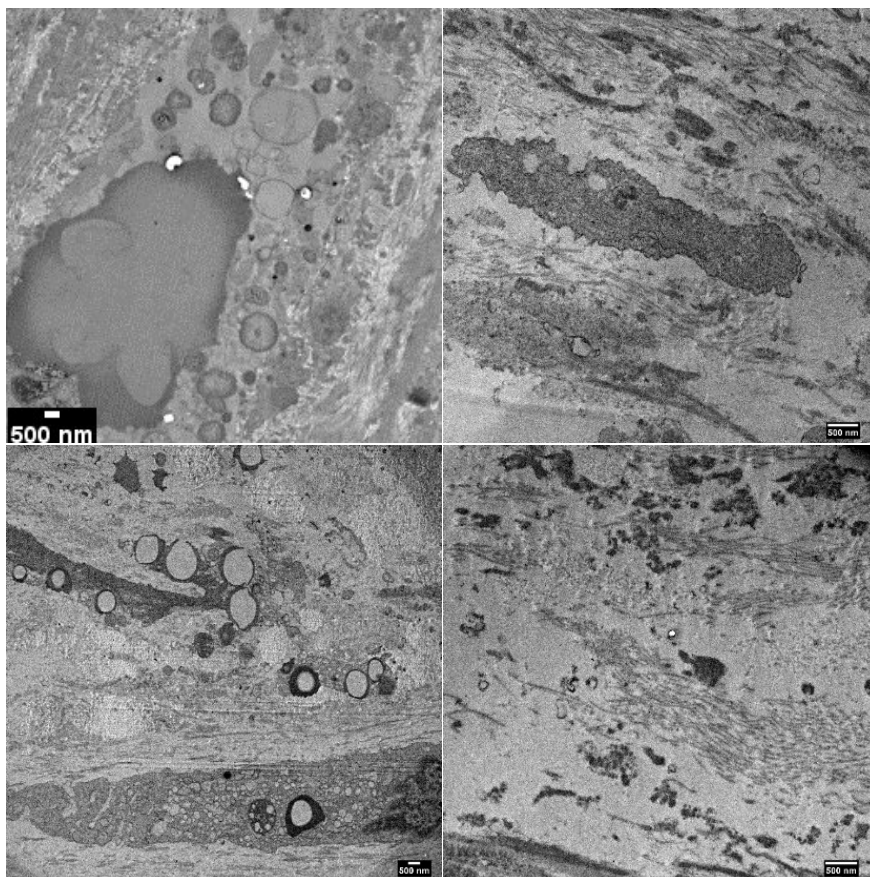


Fig. 18. Immagine TEM placca aterosclerotica non iniettata (controllo)

## CONCLUSIONI

In questo paragrafo sono stati riportati i risultati ottenuti a seguito dell'osservazione in Risonanza Magnetica. I dati di microscopia elettronica evidenziano un accumulo soltanto delle nanoparticelle funzionalizzate con l'anticorpo specifico per il recettore CD36 in distretti della placca che ne hanno permesso anche la detection in RM.

## CAPITOLO 4: CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

In questo lavoro di tesi è stato progettato un nanovettore per applicazione nell'imaging delle placche aterosclerotiche. Sul prodotto ottenuto è stato eseguito un Imaging in RM ex vivo per valutare la sua interazione con una "aorta umana" rimossa chirurgicamente per endoarterectomia. A seguito dell'ottimizzazione del nanovettore e delle sue proprietà di Imaging, lo studio è stato condotto iniettando le Nanoparticelle semplici e funzionalizzate all'interno della placca. Lo scopo è stato quello di valutare l'abilità di targeting delle nanoparticelle e la loro specificità per il CD36. Ciò ha permesso di osservare che le NPs funzionalizzate si accumulano in specifici distretti della placca rispetto alle nanoparticelle non funzionalizzate. Queste osservazioni devono essere confermate da ulteriori indagini di microscopia e di confronto con la letteratura al fine di caratterizzare in maniera più dettagliata la natura delle cellule sulle quali viene osservato l'accumulo. La specificità delle nanoparticelle prodotte, va, ovviamente, confermata attraverso studi pre-clinici, quindi in vivo, per somministrazione endovenosa delle nanoparticelle. Infatti, l'uso per via endovenosa di questo tipo di nanovettore specifico per il CD36 e applicazioni diagnostiche, potrebbe subire l'effetto di primo passaggio nel fegato legandosi ai recettori scavenger espressi sulla superficie delle cellule di Kupffer<sup>206</sup> così come il legame con altre cellule che esprimono CD36 come cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, adipociti e piastrine, pertanto lo studio in vivo permetterà una valutazione della biodisponibilità dell'agente di contrasto somministrato in questo modo.



## Bibliografia

- 1 De Sarno, F. *et al.* Water-Mediated Nanostructures for Enhanced MRI: Impact of Water Dynamics on Relaxometric Properties of Gd-DTPA. *Theranostics* **9**, 1809-1824, doi:10.7150/thno.27313 (2019).
- 2 Russo, M., Ponsiglione, A. M., Forte, E., Netti, P. A. & Torino, E. Hydrodenticity to enhance relaxivity of gadolinium-DTPA within crosslinked hyaluronic acid nanoparticles. *Nanomedicine* **12**, 2199-2210, doi:10.2217/nnm-2017-0098 (2017).
- 3 Falk, E. Pathogenesis of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology* **47**, C7-C12, doi:10.1016/j.jacc.2005.09.068 (2006).
- 4 Cary, T. & Pearce, J. Aortic Stenosis: Pathophysiology, Diagnosis, and Medical Management of Nonsurgical Patients. *Critical Care Nurse* **33**, 58-72, doi:10.4037/ccn2013820 (2013).
- 5 Bilen, B. *et al.* Determination of Ultrastructural Properties of Human Carotid Atherosclerotic Plaques by Scanning Acoustic Microscopy, Micro-Computer Tomography, Scanning Electron Microscopy and Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy. *Scientific Reports* **9**, doi:10.1038/s41598-018-37480-z (2019).
- 6 Muller, J. E., Tawakol, A., Kathiresan, S. & Narula, J. New opportunities for identification and reduction of coronary risk - Treatment of vulnerable patients, arteries, and plaques. *Journal of the American College of Cardiology* **47**, C2-C6, doi:10.1016/j.jacc.2005.12.044 (2006).
- 7 Hoffmann, U., Brady, T. J. & Muller, J. Use of new Imaging techniques to screen for coronary artery disease. *Circulation* **108**, E50-E53, doi:10.1161/01.cir.0000085363.88377.f2 (2003).
- 8 Virmani, R., Burke, A. P., Farb, A. & Kolodgie, F. D. Pathology of the vulnerable plaque. *Journal of the American College of Cardiology* **47**, C13-C18, doi:10.1016/j.jacc.2005.10.065 (2006).
- 9 Geng, Y. H. & Libby, P. Progression of atheroma - A struggle between death and procreation. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **22**, 1370-1380, doi:10.1161/01.atv.0000031341.84618.a4 (2002).
- 10 Tedgui, A. & Mallat, Z. Apoptosis as a determinant of atherothrombosis. *Thrombosis and Haemostasis* **86**, 420-426 (2001).
- 11 Kolodgie, F. D. *et al.* Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *New England Journal of Medicine* **349**, 2316-2325, doi:10.1056/NEJMoa035655 (2003).
- 12 Konig, A. & Klaus, V. Virtual histology. *Heart* **93**, 977-982, doi:10.1136/hrt.2007.116384 (2007).
- 13 Kern, R., Szabo, K., Hennerici, M. & Meairs, S. Characterization of carotid artery plaques using real-time compound B-mode ultrasound. *Stroke* **35**, 870-875, doi:10.1161/01.str.0000120728.72958.4a (2004).

- 14 Grant, E. G. *et al.* Carotid artery stenosis: Gray-scale and Doppler US diagnosis - Society of Radiologists in Ultrasound consensus conference. *Radiology* **229**, 340-346, doi:10.1148/radiol.2292030516 (2003).
- 15 Elbarghouty, N., Geroulakos, G., Nicolaidis, A., Androulakis, A. & Bahal, V. COMPUTER-ASSISTED CAROTID PLAQUE CHARACTERIZATION. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* **9**, 389-393, doi:10.1016/s1078-5884(05)80005-x (1995).
- 16 Biasi, G. M. *et al.* Computer analysis of ultrasonic plaque echolucency in identifying high risk carotid bifurcation lesions. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* **17**, 476-479, doi:10.1053/ejvs.1999.0789 (1999).
- 17 Bower, M. Robbin's pathologic basis of disease, 5th edition. *British Journal of Hospital Medicine* **55**, 299-299 (1996).
- 18 Mauriello, A. *et al.* A pathobiologic link between risk factors profile and morphological markers of carotid instability. *Atherosclerosis* **208**, 572-580, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.07.048 (2010).
- 19 Bui, Q. T., Prempeh, M. & Wilensky, R. L. Atherosclerotic plaque development. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41**, 2109-2113, doi:10.1016/j.biocel.2009.06.002 (2009).
- 20 O'Brien, K. D., McDonald, T. O., Chait, A., Allen, M. D. & Alpers, C. E. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation* **93**, 672-682 (1996).
- 21 Johnston, S. C. *et al.* Validation and refinement of scores to predict very early stroke risk after transient ischaemic attack. *Lancet* **369**, 283-292, doi:10.1016/s0140-6736(07)60150-0 (2007).
- 22 Ross, R. THE PATHOGENESIS OF ATHEROSCLEROSIS - A PERSPECTIVE FOR THE 1990S. *Nature* **362**, 801-809, doi:10.1038/362801a0 (1993).
- 23 Redgrave, J. N. E., Lovett, J. K., Gallagher, P. J. & Rothwell, P. M. Histological assessment of 526 symptomatic carotid plaques in relation to the nature and timing of ischemic symptoms - The Oxford plaque study. *Circulation* **113**, 2320-2328, doi:10.1161/circulationaha.105.589044 (2006).
- 24 Chan, C. K. W. *et al.* Recent Advances in Managing Atherosclerosis via Nanomedicine. *Small* **14**, doi:10.1002/smll.201702793 (2018).
- 25 Hansson, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease - Reply. *New England Journal of Medicine* **353**, 429-430 (2005).
- 26 Naghavi, M. *et al.* From vulnerable plaque to vulnerable patient - A call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* **108**, 1664-1672, doi:10.1161/01.cir.0000087480.94275.97 (2003).
- 27 Marques, J. S. & Pinto, F. J. The vulnerable plaque: Current concepts and future perspectives on coronary morphology, composition and wall stress

- imaging. *Revista Portuguesa De Cardiologia* **33**, 101-110, doi:10.1016/j.repc.2013.07.017 (2014).
- 28 Matter, C. M., Stuber, M. & Nahrendorf, M. Imaging of the unstable plaque: how far have we got? *European Heart Journal* **30**, 2566-2574, doi:10.1093/eurheartj/ehp419 (2009).
- 29 Sano, T. *et al.* C-reactive protein and lesion morphology in patients with acute myocardial infarction. *European Heart Journal* **24**, 493-493, doi:10.1016/s0195-668x(03)95457-1 (2003).
- 30 Kerensky, R. A. *et al.* Revisiting the culprit lesion in non-Q-wave myocardial infarction: Results from the VANQWISH trial angiographic core laboratory. *Journal of the American College of Cardiology* **39**, 1456-1463, doi:10.1016/s0735-1097(02)01770-9 (2002).
- 31 Prati, F. *et al.* Expert review document on methodology, terminology, and clinical applications of optical coherence tomography: physical principles, methodology of image acquisition, and clinical application for assessment of coronary arteries and atherosclerosis. *European Heart Journal* **31**, 401-415, doi:10.1093/eurheartj/ehp433 (2010).
- 32 Ambrose, J. A. *et al.* ANGIOGRAPHIC PROGRESSION OF CORONARY-ARTERY DISEASE AND THE DEVELOPMENT OF MYOCARDIAL-INFARCTION. *Journal of the American College of Cardiology* **12**, 56-62, doi:10.1016/0735-1097(88)90356-7 (1988).
- 33 Hatsukami, T. S., Ross, R., Polissar, N. L. & Yuan, C. Visualization of fibrous cap thickness and rupture in human atherosclerotic carotid plaque in vivo with high-resolution magnetic resonance imaging. *Circulation* **102**, 959-964, doi:10.1161/01.cir.102.9.959 (2000).
- 34 Yuan, C. *et al.* Identification of fibrous cap rupture with magnetic resonance imaging is highly associated with recent transient ischemic attack or stroke. *Circulation* **105**, 181-185, doi:10.1161/hc0202.102121 (2002).
- 35 Furman-Haran, E., Kelcz, F. & Degani, H. Magnetic resonance Imaging of breast cancer angiogenesis: A review. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **21**, 47-54 (2002).
- 36 Haris, M. *et al.* Molecular magnetic resonance imaging in cancer. *Journal of Translational Medicine* **13**, doi:10.1186/s12967-015-0659-x (2015).
- 37 Wang, Y. X. J., Hussain, S. M. & Krestin, G. P. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *European Radiology* **11**, 2319-2331, doi:10.1007/s003300100908 (2001).
- 38 Marzola, P., Boschi, F. & Sbarbati, A. Innovation in contrast agents for magnetic resonance imaging. *Current Medical Imaging Reviews* **2**, 291-298, doi:10.2174/157340506777934507 (2006).

- 39 Koenig, S. H. & Brown, R. D. FIELD-CYCLING RELAXOMETRY OF PROTEIN SOLUTIONS AND TISSUE - IMPLICATIONS FOR MRI. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **22**, 487-567, doi:10.1016/0079-6565(90)80008-6 (1990).
- 40 Helbich, T. H. Contrast-enhanced magnetic resonance imaging of the breast. *European Journal of Radiology* **34**, 208-219, doi:10.1016/s0720-048x(00)00200-x (2000).
- 41 Kuriashkin, I. V. & Losonsky, J. M. Contrast enhancement in magnetic resonance imaging using intravenous paramagnetic contrast media: A review. *Veterinary Radiology & Ultrasound* **41**, 4-7, doi:10.1111/j.1740-8261.2000.tb00419.x (2000).
- 42 Knopp, M. V., Giesel, F. L., Marcos, H., von Tengg-Kobligk, H. & Choyke, P. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in oncology. *Topics in magnetic resonance imaging : TMRI* **12**, 301-308, doi:10.1097/00002142-200108000-00006 (2001).
- 43 Kowalewski, J., Luchinat, C., Nilsson, T. & Parigi, G. Nuclear spin relaxation in paramagnetic systems: Electron spin relaxation effects under near-Redfield limit conditions and beyond. *Journal of Physical Chemistry A* **106**, 7376-7382, doi:10.1021/jp020608p (2002).
- 44 Do, C., Barnes, J. L., Tan, C. Y. & Wagner, B. Type of MRI contrast, tissue gadolinium, and fibrosis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **307**, F844-F855, doi:10.1152/ajprenal.00379.2014 (2014).
- 45 Russo, M. *et al.* PEGylated crosslinked hyaluronic acid nanoparticles designed through a microfluidic platform for nanomedicine. *Nanomedicine* **12**, 2211-2222, doi:10.2217/nnm-2017-0103 (2017).
- 46 Bhaskar, S. *et al.* Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging. *Particle and Fibre Toxicology* **7**, doi:10.1186/1743-8977-7-3 (2010).
- 47 Bharali, D. J. & Mousa, S. A. Emerging nanomedicines for early cancer detection and improved treatment: Current perspective and future promise. *Pharmacology & Therapeutics* **128**, 324-335, doi:10.1016/j.pharmthera.2010.07.007 (2010).
- 48 Galvin, P. *et al.* Nanoparticle-based drug delivery: case studies for cancer and cardiovascular applications. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**, 389-404, doi:10.1007/s00018-011-0856-6 (2012).
- 49 Tinoco, G., Warsch, S., Gluck, S., Avancha, K. & Montero, A. J. Treating Breast Cancer in the 21st Century: Emerging Biological Therapies. *Journal of Cancer* **4**, 117-132, doi:10.7150/jca.4925 (2013).
- 50 Schapiro-Dufour, E. *et al.* Drug-eluting stents in patients at high risk of restenosis: Assessment for France. *International Journal of Technology*

- Assessment in Health Care* **27**, 108-117, doi:10.1017/s0266462311000134 (2011).
- 51 Caravan, P. Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents. *Chemical Society Reviews* **35**, 512-523, doi:10.1039/b510982p (2006).
- 52 Kelkar, S. S. & Reineke, T. M. Theranostics: Combining Imaging and Therapy. *Bioconjugate Chemistry* **22**, 1879-1903, doi:10.1021/bc200151q (2011).
- 53 Choi, K. Y., Liu, G., Lee, S. & Chen, X. Y. Theranostic nanoplatfoms for simultaneous cancer imaging and therapy: current approaches and future perspectives. *Nanoscale* **4**, 330-342, doi:10.1039/c1nr11277e (2012).
- 54 Cole, J. T. & Holland, N. B. Multifunctional nanoparticles for use in theranostic applications. *Drug Delivery and Translational Research* **5**, 295-309, doi:10.1007/s13346-015-0218-2 (2015).
- 55 Lammers, T., Aime, S., Hennink, W. E., Storm, G. & Kiessling, F. Theranostic Nanomedicine. *Accounts of Chemical Research* **44**, 1029-1038, doi:10.1021/ar200019c (2011).
- 56 Luxenhofer, R., Barz, M. & Schillmeier, M. Quo Vadis Nanomedicine? *Nanomedicine* **9**, 2083-2086, doi:10.2217/nnm.14.140 (2014).
- 57 Sumer, B. & Gao, J. M. Theranostic nanomedicine for cancer. *Nanomedicine* **3**, 137-140, doi:10.2217/17435889.3.2.137 (2008).
- 58 Lux, F. *et al.* Gadolinium-based nanoparticles for theranostic MRI-radiosensitization. *Nanomedicine* **10**, 1801-1815, doi:10.2217/nnm.15.30 (2015).
- 59 Xie, J., Lee, S. & Chen, X. Y. Nanoparticle-based theranostic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**, 1064-1079, doi:10.1016/j.addr.2010.07.009 (2010).
- 60 Janib, S. M., Moses, A. S. & MacKay, J. A. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**, 1052-1063, doi:10.1016/j.addr.2010.08.004 (2010).
- 61 Kunjachan, S. *et al.* Theranostic Systems and Strategies for Monitoring Nanomedicine-Mediated Drug Targeting. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **13**, 609-622, doi:10.2174/138920112799436302 (2012).
- 62 Wang, D., Lin, B. B. & Ai, H. Theranostic Nanoparticles for Cancer and Cardiovascular Applications. *Pharmaceutical Research* **31**, 1390-1406, doi:10.1007/s11095-013-1277-z (2014).
- 63 Zhao, J., Mi, Y. & Feng, S. S. siRNA-based nanomedicine. *Nanomedicine* **8**, 859-862, doi:10.2217/nnm.13.73 (2013).
- 64 Mei, L. *et al.* Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**, 880-890, doi:10.1016/j.addr.2012.11.005 (2013).

- 65 Smith, B. A. & Smith, B. D. Biomarkers and Molecular Probes for Cell Death Imaging and Targeted Therapeutics. *Bioconjugate Chemistry* **23**, 1989-2006, doi:10.1021/bc3003309 (2012).
- 66 Caldorera-Moore, M. E., Liechty, W. B. & Peppas, N. A. Responsive Theranostic Systems: Integration of Diagnostic Imaging Agents and Responsive Controlled Release Drug Delivery Carriers. *Accounts of Chemical Research* **44**, 1061-1070, doi:10.1021/ar2001777 (2011).
- 67 Xu, C. J. & Zhao, W. A. Nanoparticle-based Monitoring of Stem Cell Therapy. *Theranostics* **3**, 616-617, doi:10.7150/thno.7020 (2013).
- 68 Ma, X. W., Zhao, Y. L. & Liang, X. J. Theranostic Nanoparticles Engineered for Clinic and Pharmaceuticals. *Accounts of Chemical Research* **44**, 1114-1122, doi:10.1021/ar2000056 (2011).
- 69 Tan, Y. F. *et al.* Multimodal tumor imaging by iron oxides and quantum dots formulated in poly (lactic acid)-D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 2969-2978, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.12.055 (2011).
- 70 Zhao, L. Y. & Feng, S. S. Enhanced Oral Bioavailability of Paclitaxel Formulated in Vitamin E-TPGS Emulsified Nanoparticles of Biodegradable Polymers: In Vitro and In Vivo Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **99**, 3552-3560, doi:10.1002/jps.22113 (2010).
- 71 Bawa, R. Regulating Nanomedicine - Can the FDA Handle It? *Current Drug Delivery* **8**, 227-234, doi:10.2174/156720111795256156 (2011).
- 72 McGrady, E., Conger, S., Blanke, S. & Landry, B. J. L. Emerging Technologies in Healthcare: Navigating Risks, Evaluating Rewards. *Journal of Healthcare Management* **55**, 353-364 (2010).
- 73 Russo, M., Bevilacqua, P., Netti, P. A. & Torino, E. A Microfluidic Platform to design crosslinked Hyaluronic Acid Nanoparticles (cHANPs) for enhanced MRI. *Scientific Reports* **6**, doi:10.1038/srep37906 (2016).
- 74 Cormode, D. P. *et al.* Atherosclerotic Plaque Composition: Analysis with Multicolor CT and Targeted Gold Nanoparticles. *Radiology* **256**, 774-782, doi:10.1148/radiol.10092473 (2010).
- 75 Qi, C. M. *et al.* Identifying Vulnerable Atherosclerotic Plaque in Rabbits Using DMSA-USPIO Enhanced Magnetic Resonance Imaging to Investigate the Effect of Atorvastatin. *Plos One* **10**, doi:10.1371/journal.pone.0125677 (2015).
- 76 Mishra, S. *et al.* Improved intervention of atherosclerosis and cardiac hypertrophy through biodegradable polymer-encapsulated delivery of glycosphingolipid inhibitor. *Biomaterials* **64**, 125-135, doi:10.1016/j.biomaterials.2015.06.001 (2015).
- 77 Daminelli, E. N., Martinelli, A. E. M., Bulgarelli, A., Freitas, F. R. & Maranhao, R. C. Reduction of Atherosclerotic Lesions by the Chemotherapeutic Agent

- Carmustine Associated to Lipid Nanoparticles. *Cardiovascular Drugs and Therapy* **30**, 433-443, doi:10.1007/s10557-016-6675-0 (2016).
- 78 Kim, B. Y. S., Rutka, J. T. & Chan, W. C. W. Current Concepts: Nanomedicine. *New England Journal of Medicine* **363**, 2434-2443, doi:10.1056/NEJMra0912273 (2010).
- 79 Nahrendorf, M. *et al.* Noninvasive vascular cell adhesion molecule-1 imaging identifies inflammatory activation of cells in atherosclerosis. *Circulation* **114**, 1504-1511, doi:10.1161/circulationaha.106.646380 (2006).
- 80 Mulder, W. J. M. Combination nanotherapy penetrates atherosclerosis. *Cardiovascular Research* **109**, 191-192, doi:10.1093/cvr/cvv271 (2016).
- 81 Hsiai, T. K. *et al.* Monocyte recruitment to endothelial cells in response to oscillatory shear stress. *Faseb Journal* **17**, 1648-1657, doi:10.1096/fj.02-1064com (2003).
- 82 Bobryshev, Y. V., Ivanova, E. A., Chistiakov, D. A., Nikiforov, N. G. & Orekhov, A. N. Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis. *Biomed Research International*, doi:10.1155/2016/9582430 (2016).
- 83 Mlinar, L. B., Chung, E. J., Wonder, E. A. & Tirrell, M. Active targeting of early and mid-stage atherosclerotic plaques using self-assembled peptide amphiphile micelles. *Biomaterials* **35**, 8678-8686, doi:10.1016/j.biomaterials.2014.06.054 (2014).
- 84 Blankenberg, S., Barbaux, S. & Tiret, L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **170**, 191-203, doi:10.1016/s0021-9150(03)00097-2 (2003).
- 85 Adiguzel, E., Ahmad, P. J., Franco, C. & Bendeck, M. P. Collagens in the progression and complications of atherosclerosis. *Vascular Medicine* **14**, 73-89, doi:10.1177/1358863x08094801 (2009).
- 86 Chan, J. M. *et al.* Spatiotemporal controlled delivery of nanoparticles to injured vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 2213-2218, doi:10.1073/pnas.0914585107 (2010).
- 87 Kamaly, N. *et al.* Targeted Interleukin-10 Nanotherapeutics Developed with a Microfluidic Chip Enhance Resolution of Inflammation in Advanced Atherosclerosis. *Acs Nano* **10**, 5280-5292, doi:10.1021/acsnano.6b01114 (2016).
- 88 Meyers, M. W. *et al.* Systemically administered collagen-targeted gold nanoparticles bind to arterial injury following vascular interventions. *Physiological Reports* **5**, doi:10.14814/phy2.13128 (2017).
- 89 Duivenvoorden, R. & Mulder, W. J. M. Imaging Tropoelastin in Atherosclerosis. *Circulation-Cardiovascular Imaging* **11**, doi:10.1161/circimaging.118.008147 (2018).

- 90 Korin, N. *et al.* Shear-Activated Nanotherapeutics for Drug Targeting to Obstructed Blood Vessels. *Science* **337**, 738-742, doi:10.1126/science.1217815 (2012).
- 91 Jacobin-Valat, M. J. *et al.* Nanoparticles functionalised with an anti-platelet human antibody for in vivo detection of atherosclerotic plaque by magnetic resonance imaging. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **11**, 927-937, doi:10.1016/j.nano.2014.12.006 (2015).
- 92 Bini, A., Fenoglio, J. J., Mesatejada, R., Kudryk, B. & Kaplan, K. L. IDENTIFICATION AND DISTRIBUTION OF FIBRINOGEN, FIBRIN, AND FIBRIN(OGEN) DEGRADATION PRODUCTS IN ATHEROSCLEROSIS - USE OF MONOCLONAL-ANTIBODIES. *Arteriosclerosis* **9**, 109-121, doi:10.1161/01.atv.9.1.109 (1989).
- 93 Yoo, S. P. *et al.* Gadolinium-Functionalized Peptide Amphiphile Micelles for Multimodal Imaging of Atherosclerotic Lesions. *Acs Omega* **1**, 996-1003, doi:10.1021/acsomega.6b00210 (2016).
- 94 Ludewig, B. & Laman, J. D. The in and out of monocytes in atherosclerotic plaques: Balancing inflammation through migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 11529-11530, doi:10.1073/pnas.0404612101 (2004).
- 95 Bersenyi, A., Fodor, K., Korsos, G. & Fekete, S. G. Animal models of human atherosclerosis. *Magyar Allatorvosok Lapja* **140**, 375-383 (2018).
- 96 Moore, K. J. & Freeman, M. W. Scavenger receptors in atherosclerosis: Beyond lipid uptake. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **26**, 1702-1711, doi:10.1161/01.atv.0000229218.97976.43 (2006).
- 97 Bocan, T. M. A. *et al.* THE RELATIONSHIP BETWEEN THE DEGREE OF DIETARY-INDUCED HYPERCHOLESTEROLEMIA IN THE RABBIT AND ATHEROSCLEROTIC LESION FORMATION. *Atherosclerosis* **102**, 9-22, doi:10.1016/0021-9150(93)90080-e (1993).
- 98 Granada, J. F. *et al.* Porcine models of coronary atherosclerosis and vulnerable plaque for imaging and interventional research. *Eurointervention* **5**, 140-148, doi:10.4244/eijv5i1a22 (2009).
- 99 Getz, G. S. & Reardon, C. A. Animal Models of Atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **32**, 1104-+, doi:10.1161/atvbaha.111.237693 (2012).
- 100 Vandamme, T. F. Rodent models for human diseases. *European Journal of Pharmacology* **759**, 84-89, doi:10.1016/j.ejphar.2015.03.046 (2015).
- 101 Ishibashi, S. *et al.* HYPERCHOLESTEROLEMIA IN LOW-DENSITY-LIPOPROTEIN RECEPTOR KNOCKOUT MICE AND ITS REVERSAL BY ADENOVIRUS-MEDIATED GENE DELIVERY. *Journal of Clinical Investigation* **92**, 883-893, doi:10.1172/jci116663 (1993).



- 102 Nam, D. *et al.* Partial carotid ligation is a model of acutely induced disturbed flow, leading to rapid endothelial dysfunction and atherosclerosis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **297**, H1535-H1543, doi:10.1152/ajpheart.00510.2009 (2009).
- 103 Kumar, S., Kang, D. W., Rezvan, A. & Jo, H. Accelerated atherosclerosis development in C57Bl6 mice by overexpressing AAV-mediated PCSK9 and partial carotid ligation. *Laboratory Investigation* **97**, 935-945, doi:10.1038/labinvest.2017.47 (2017).
- 104 Lewis, D. R. *et al.* Sugar-based amphiphilic nanoparticles arrest atherosclerosis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 2693-2698, doi:10.1073/pnas.1424594112 (2015).
- 105 Tang, J. *et al.* Immune cell screening of a nanoparticle library improves atherosclerosis therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, E6731-E6740, doi:10.1073/pnas.1609629113 (2016).
- 106 Wahajuddin & Arora, S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine* **7**, 3445-3471, doi:10.2147/ijn.s30320 (2012).
- 107 Cormode, D. P. *et al.* An ApoA-I mimetic peptide high-density-lipoprotein-based MRI contrast agent for atherosclerotic plaque composition detection. *Small* **4**, 1437-1444, doi:10.1002/smll.200701285 (2008).
- 108 Tang, J. *et al.* Inhibiting macrophage proliferation suppresses atherosclerotic plaque inflammation. *Science Advances* **1**, doi:10.1126/sciadv.1400223 (2015).
- 109 Perez-Medina, C. *et al.* In Vivo PET Imaging of HDL in Multiple Atherosclerosis Models. *Jacc-Cardiovascular Imaging* **9**, 950-961, doi:10.1016/j.jcmg.2016.01.020 (2016).
- 110 Zuckerman, J. E., Choi, C. H. J., Han, H. & Davis, M. E. Polycation-siRNA nanoparticles can disassemble at the kidney glomerular basement membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 3137-3142, doi:10.1073/pnas.1200718109 (2012).
- 111 Choi, H. S. *et al.* Renal clearance of quantum dots. *Nature Biotechnology* **25**, 1165-1170, doi:10.1038/nbt1340 (2007).
- 112 Anraku, Y., Kishimura, A., Oba, M., Yamasaki, Y. & Kataoka, K. Spontaneous Formation of Nanosized Unilamellar Polyion Complex Vesicles with Tunable Size and Properties. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 1631-1636, doi:10.1021/ja908350e (2010).
- 113 Yi, S. J. *et al.* Tailoring Nanostructure Morphology for Enhanced Targeting of Dendritic Cells in Atherosclerosis. *Acs Nano* **10**, 11290-11303, doi:10.1021/acsnano.6b06451 (2016).

- 114 Luehmann, H. P. *et al.* PET/CT Imaging of Chemokine Receptors in  
Inflammatory Atherosclerosis Using Targeted Nanoparticles. *Journal of*  
*Nuclear Medicine* **57**, 1124-1129, doi:10.2967/jnumed.115.166751 (2016).
- 115 Hamzah, J. *et al.* Specific penetration and accumulation of a homing peptide  
within atherosclerotic plaques of apolipoprotein E-deficient mice. *Proceedings*  
*of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**,  
7154-7159, doi:10.1073/pnas.1104540108 (2011).
- 116 Wen, S. *et al.* OxLDL-targeted iron oxide nanoparticles for in vivo MRI  
detection of perivascular carotid collar induced atherosclerotic lesions in  
ApoE-deficient mice. *Journal of Lipid Research* **53**, 829-838,  
doi:10.1194/jlr.M018895 (2012).
- 117 Cheng, D. F. *et al.* Detection of Vulnerable Atherosclerosis Plaques with a  
Dual-Modal Single-Photon-Emission Computed Tomography/Magnetic  
Resonance Imaging Probe Targeting Apoptotic Macrophages. *Acs Applied*  
*Materials & Interfaces* **7**, 2847-2855, doi:10.1021/am508118x (2015).
- 118 van Tilborg, G. A. F. *et al.* Annexin A5-Functionalized Bimodal Nanoparticles  
for MRI and Fluorescence Imaging of Atherosclerotic Plaques. *Bioconjugate*  
*Chemistry* **21**, 1794-1803, doi:10.1021/bc100091q (2010).
- 119 Bruckman, M. A. *et al.* Dual-Modal Magnetic Resonance and Fluorescence  
Imaging of Atherosclerotic Plaques in Vivo Using VCAM-1 Targeted Tobacco  
Mosaic Virus. *Nano Letters* **14**, 1551-1558, doi:10.1021/nl404816m (2014).
- 120 Xing, H. Y. *et al.* Ultrasmall NaGdF<sub>4</sub> Nanodots for Efficient MR Angiography  
and Atherosclerotic Plaque Imaging. *Advanced Materials* **26**, 3867-3872,  
doi:10.1002/adma.201305222 (2014).
- 121 Palekar, R. U., Jallouk, A. P., Myerson, J. W., Pan, H. & Wickline, S. A. Inhibition  
of Thrombin With PPACK-Nanoparticles Restores Disrupted Endothelial  
Barriers and Attenuates Thrombotic Risk in Experimental Atherosclerosis.  
*Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **36**, 446-455,  
doi:10.1161/atvbaha.115.306697 (2016).
- 122 Sanchez-Gaytan, B. L. *et al.* HDL-Mimetic PLGA Nanoparticle To Target  
Atherosclerosis Plaque Macrophages. *Bioconjugate Chemistry* **26**, 443-451,  
doi:10.1021/bc500517k (2015).
- 123 Kamat, M. *et al.* Hyaluronic Acid Immobilized Magnetic Nanoparticles for  
Active Targeting and Imaging of Macrophages. *Bioconjugate Chemistry* **21**,  
2128-2135, doi:10.1021/bc100354m (2010).
- 124 Lee, S. G. *et al.* Copper-64 labeled liposomes for imaging bone marrow.  
*Nuclear Medicine and Biology* **43**, 781-787,  
doi:10.1016/j.nucmedbio.2016.08.011 (2016).
- 125 Beldman, T. J. *et al.* Hyaluronan Nanoparticles Selectively Target Plaque-  
Associated Macrophages and Improve Plaque Stability in Atherosclerosis. *Acs*  
*Nano* **11**, 5785-5799, doi:10.1021/acsnano.7b01385 (2017).

- 126 Nakashiro, S. *et al.* Pioglitazone-Incorporated Nanoparticles Prevent Plaque Destabilization and Rupture by Regulating Monocyte/Macrophage Differentiation in ApoE(-/-) Mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **36**, 491-500, doi:10.1161/atvbaha.115.307057 (2016).
- 127 Reiner, Z. Statins in the primary prevention of cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology* **10**, 453-464, doi:10.1038/nrcardio.2013.80 (2013).
- 128 Duivenvoorden, R. *et al.* A statin-loaded reconstituted high-density lipoprotein nanoparticle inhibits atherosclerotic plaque inflammation. *Nature Communications* **5**, doi:10.1038/ncomms4065 (2014).
- 129 Katsuki, S. *et al.* Nanoparticle-Mediated Delivery of Pitavastatin Inhibits Atherosclerotic Plaque Destabilization/Rupture in Mice by Regulating the Recruitment of Inflammatory Monocytes. *Circulation* **129**, 896-906, doi:10.1161/circulationaha.113.002870 (2014).
- 130 Saremi, A. *et al.* Pioglitazone Slows Progression of Atherosclerosis in Prediabetes Independent of Changes in Cardiovascular Risk Factors. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **33**, 393-+, doi:10.1161/atvbaha.112.300346 (2013).
- 131 Lobatto, M. E. *et al.* Atherosclerotic Plaque Targeting Mechanism of Long-Circulating Nanoparticles Established by Multimodal Imaging. *Acs Nano* **9**, 1837-1847, doi:10.1021/nn506750r (2015).
- 132 Alam, S. R. *et al.* Ultrasmall Superparamagnetic Particles of Iron Oxide in Patients With Acute Myocardial Infarction Early Clinical Experience. *Circulation-Cardiovascular Imaging* **5**, 559-565, doi:10.1161/circimaging.112.974907 (2012).
- 133 van der Valk, F. M. *et al.* Prednisolone-containing liposomes accumulate in human atherosclerotic macrophages upon intravenous administration. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **11**, 1039-1046, doi:10.1016/j.nano.2015.02.021 (2015).
- 134 Lobatto, M. E. *et al.* Multimodal Clinical Imaging To Longitudinally Assess a Nanomedical Anti-Inflammatory Treatment in Experimental Atherosclerosis. *Molecular Pharmaceutics* **7**, 2020-2029, doi:10.1021/mp100309y (2010).
- 135 Lewis, D. R., Kamisoglu, K., York, A. W. & Moghe, P. V. Polymer-based therapeutics: nanoassemblies and nanoparticles for management of atherosclerosis. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology* **3**, 400-420, doi:10.1002/wnan.145 (2011).
- 136 McCormick, C. L., Kirkland, S. E. & York, A. W. Synthetic routes to stimuli-responsive micelles, vesicles, and surfaces via controlled/living radical polymerization. *Polymer Reviews* **46**, 421-443, doi:10.1080/15583720600945428 (2006).
- 137 Hobbs, S. K. *et al.* Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America* **95**, 4607-4612, doi:10.1073/pnas.95.8.4607 (1998).
- 138 Yuan, F. *et al.* VASCULAR-PERMEABILITY IN A HUMAN TUMOR XENOGRAFT - MOLECULAR-SIZE DEPENDENCE AND CUTOFF SIZE. *Cancer Research* **55**, 3752-3756 (1995).
- 139 Matsumura, Y. & Maeda, H. A NEW CONCEPT FOR MACROMOLECULAR THERAPEUTICS IN CANCER-CHEMOTHERAPY - MECHANISM OF TUMORITROPIC ACCUMULATION OF PROTEINS AND THE ANTITUMOR AGENT SMANCS. *Cancer Research* **46**, 6387-6392 (1986).
- 140 Gerlowski, L. E. & Jain, R. K. MICROVASCULAR PERMEABILITY OF NORMAL AND NEOPLASTIC TISSUES. *Microvascular Research* **31**, 288-305, doi:10.1016/0026-2862(86)90018-x (1986).
- 141 Lobatto, M. E., Fuster, V., Fayad, Z. A. & Mulder, W. J. M. Perspectives and opportunities for nanomedicine in the management of atherosclerosis (vol 10, pg 835, 2011). *Nature Reviews Drug Discovery* **10**, 963-963, doi:10.1038/nrd3614 (2011).
- 142 Torchilin, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery* **4**, 145-160, doi:10.1038/nrd1632 (2005).
- 143
- 144 Chen, W., Cormode, D. P., Fayad, Z. A. & Mulder, W. J. M. Nanoparticles as magnetic resonance imaging contrast agents for vascular and cardiac diseases. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology* **3**, 146-161, doi:10.1002/wnan.114 (2011).
- 145 Vasir, J. K., Reddy, M. K. & Labhsetwar, V. D. Nanosystems in drug targeting: Opportunities and challenges. *Current Nanoscience* **1**, 47-64, doi:10.2174/1573413052953110 (2005).
- 146 Pirillo, A., Norata, G. D. & Catapano, A. L. LOX-1, OxLDL, and Atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*, doi:10.1155/2013/152786 (2013).
- 147 Kuai, R., Li, D., Chen, Y. E., Moon, J. J. & Schwendeman, A. High-Density Lipoproteins: Nature's Multifunctional Nanoparticles. *Acs Nano* **10**, 3015-3041, doi:10.1021/acs.nano.5b07522 (2016).
- 148 Ding, B. S., Dziubla, T., Shuvaev, V. V., Muro, S. & Muzykantov, V. R. Advanced drug delivery systems that target the vascular endothelium. *Molecular Interventions* **6**, 98-112, doi:10.1124/mi.6.2.7 (2006).
- 149 Muro, S. *et al.* A novel endocytic pathway induced by clustering endothelial ICAM-1 or PECAM-1. *Journal of Cell Science* **116**, 1599-1609, doi:10.1242/jcs.00367 (2003).
- 150 Muro, S. *et al.* Slow intracellular trafficking of catalase nanoparticles targeted to ICAM-1 protects endothelial cells from oxidative stress. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **285**, C1339-C1347, doi:10.1152/ajpcell.00099.2003 (2003).

- 151 Poston, R. N., Haskard, D. O., Coucher, J. R., Gall, N. P. & Johnson-Tidey, R. R. EXPRESSION OF INTERCELLULAR-ADHESION MOLECULE-1 IN ATHEROSCLEROTIC PLAQUES. *American Journal of Pathology* **140**, 665-673 (1992).
- 152 Garnacho, C. *et al.* Delivery of acid sphingomyelinase in normal and Niemann-Pick disease mice using intercellular adhesion molecule-1-targeted polymer nanocarriers. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **325**, 400-408, doi:10.1124/jpet.107.133298 (2008).
- 153 Muro, S. *et al.* Endothelial targeting of high-affinity multivalent polymer nanocarriers directed to intercellular adhesion molecule 1. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **317**, 1161-1169, doi:10.1124/jpet.105.098970 (2006).
- 154 Murciano, J. C. *et al.* ICAM-directed vascular immunotargeting of antithrombotic agents to the endothelial luminal surface. *Blood* **101**, 3977-3984, doi:10.1182/blood-2002-09-2853 (2003).
- 155 Zhang, N., Chittasupho, C., Duangrat, C., Siahaan, T. J. & Berkland, C. PLGA nanoparticle-peptide conjugate effectively targets intercellular cell-adhesion molecule-1. *Bioconjugate Chemistry* **19**, 145-152, doi:10.1021/bc700227z (2008).
- 156 Kelly, K. A. *et al.* Detection of vascular adhesion molecule-1 expression using a novel multimodal nanoparticle. *Circulation Research* **96**, 327-336, doi:10.1161/01.RES.0000155722.17881.dd (2005).
- 157 Molenaar, T. J. M. *et al.* P-selectin as a candidate target in atherosclerosis. *Biochemical Pharmacology* **66**, 859-866, doi:10.1016/s0006-2952(03)00387-3 (2003).
- 158 Kang, H. W., Torres, D., Wald, L., Weissleder, R. & Bogdanov, A. A. Targeted imaging of human endothelial-specific marker in a model of adoptive cell transfer. *Laboratory Investigation* **86**, 599-609, doi:10.1038/labinvest.3700421 (2006).
- 159 Simone, E., Ding, B. S. & Muzykantov, V. Targeted delivery of therapeutics to endothelium. *Cell and Tissue Research* **335**, 283-300, doi:10.1007/s00441-008-0676-7 (2009).
- 160 McAteer, M. A. *et al.* Magnetic resonance imaging of endothelial adhesion molecules in mouse atherosclerosis using dual-targeted microparticles of iron oxide. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **28**, 77-83, doi:10.1161/atvbaha.107.145466 (2008).
- 161 Kolodgie, F. D. *et al.* Elimination of neoangiogenesis for plaque stabilization - Is there a role for local drug therapy? *Journal of the American College of Cardiology* **49**, 2093-2101, doi:10.1016/j.jacc.2006.10.083 (2007).

- 162 Ribatti, D., Levi-Schaffer, F. & Kovanen, P. T. Inflammatory angiogenesis in atherogenesis a double-edged sword. *Annals of Medicine* **40**, 606-621, doi:10.1080/07853890802186913 (2008).
- 163 Winter, P. M. *et al.* Endothelial alpha(v)beta(3) integrin-targeted fumagillin nanoparticles inhibit angiogenesis in atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **26**, 2103-2109, doi:10.1161/01.atv.0000235724.11299.76 (2006).
- 164 Mulder, W. J. M. *et al.* Molecular imaging of macrophages in atherosclerotic plaques using bimodal PEG-micelles. *Magnetic Resonance in Medicine* **58**, 1164-1170, doi:10.1002/mrm.21315 (2007).
- 165 Amirbekian, V. *et al.* Detecting and assessing macrophages in vivo to evaluate atherosclerosis noninvasively using molecular MRI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 961-966, doi:10.1073/pnas.0606281104 (2007).
- 166 Boullier, A. *et al.* Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **157**, 214-223 (2001).
- 167 Park, Y. M. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Experimental and Molecular Medicine* **46**, doi:10.1038/emm.2014.38 (2014).
- 168 Febbraio, M., Hajjar, D. P. & Silverstein, R. L. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *Journal of Clinical Investigation* **108**, 785-791, doi:10.1172/jci14006 (2001).
- 169 Dawson, D. W. *et al.* CD36 mediates the in vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *Journal of Cell Biology* **138**, 707-717, doi:10.1083/jcb.138.3.707 (1997).
- 170 Libby, P., Ridker, P. M. & Maseri, A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* **105**, 1135-1143, doi:10.1161/hc0902.104353 (2002).
- 171 Endemann, G. *et al.* CD36 IS A RECEPTOR FOR OXIDIZED LOW-DENSITY-LIPOPROTEIN. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 11811-11816 (1993).
- 172 Chmielewski, M., Bragfors-Helin, A. C., Stenvinkel, P., Lindholm, B. & Anderstam, B. Serum soluble CD36, assessed by a novel monoclonal antibody-based sandwich ELISA, predicts cardiovascular mortality in dialysis patients. *Clinica Chimica Acta* **411**, 2079-2082, doi:10.1016/j.cca.2010.09.009 (2010).
- 173 Acharya, A. A Prospective Combination of Nanotechnology and Medicine: Nanomedicine. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research* **8**, 915-920 (2017).
- 174 Decuzzi, P. *et al.* Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles. *Journal of Controlled Release* **141**, 320-327, doi:10.1016/j.jconrel.2009.10.014 (2010).
- 175 Ta, H. T., Truong, N. P., Whittaker, A. K., Davis, T. P. & Peter, K. The effects of particle size, shape, density and flow characteristics on particle margination

- to vascular walls in cardiovascular diseases. *Expert Opinion on Drug Delivery* **15**, 33-45, doi:10.1080/17425247.2017.1316262 (2018).
- 176 Blanco, E., Shen, H. & Ferrari, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology* **33**, 941-951, doi:10.1038/nbt.3330 (2015).
- 177 Stylianopoulos, T. & Jain, R. K. Design considerations for nanotherapeutics in oncology. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **11**, 1893-1907, doi:10.1016/j.nano.2015.07.015 (2015).
- 178 Gref, R. *et al.* 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **18**, 301-313, doi:10.1016/s0927-7765(99)00156-3 (2000).
- 179 Karmali, P. P. *et al.* Different Effect of Hydrogelation on Antifouling and Circulation Properties of Dextran-Iron Oxide Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics* **9**, 539-545, doi:10.1021/mp200375x (2012).
- 180 Ugurlucan, M. *et al.* Carotid endarterectomy using a "home-constructed" shunt for patients intolerant to cross-clamping. *Surgery Today* **45**, 284-289, doi:10.1007/s00595-014-0896-2 (2015).
- 181 Spanos, K., Tzorbatozoglou, I., Lazari, P., Maras, D. & Giannoukas, A. D. Carotid artery plaque echomorphology and its association with histopathologic characteristics. *Journal of Vascular Surgery* **68**, 1772-1780, doi:10.1016/j.jvs.2018.01.068 (2018).
- 182 Jiang, B. H., He, D. M., Zhang, L. W. & Ye, M. Risk prediction of cerebrovascular events with carotid plaque magnetic resonance analysis: A meta-analysis. *Journal of Neuroradiology* **46**, 117-123, doi:10.1016/j.neurad.2018.05.003 (2019).
- 183 Lara, M. J., Ros, E., Sierra, M., Dorransoro, C. & Aguilar, J. Composition and Genesis of Calcium Deposits in Atheroma Plaques. *Ultrastructural Pathology* **38**, 167-177, doi:10.3109/01913123.2013.829149 (2014).
- 184 Sionkowska, A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. *Progress in Polymer Science* **36**, 1254-1276, doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.05.003 (2011).
- 185 Laurent, T. C. The chemistry, biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives - Introduction. *Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and Its Derivatives* **72**, 1-2 (1998).
- 186 Shimojo, A. A. M., Pires, A. M. B., Lichy, R. & Santana, M. H. A. The Performance of Crosslinking with Divinyl Sulfone as Controlled by the Interplay Between the Chemical Modification and Conformation of Hyaluronic Acid. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **26**, 506-512, doi:10.5935/0103-5053.20150003 (2015).

- 187 Kogan, G., Soltés, L., Stern, R. & Gemeiner, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters* **29**, 17-25, doi:10.1007/s10529-006-9219-z (2007).
- 188 Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P. & Kolar, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina* **53**, 397-411, doi:10.17221/1930-vetmed (2008).
- 189 Schante, C. E., Zuber, G., Herlin, C. & Vandamme, T. F. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* **85**, 469-489, doi:10.1016/j.carbpol.2011.03.019 (2011).
- 190 Khunmanee, S., Jeong, Y. & Park, H. Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications. *Journal of Tissue Engineering* **8**, doi:10.1177/2041731417726464 (2017).
- 191 Sahiner, N. & Ja, X. Q. One-step synthesis of hyaluronic acid-based (sub)micron hydrogel particles: Process optimization and preliminary characterization. *Turkish Journal of Chemistry* **32**, 397-409 (2008).
- 192 Ahmed, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research* **6**, 105-121, doi:10.1016/j.jare.2013.07.006 (2015).
- 193 Collins, M. N. & Birkinshaw, C. Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **19**, 3335-3343, doi:10.1007/s10856-008-3476-4 (2008).
- 194 Bibette, J., Calderon, F. L. & Poulin, P. Emulsions: basic principles. *Reports on Progress in Physics* **62**, 969-1033, doi:10.1088/0034-4885/62/6/203 (1999).
- 195 Oh, J. K., Lee, D. I. & Park, J. M. Biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery applications. *Progress in Polymer Science* **34**, 1261-1282, doi:10.1016/j.progpolymsci.2009.08.001 (2009).
- 196 Pasqui, D., De Cagna, M. & Barbucci, R. Polysaccharide-Based Hydrogels: The Key Role of Water in Affecting Mechanical Properties. *Polymers* **4**, 1517-1534, doi:10.3390/polym4031517 (2012).
- 197 Sierra-Martin, B. & Fernandez-Barbero, A. Multifunctional hybrid nanogels for theranostic applications. *Soft Matter* **11**, 8205-8216, doi:10.1039/c5sm01789k (2015).
- 198 Raemdonck, K., Demeester, J. & De Smedt, S. Advanced nanogel engineering for drug delivery. *Soft Matter* **5**, 707-715, doi:10.1039/b811923f (2009).
- 199 Pal, K., Banthia, A. K. & Majumdar, D. K. Polymeric Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications. *Designed Monomers and Polymers* **12**, 197-220, doi:10.1163/156855509x436030 (2009).
- 200 Davies, G. L., Kramberger, I. & Davis, J. J. Environmentally responsive MRI contrast agents. *Chemical Communications* **49**, 9704-9721, doi:10.1039/c3cc44268c (2013).



- 201 Vazquez, B., Roman, J. S., Peniche, C. & Cohen, M. E. Polymeric hydrophilic hydrogels with flexible hydrophobic chains. Control of the hydration and interactions with water molecules. *Macromolecules* **30**, 8440-8446, doi:10.1021/ma970863l (1997).
- 202 Xu, X., Jha, A. K., Harrington, D. A., Farach-Carson, M. C. & Jia, X. Q. Hyaluronic acid-based hydrogels: from a natural polysaccharide to complex networks. *Soft Matter* **8**, 3280-3294, doi:10.1039/c2sm06463d (2012).
- 203 Collins, M. N. & Birkinshaw, C. Investigation of the swelling behavior of crosslinked hyaluronic acid films and hydrogels produced using homogeneous reactions. *Journal of Applied Polymer Science* **109**, 923-931, doi:10.1002/app.27631 (2008).
- 204 Quignard, F., Di Renzo, F. & Guibal, E. From Natural Polysaccharides to Materials for Catalysis, Adsorption, and Remediation. *Carbohydrates in Sustainable Development I: Renewable Resources for Chemistry and Biotechnology* **294**, 165-197, doi:10.1007/128\_2010\_56 (2010).
- 205 Oh, E. J. *et al.* Control of the molecular degradation of hyaluronic acid hydrogels for tissue augmentation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **86A**, 685-693, doi:10.1002/jbm.a.31681 (2008).
- 206 Lipinski, M. J., Frias, J. C. & Fayad, Z. A. Advances in detection and characterization of atherosclerosis using contrast agents targeting the macrophage. *Journal of Nuclear Cardiology* **13**, 699-709, doi:10.1016/j.nuclcard.2006.07.004 (2006).
- 207 Lipinski, M. J. *et al.* Macrophage-Specific Lipid-Based Nanoparticles Improve Cardiac Magnetic Resonance Detection and Characterization of Human Atherosclerosis. *Jacc-Cardiovascular Imaging* **2**, 637-647, doi:10.1016/j.jcmg.2008.08.009 (2009).
- 208 Lipinski, M. J. *et al.* MRI to detect atherosclerosis with gadolinium-containing immunomicelles targeting the macrophage scavenger receptor. *Magnetic Resonance in Medicine* **56**, 601-610, doi:10.1002/mrm.20995 (2006).
- 209 Kunjathoor, V. V. *et al.* Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 49982-49988, doi:10.1074/jbc.M209649200 (2002).
- 210 Guy, E., Kuchibhotla, S., Silverstein, R. & Febbraio, M. Continued inhibition of atherosclerotic lesion development in long term Western diet fed CD36 degrees/apoE degrees mice. *Atherosclerosis* **192**, 123-130, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.07.015 (2007).
- 211 Febbraio, M. *et al.* Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *Journal of Clinical Investigation* **105**, 1049-1056, doi:10.1172/jci9259 (2000).

- 212 Febbraio, M., Guy, E. & Silverstein, R. L. Stem cell transplantation reveals that absence of macrophage CD36 is protective against atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **24**, 2333-2338, doi:10.1161/01.atv.0000148007.06370.68 (2004).
- 213 Russo, M., Bevilacqua, P., Netti, P. A. & Torino, E. Commentary on "A Microfluidic Platform to Design Crosslinked Hyaluronic Acid Nanoparticles (cHANPs) for Enhanced MRI". *Molecular Imaging* **16**, doi:10.1177/1536012117706237 (2017).
- 214 Briley-Saebo, K. C. *et al.* Gadolinium mixed-micelles: Effect of the amphiphile on in vitro and in vivo efficacy in apolipoprotein E knockout mouse models of atherosclerosis. *Magnetic Resonance in Medicine* **56**, 1336-1346, doi:10.1002/mrm.21094 (2006).
- 215 Ren, W. X. *et al.* Recent development of biotin conjugation in biological imaging, sensing, and target delivery. *Chemical Communications* **51**, 10403-10418, doi:10.1039/c5cc03075g (2015).