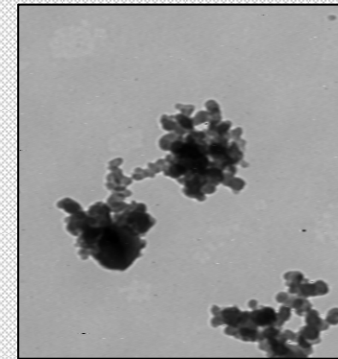
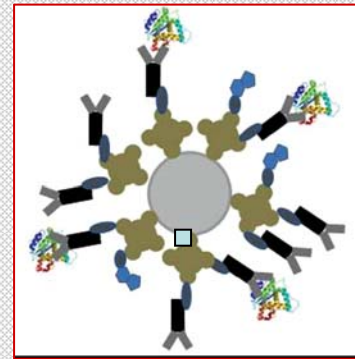
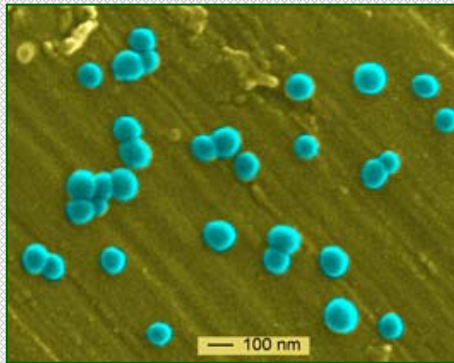


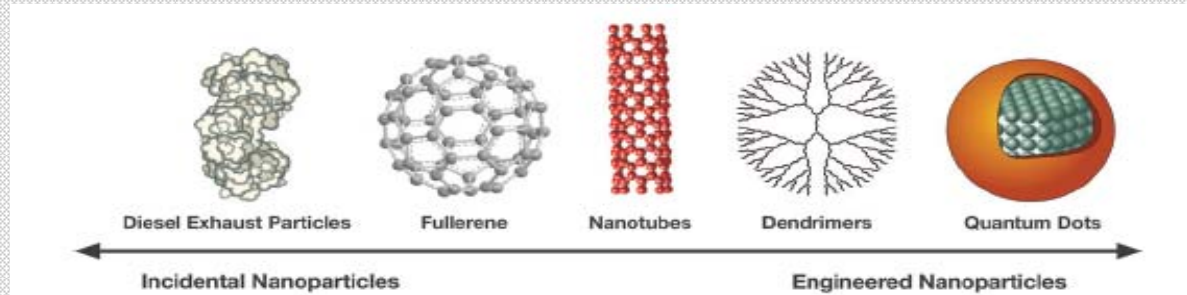
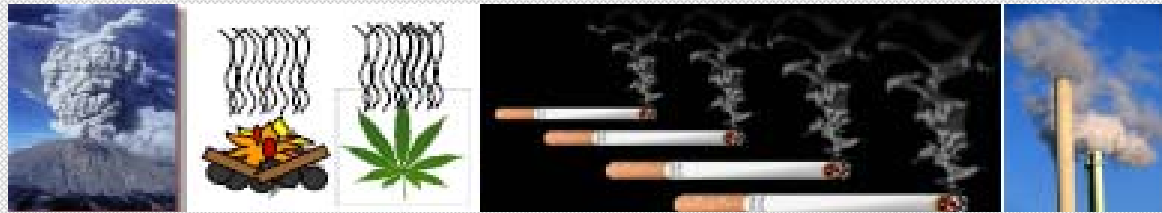
Nanoparticelle in ambiente e rischio per la salute



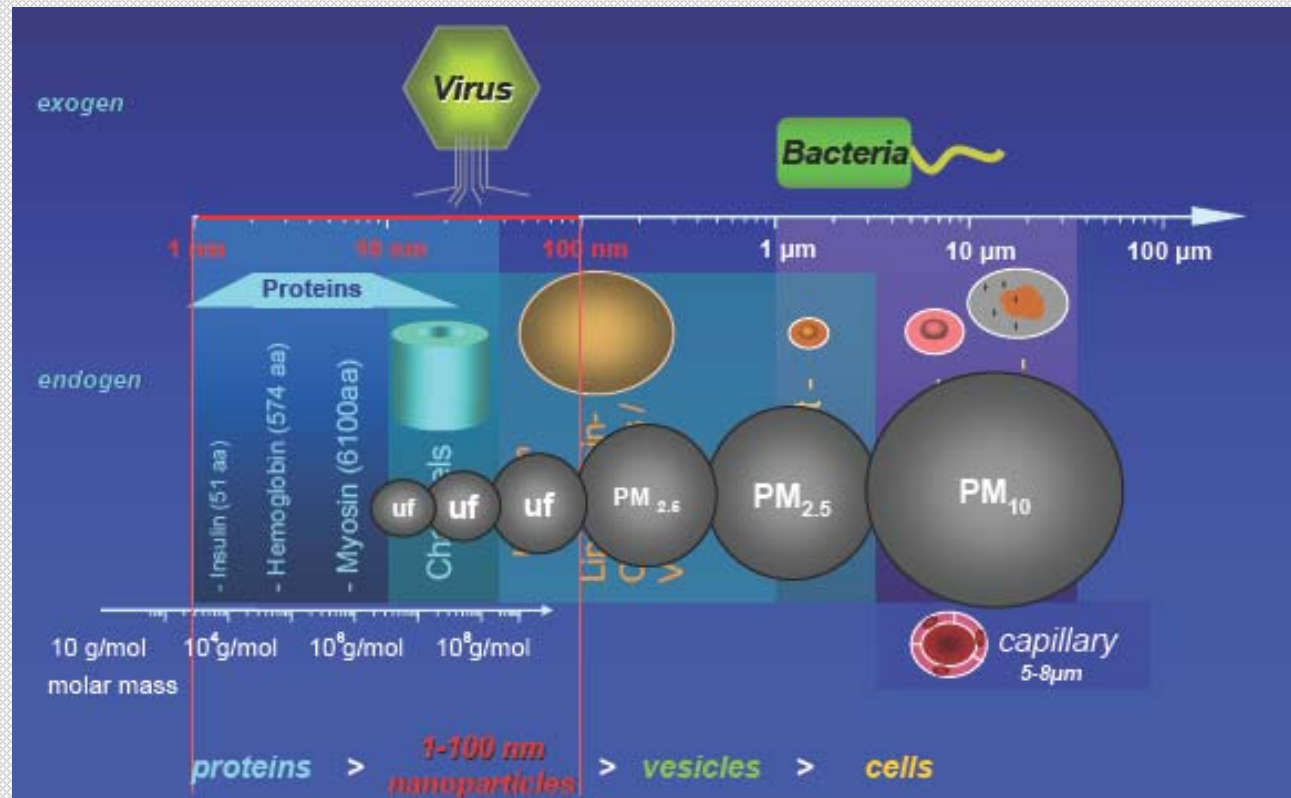
Marina Camatini

NPs: caratterizzazione e interazione biologica
Milano 24 marzo 2010










evolution history



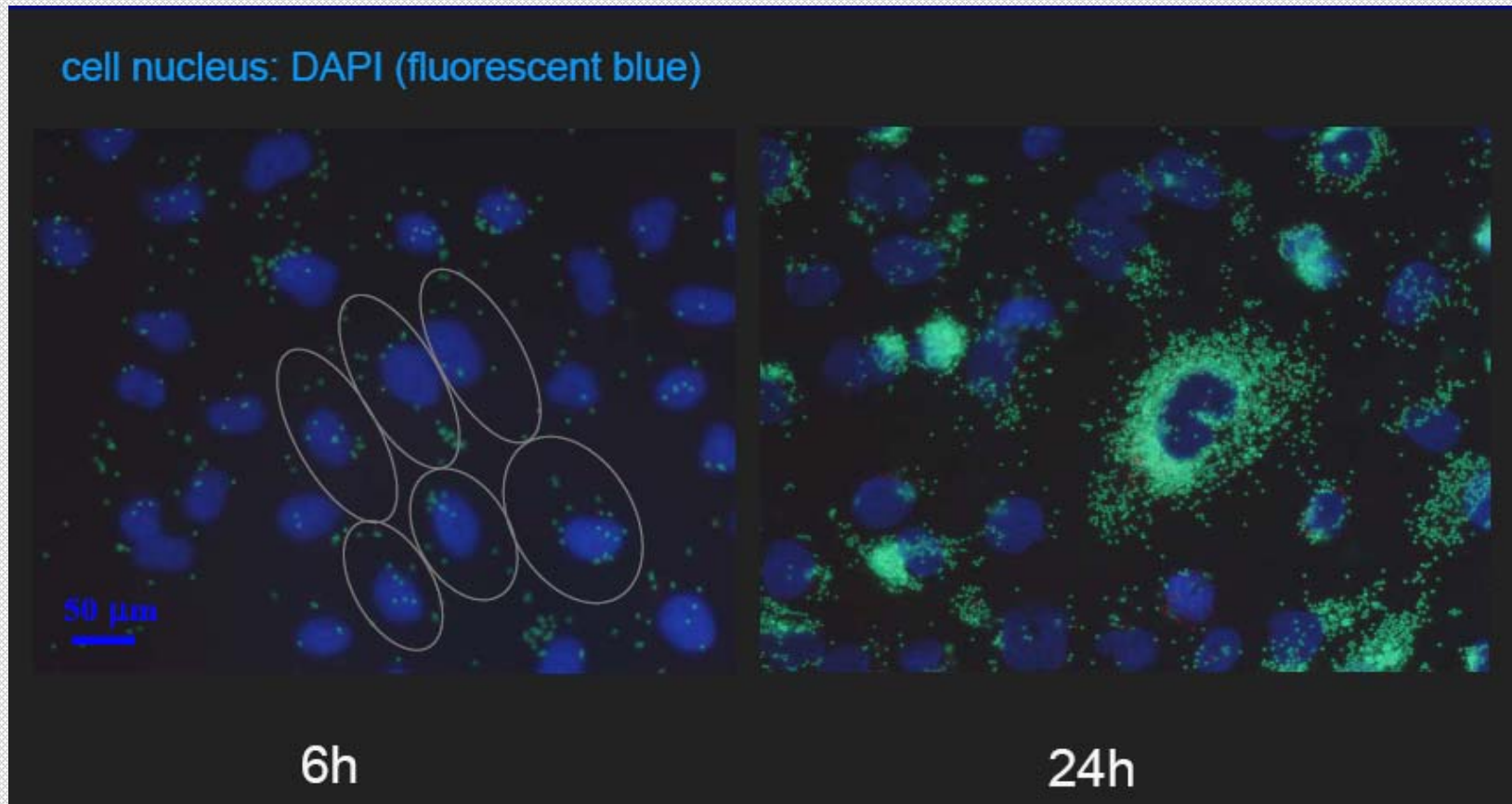
dimensions



Schema di presentazione

- Tecniche di osservazione 
- Particelle ambientali e di sintesi 
- Ingresso e distribuzione (Inalazione) 
- Modelli in vitro  e in vivo 
- Risposte cellulari 
- Esempi di valutazione di effetti di UFP 
- Esempi di valutazione di effetti di NPs
- Valutazioni in atto 
- Normative in atto 

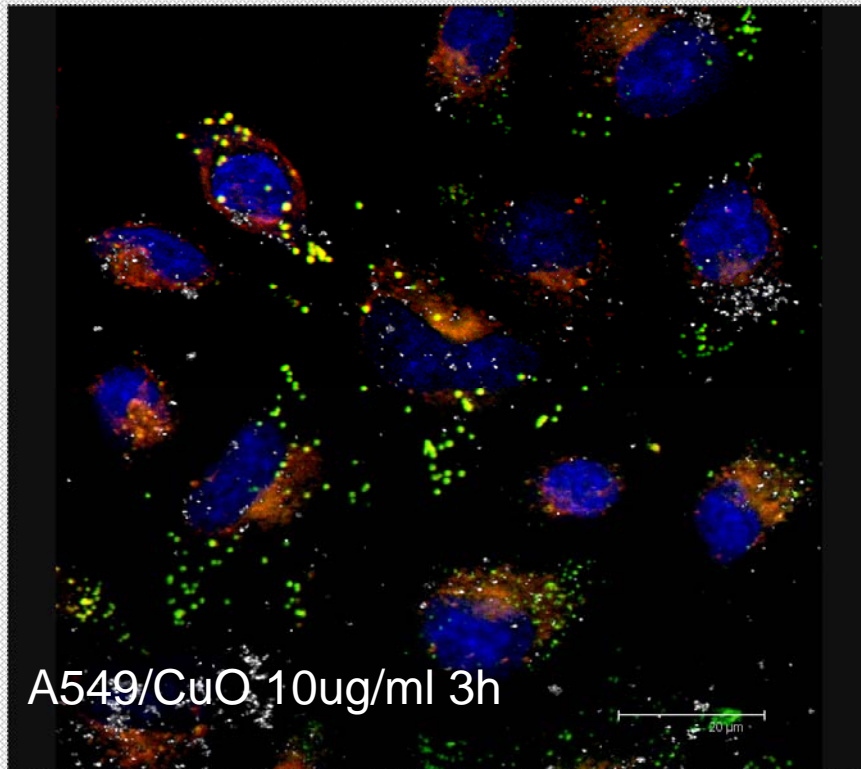
NPs: tecniche di osservazione



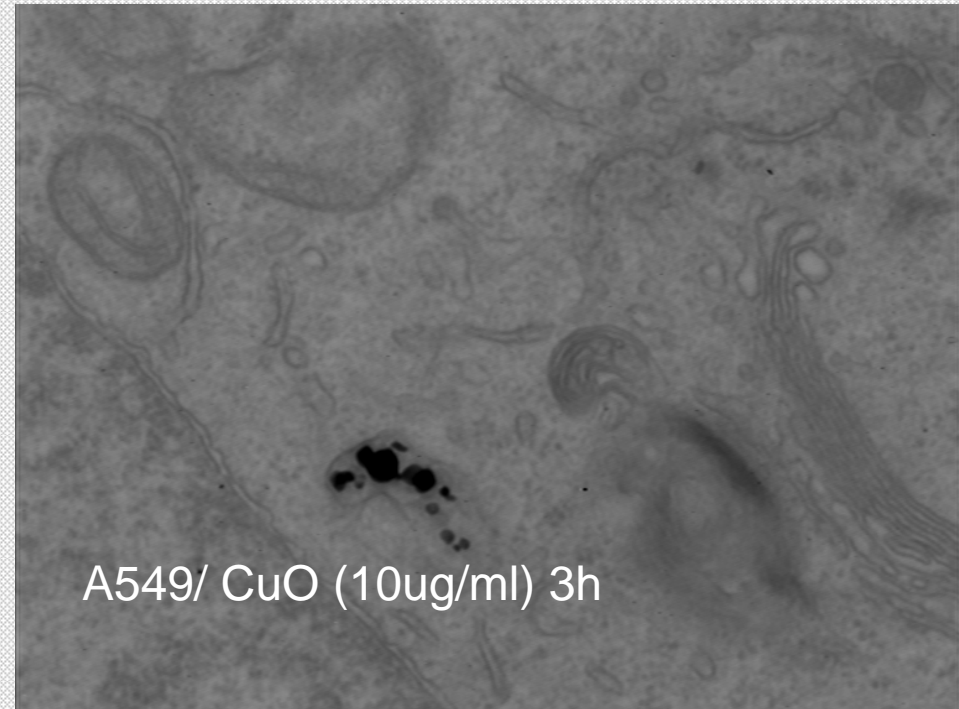
24 nm polystyrene beads with green fluorescence in NIH 3T3 fibroblasts

Furong unpublished

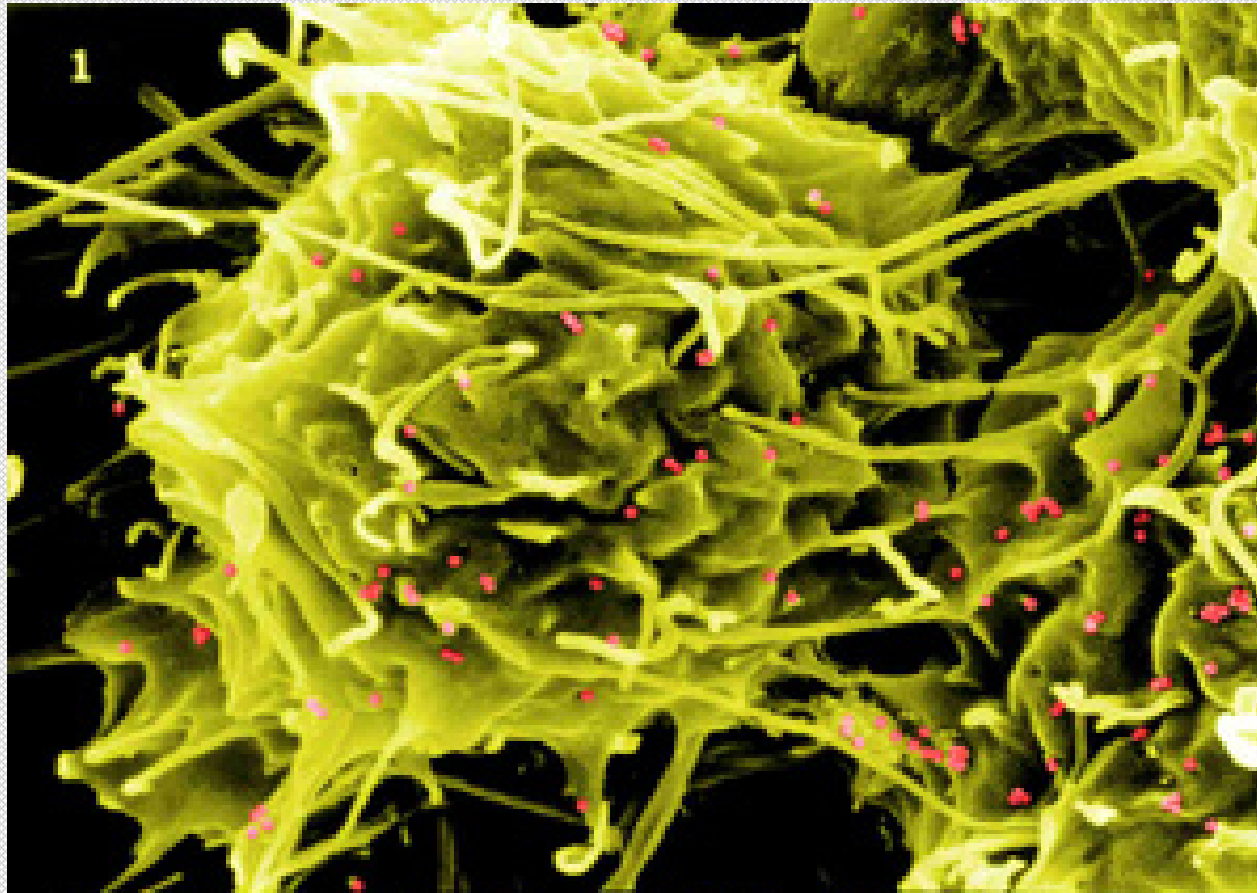
Localizzazione di NPs



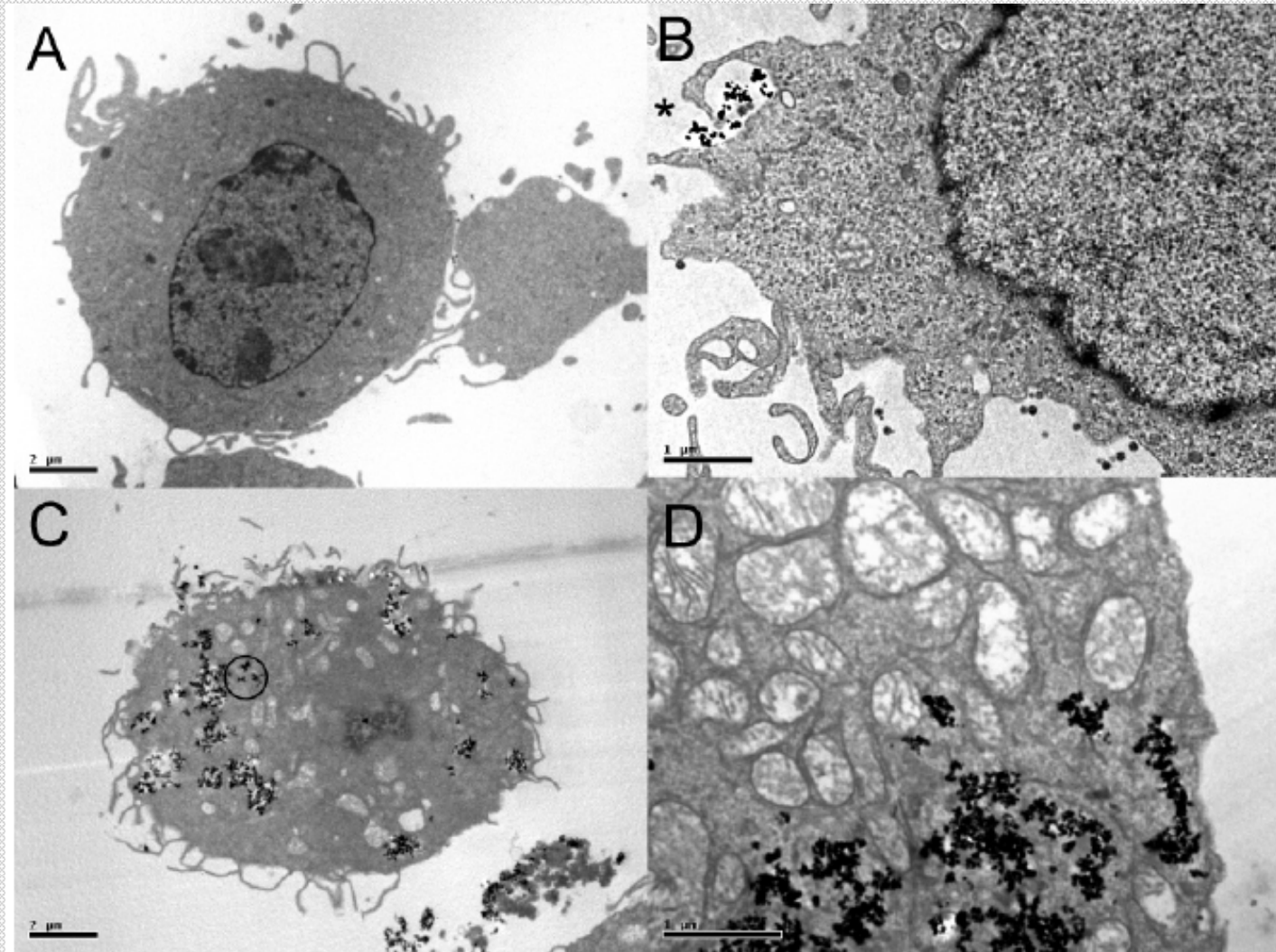
Confocal microscopy



TEM

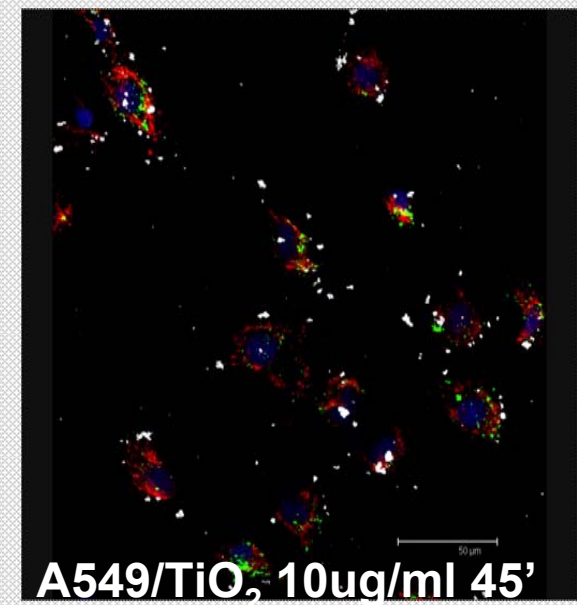
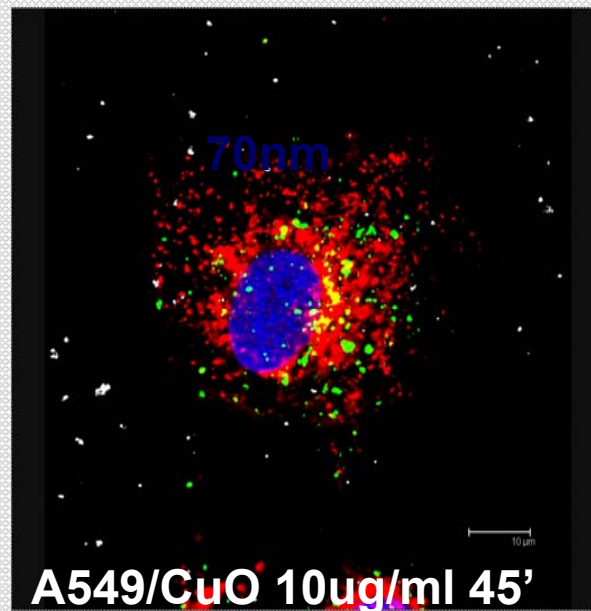
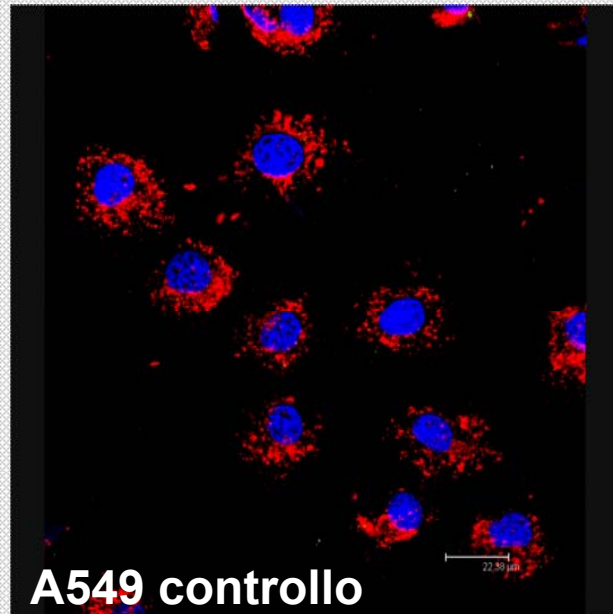


SEM of a macrophage (RAW 264.7) phagocytosing 70nm hematite particles. (Diabatè et al., 2004)



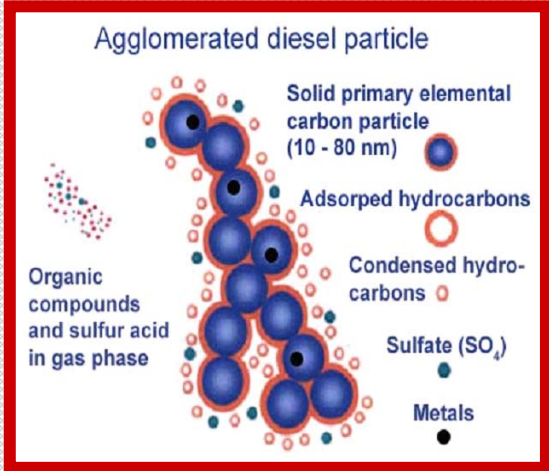
Immortalized Brain Microglia (BV2): treated with nanosize titanium dioxide. (Long et al. 2006)

Risposte cellulari (ROS) a NPs



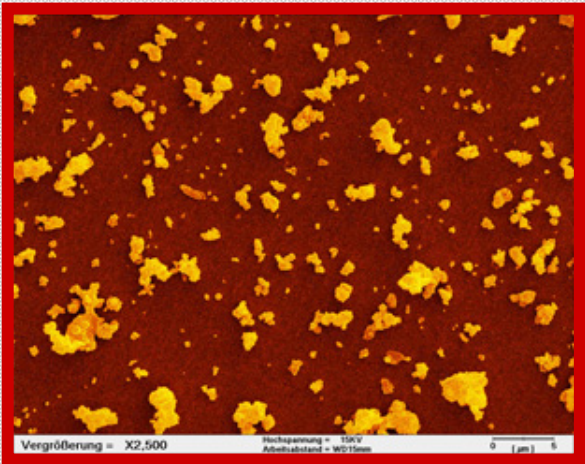
UFP NPs

UFP in genere contengono grande quantità di composti organici e metalli di transizione

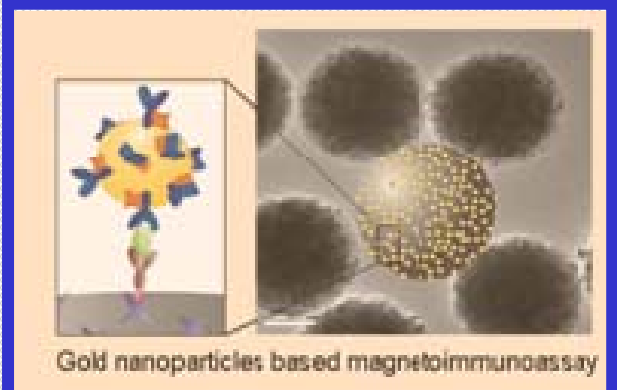
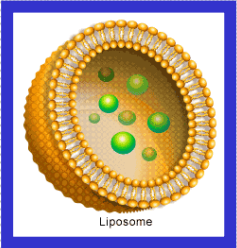
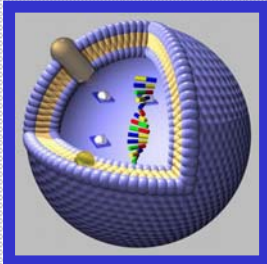
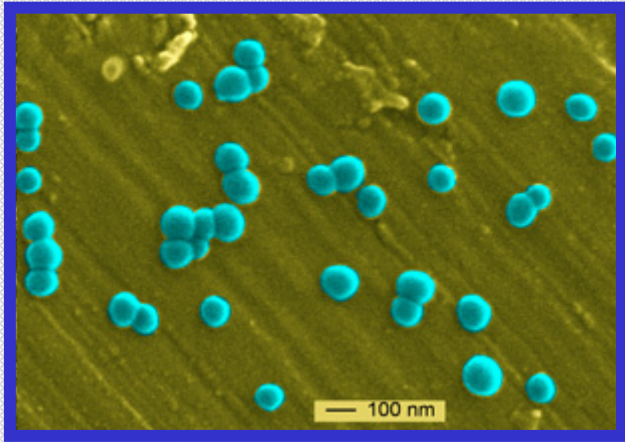


Carbonaceous NPs as Surrogates for Ambient PM

<p>PrintexG (30-60 nm)</p> <p>70 nm</p>	<p>DEP (18-30 nm)</p> <p>70 nm</p>	<p>Printex90 (12-17 nm)</p> <p>50 nm</p>
<p>SootH (8-16 nm)</p> <p>70 nm</p>	<p>SootL (8-14 nm)</p> <p>70 nm</p>	<p>UfCP (7-12 nm)</p> <p>50 nm</p>



NPs sono in genere uniformi in dimensione e composizione chimica

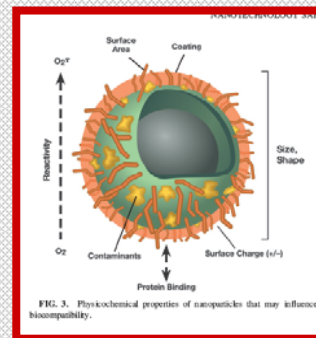


NPs ed effetti sulla salute

determinazione delle proprietà fisico-chimiche di NP

I metodi di valutazione sono:

- dati epidemiologici (medicina occupazionale)
- modelli animali (in vivo)
- colture cellulari (in vitro)

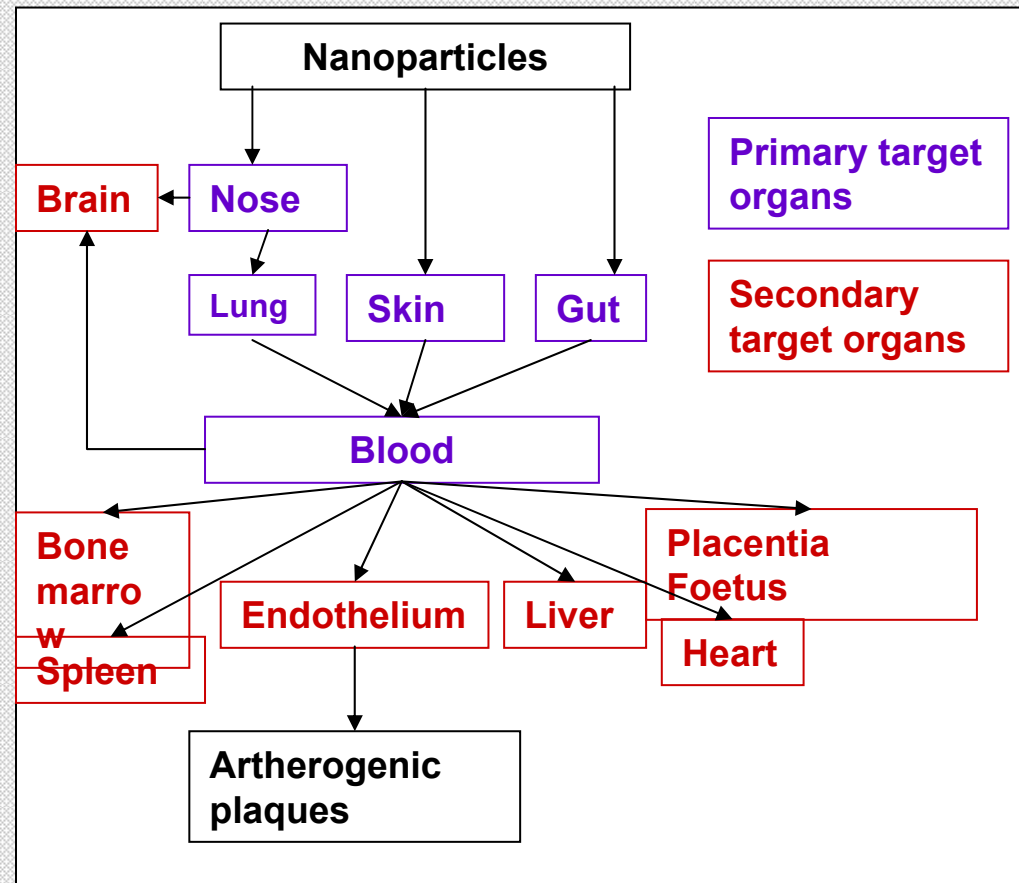
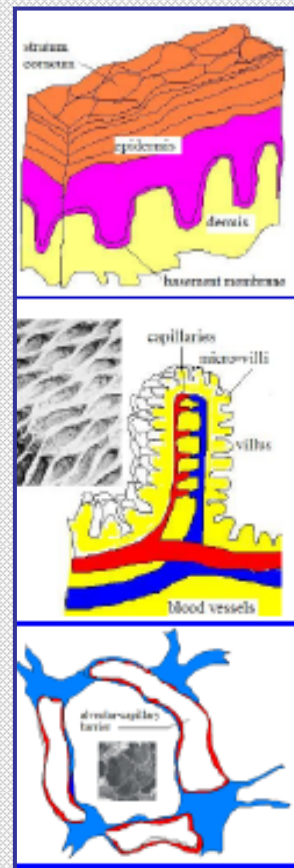
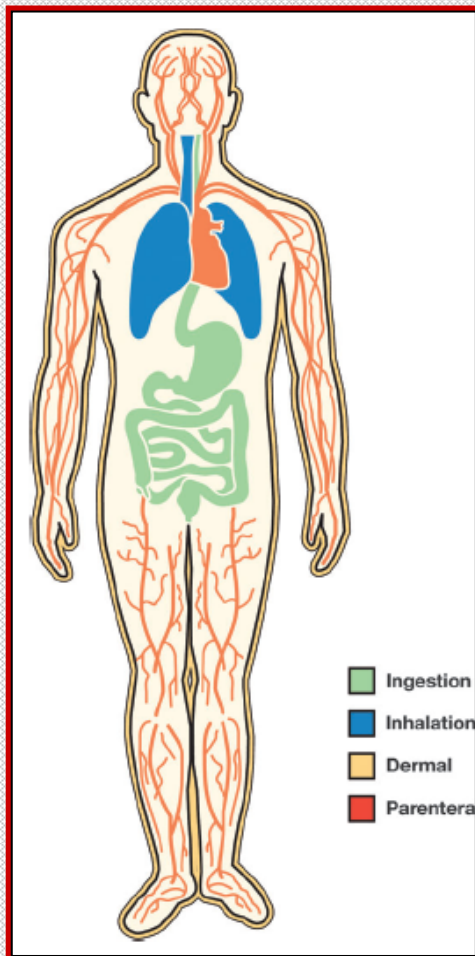


- morfologia
- dimensione
- superficie
- solubilità
- stato di aggregazione
- massa
- modificazioni superficie
- concentrazione
- volume

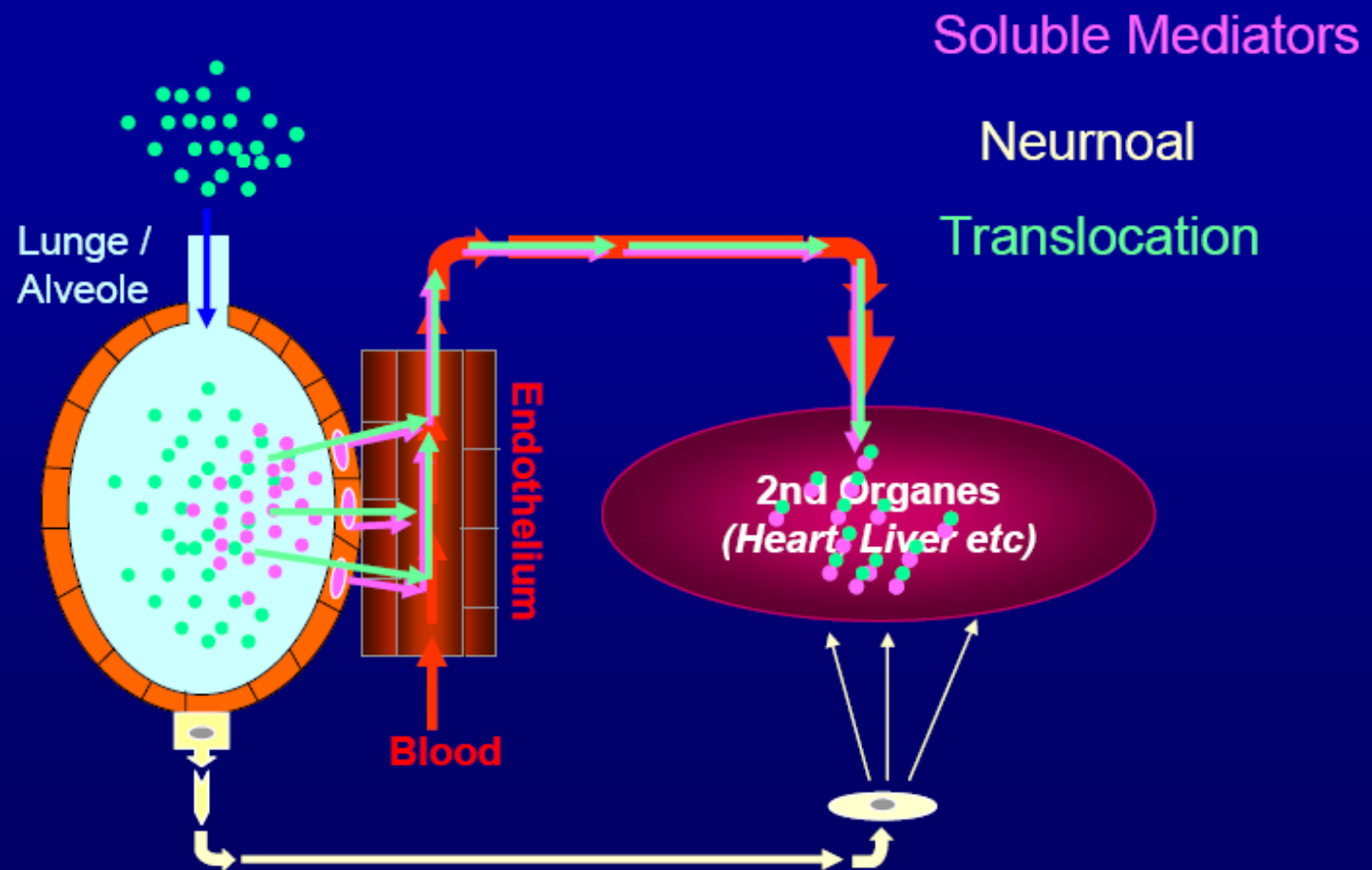
NPs: ingresso e distribuzione

modalità di accesso

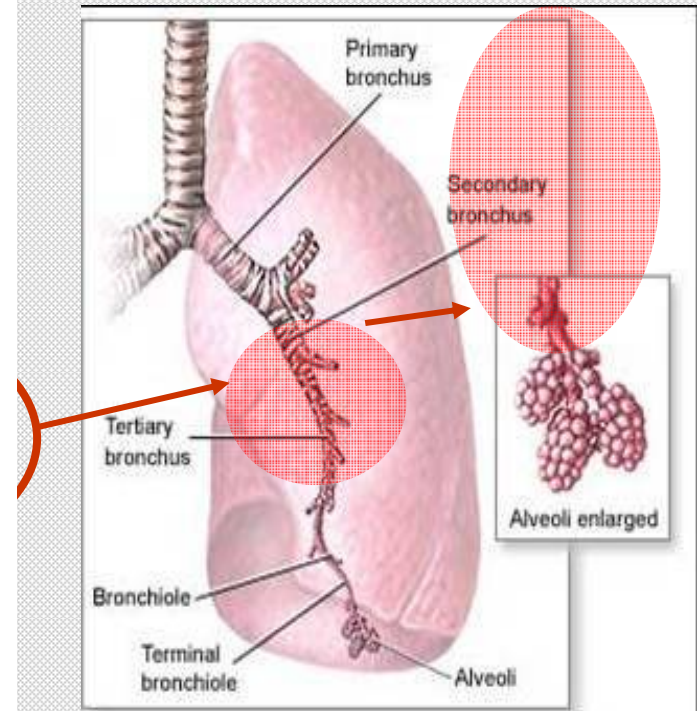
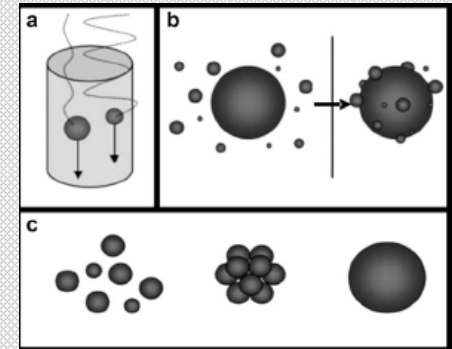
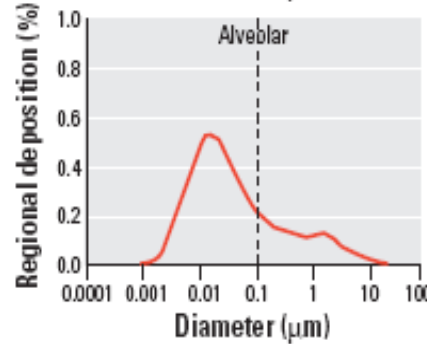
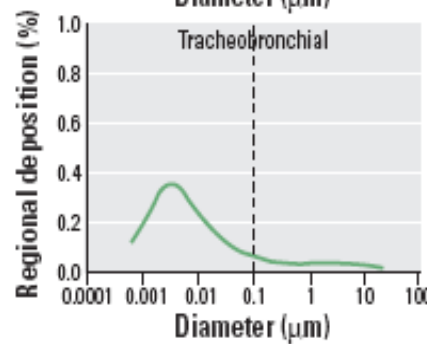
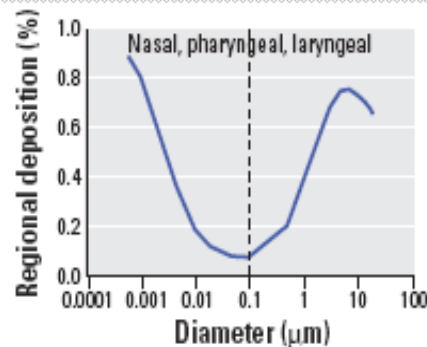
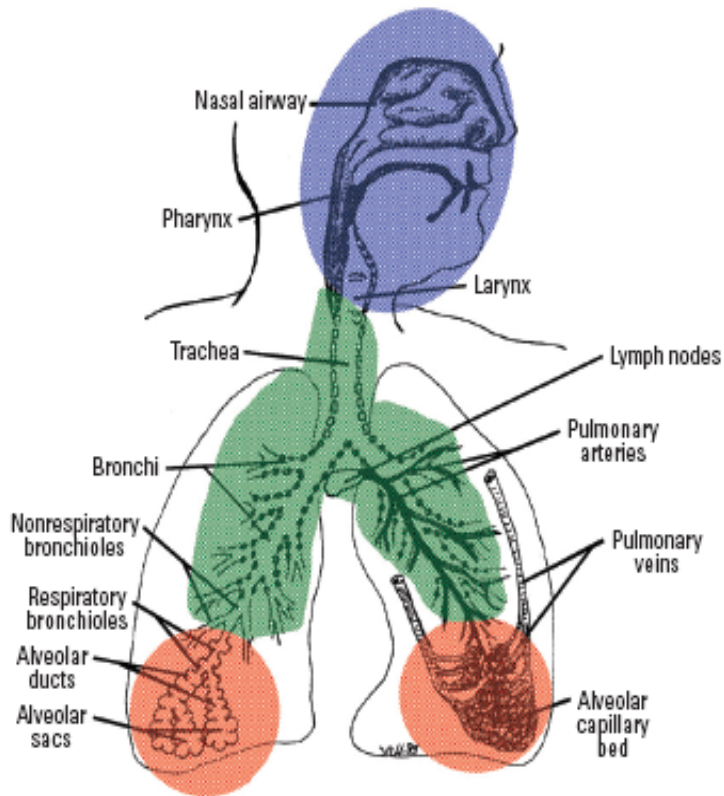
possibili traslocazioni



From the Lung to Secondary Target Organs?



Inalazione e deposizione

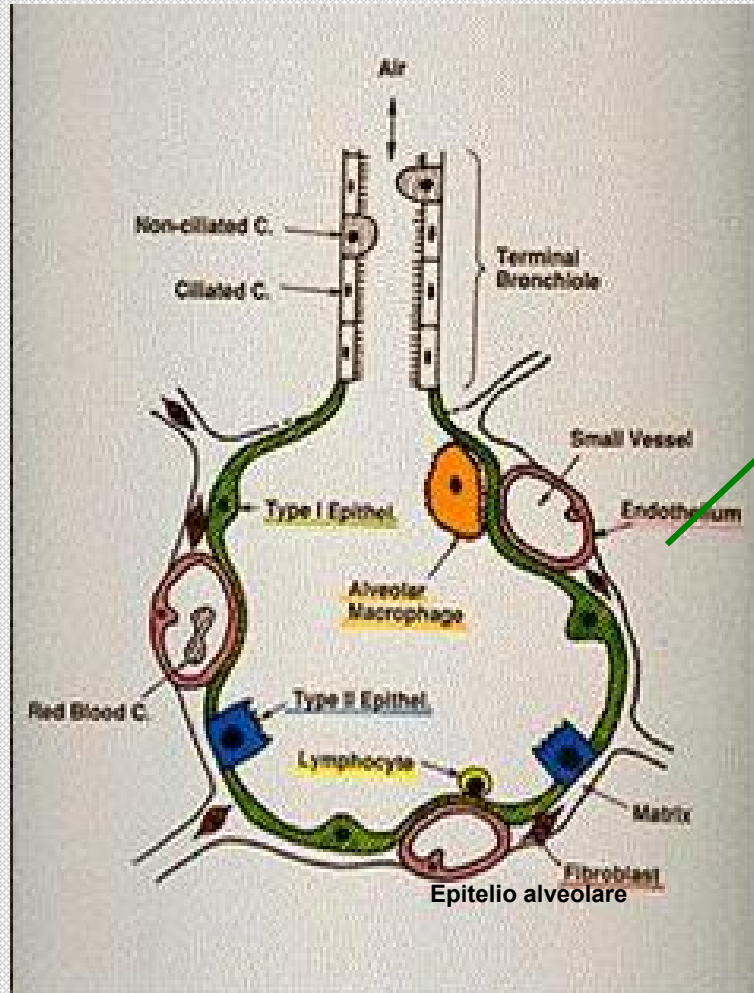


Una quantità significativa di particelle (0.01-100 μm) si deposita nei tre tratti dell'apparato respiratorio ; FP e UFP raggiungono l'epitelio alveolare. (Oberdörster, 2005)

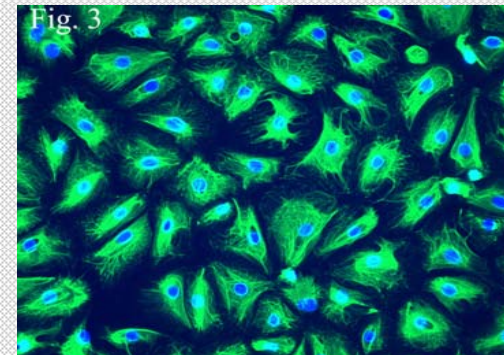
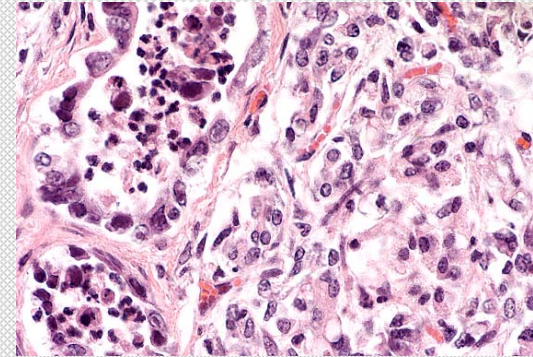
Valutazione di effetti con test in vitro?

- La validità dei test in vitro risulta limitata nel fornire risposte per l'esposizione in vivo, mentre le misure di citotossicità trovano una valida risposta in questi test, utili per una valutazione di pre-screening
- I test su singole linee cellulari non sempre spiegano i meccanismi molecolari coinvolti nelle risposte all'esposizione a NPs.
- Co-culture consentono di ottenere risposte integrate e confrontabili con quelle dei sistemi in vivo . Standardizzare questi sistemi come test di pre-screening di tossicità risulta quindi possibili.

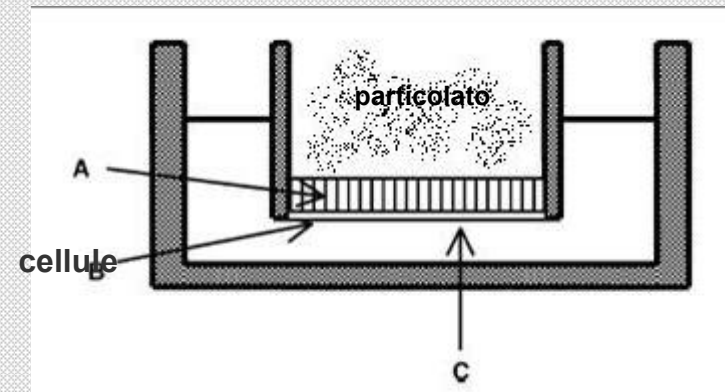
Valutazione di effetti di UFP su modelli *in vitro*



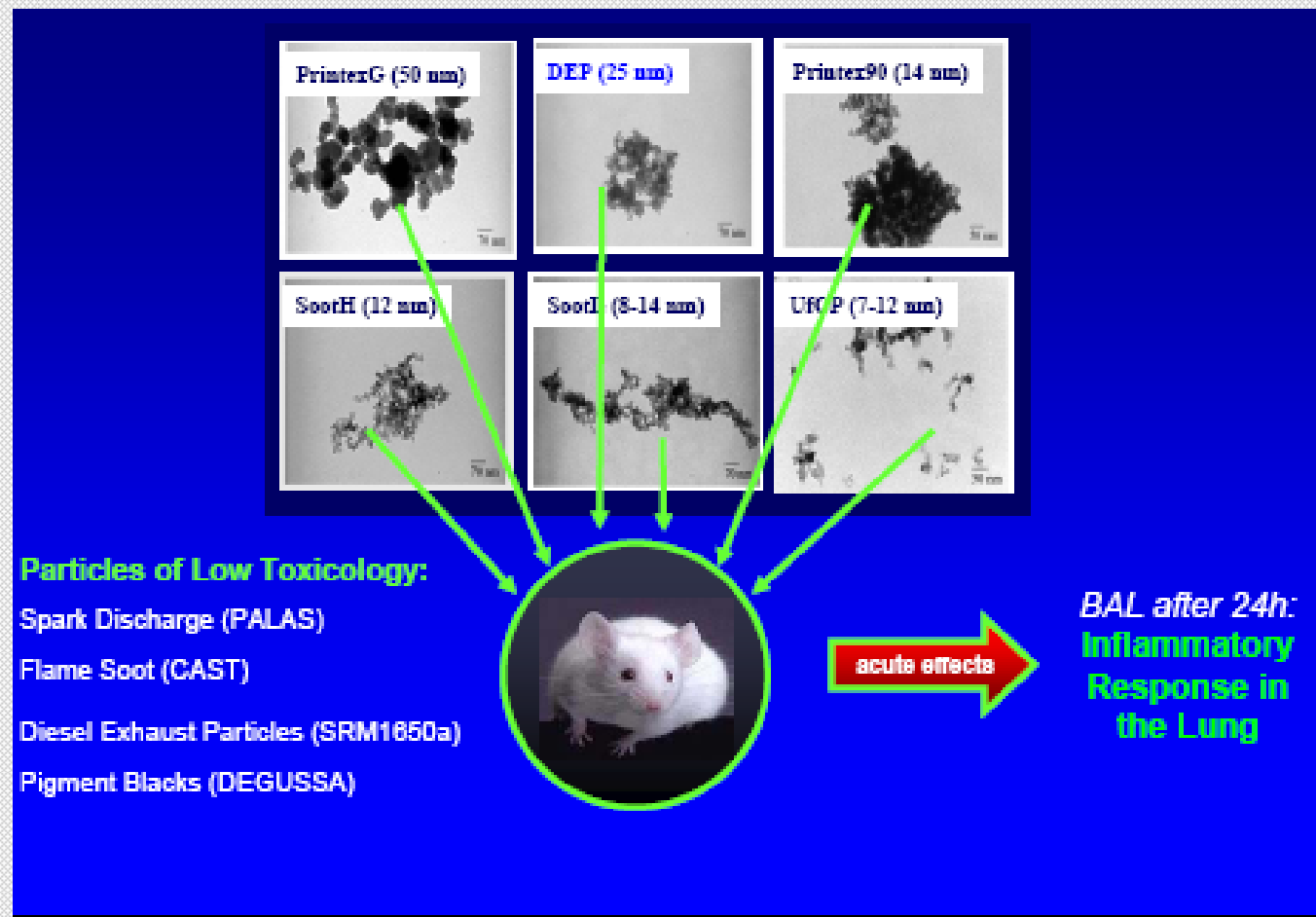
Epitelio alveolare



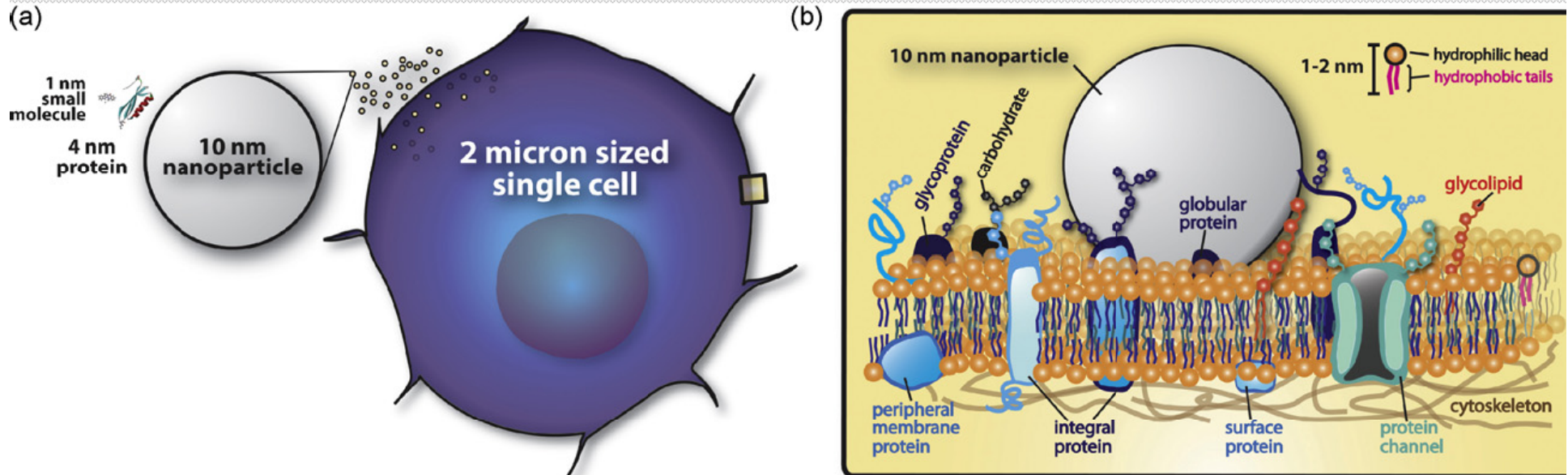
Linea cellulare A549



Valutazione di effetti di UFP su modelli *in vivo*

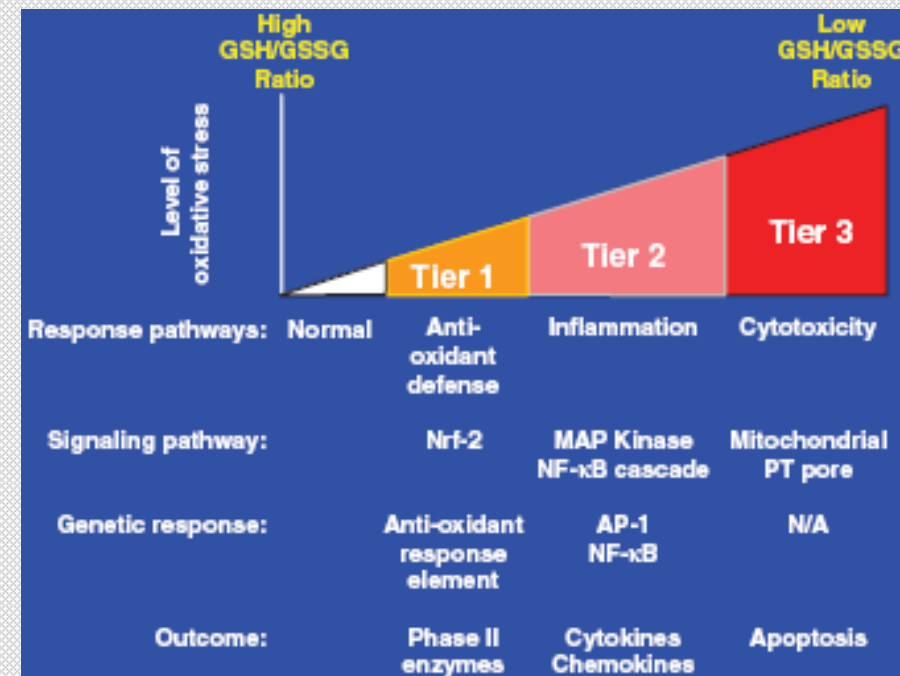
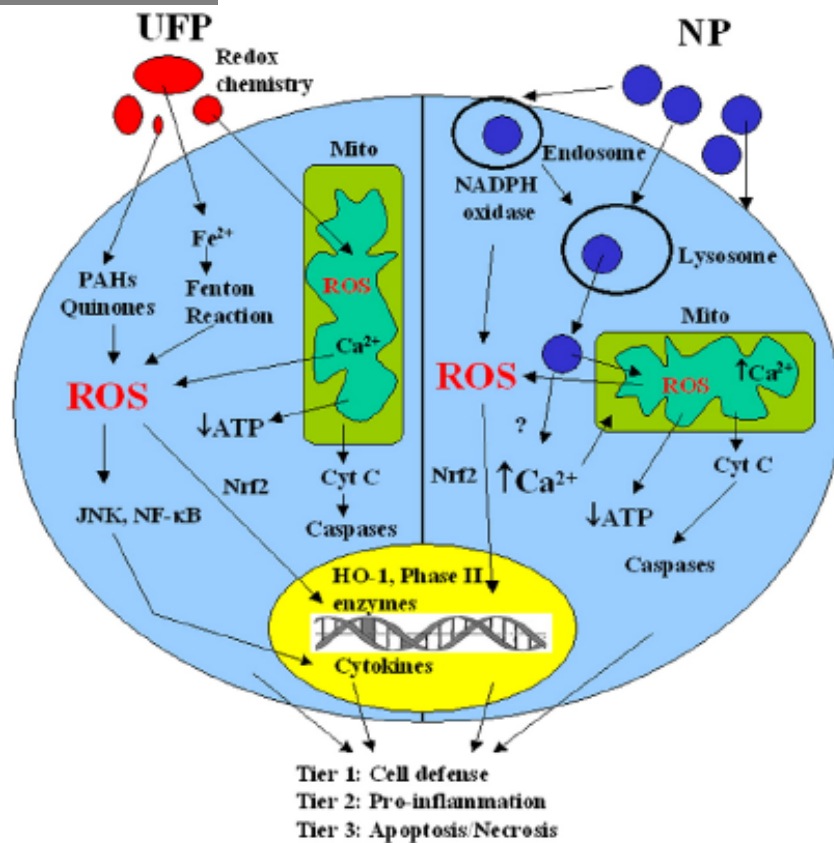


Interazioni particella-strutture molecolari



La dimensione di una NP confrontata con quella di una cellula di piccole dimensioni evidenzia il rapporto e l'interazione che può esserci tra una NP di 10nm e le molecole che formano una membrana plasmatica

UFP e NPs :meccanismi d'azione

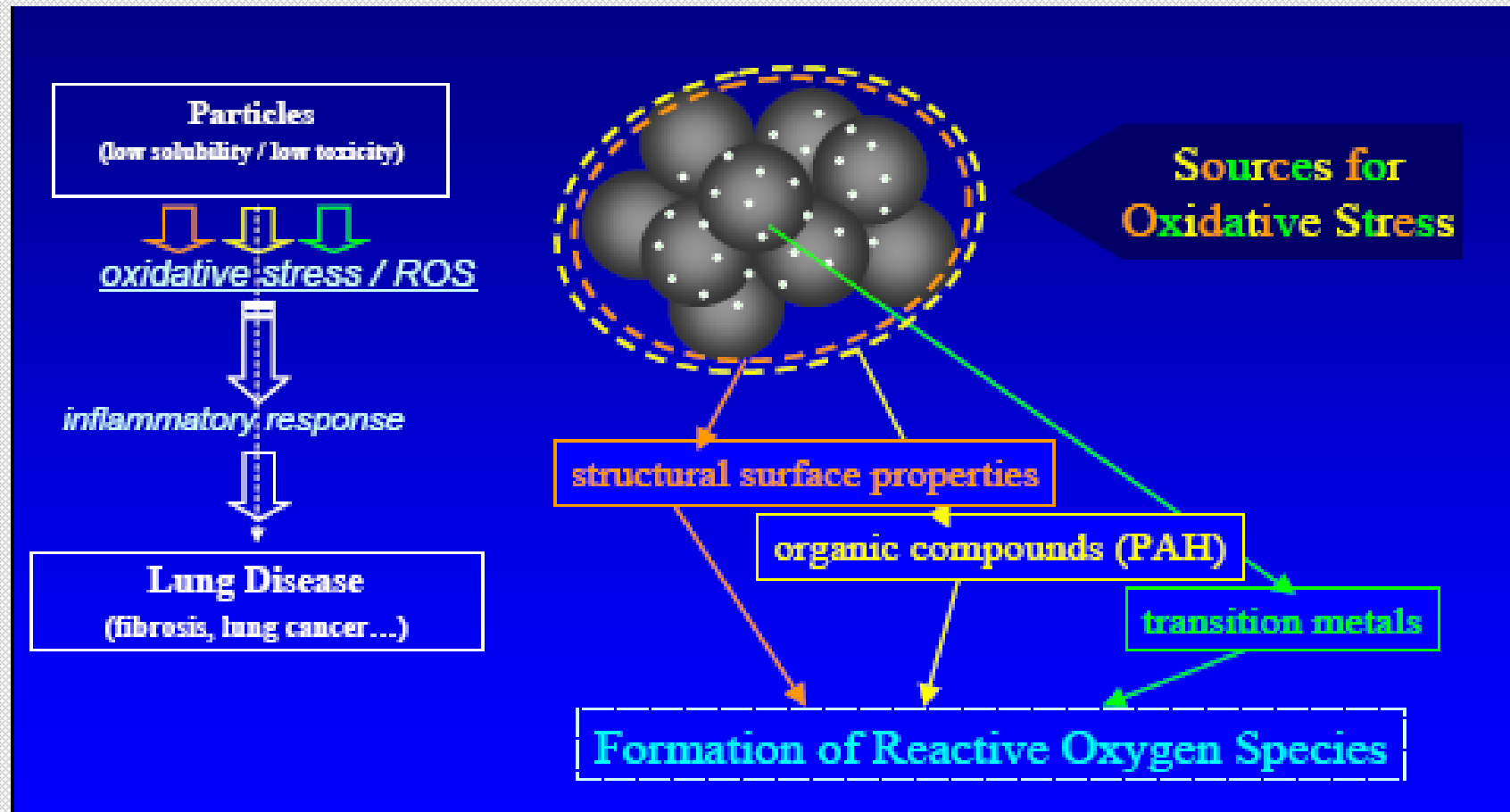


UFP che contengono composti organici (PAH e chinoni), metalli (Fe e Cu) possono generare ROS attraverso meccanismi redox sia all'esterno che all'interno delle cellule . UFP sono state evidenziate nei mitocondri.

NPs sono uniformi in dimensione e composizione chimica . Vengono internalizzate per endocitosi (clatrina-dipendente, mediata da caveole etc). Si formano endosomi, e si producono ROS mediante la formazione di NADPH oxidase. In seguito a diversi processi di fusione, gli endosomi si uniscono ai lisosomi, poi possono interagire con mitocondri producendo ancora ROS , e la cellula può progredire nei livelli di risposta.

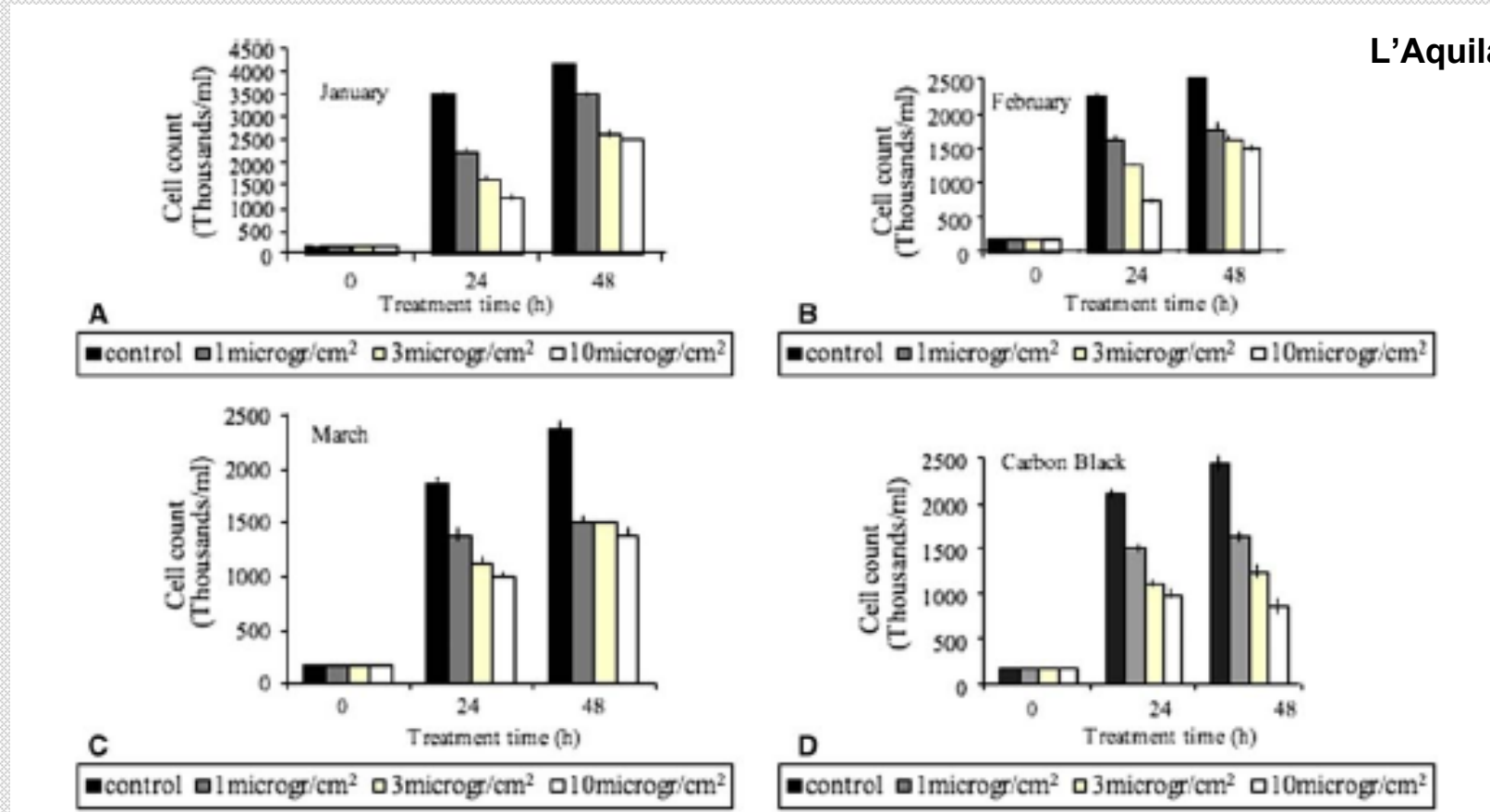
Le cellule possono rispondere con enzimi di difesa (Tier1) HO-1,SOD GST,catalasi; attivazione di MAPK e NF-κB (Tier2) con induzione di risposte proinfiammatorie e espressione di citochine; con modificazione di permeabilità mitocondriale , e del trasporto di elettroni (Tier3) dando apoptosi o necrosi . A.Nell et al., SCIENCE , 311 2006

Composizione chimica di UFP



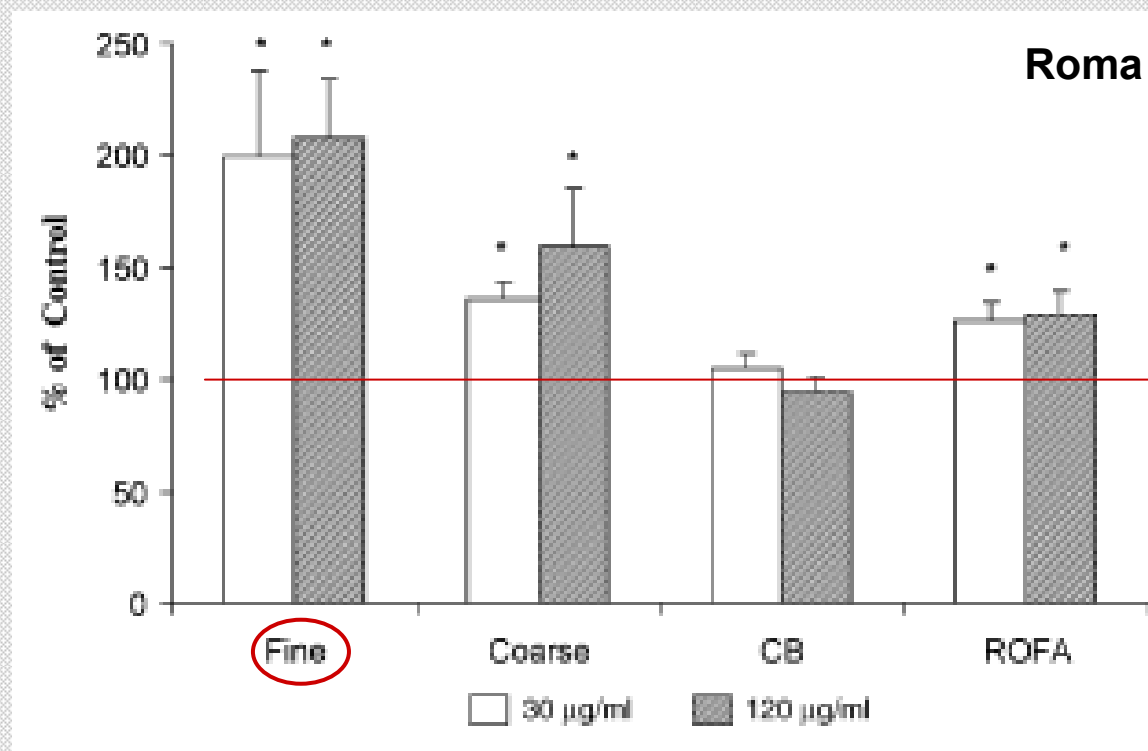
FP, CB: effect on cell proliferation

L'Aquila



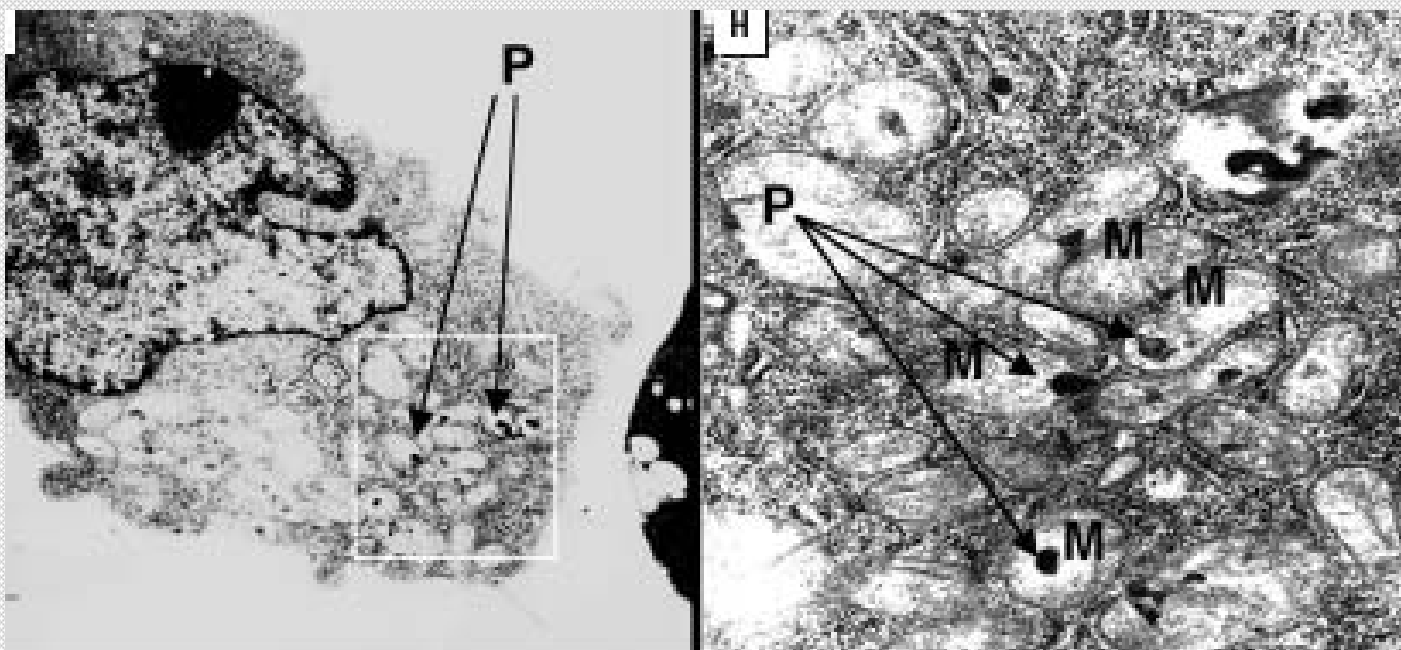
Cell proliferation of fine particulate collected in January, February, March, respectively; (D) growth after cell treatment with carbon black. Both the fine particulate and carbon black reduced the proliferation of RAW- 264.7 cells in a dose-dependent manner (Fig. 2A–D. (Poma et al., 2006)

FP, CB and macrophages

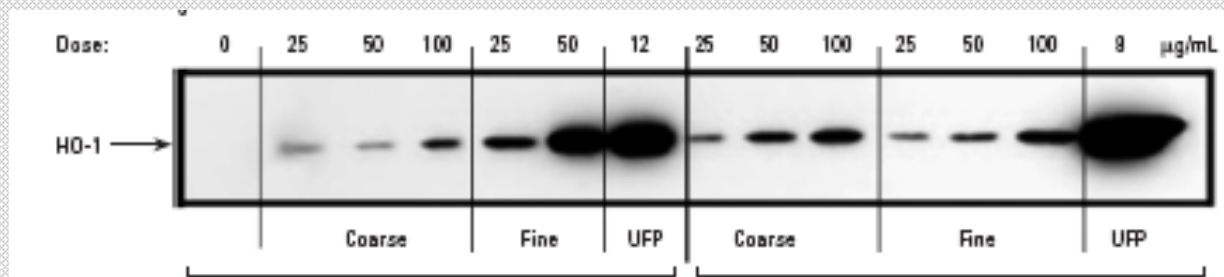


Effect of FP, CB, ROFA, fine (2.1 a 0.1µm) and coarse (2.1 a 10µm) urban particles on [3H]Arachidonic Acid release in RAW 264.7 cells. Cells were pre-labeled with [3H]AA and then incubated for 5 h with the particles (30 and 120µg/mL). The radioactivity released by untreated cells was taken as 100%. Values with asterisks are significantly different from corresponding control cells. (Pozzi et al., 2005)

UFP ambient particles

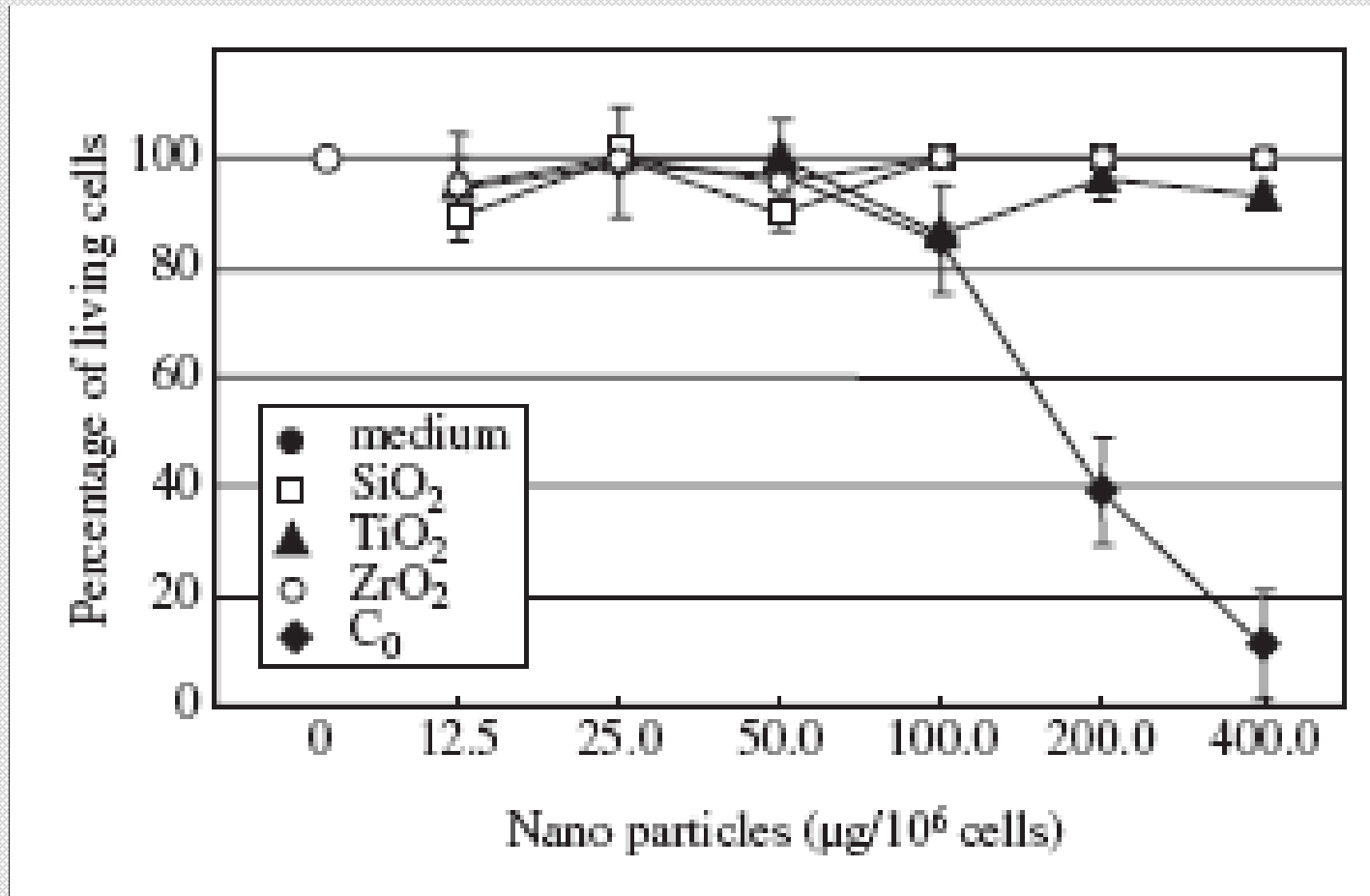


RAW 264.7 cells (murine macrophage) exposed to UFPs. Notice damage to cristae as well as the presence of particles (P) inside mitochondria



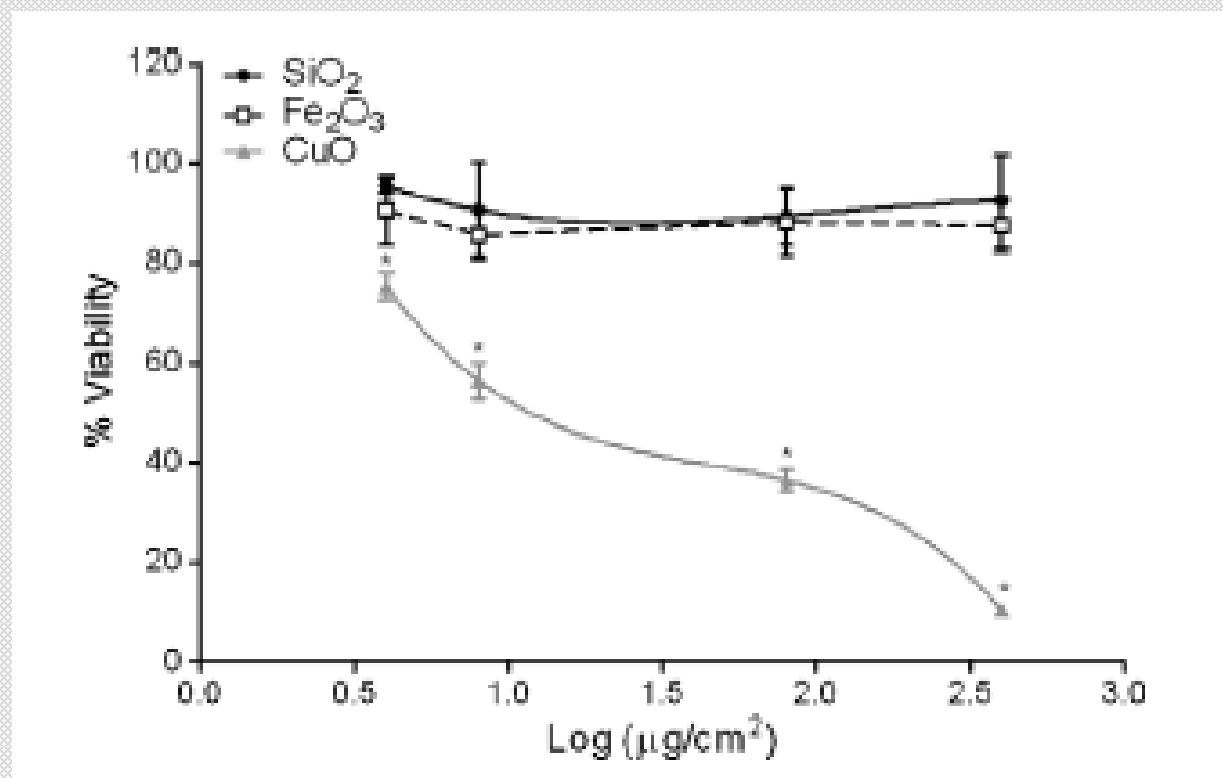
HO-1 expression in cells exposed for 16 hr.

NPs di materiali ceramici e metalli



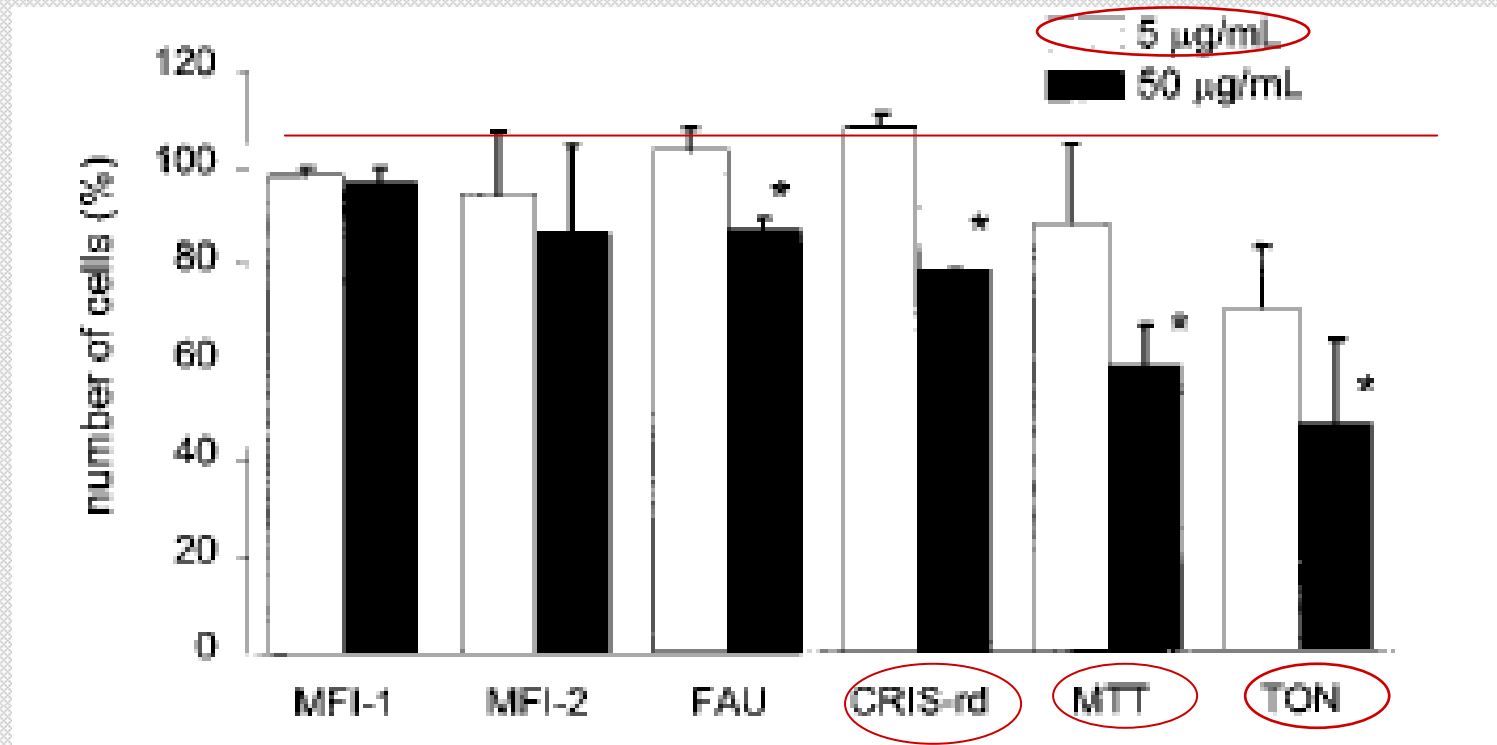
Toxicity of different nanoparticles on human macrophages (U-937 cells). The XTT assay, measures metabolically active cells, after 24 h of exposure to nanoparticles. Based on the results of cell proliferation/survival assays, (Lucarelli et al., 2004)

NPs e vitalità cellulare



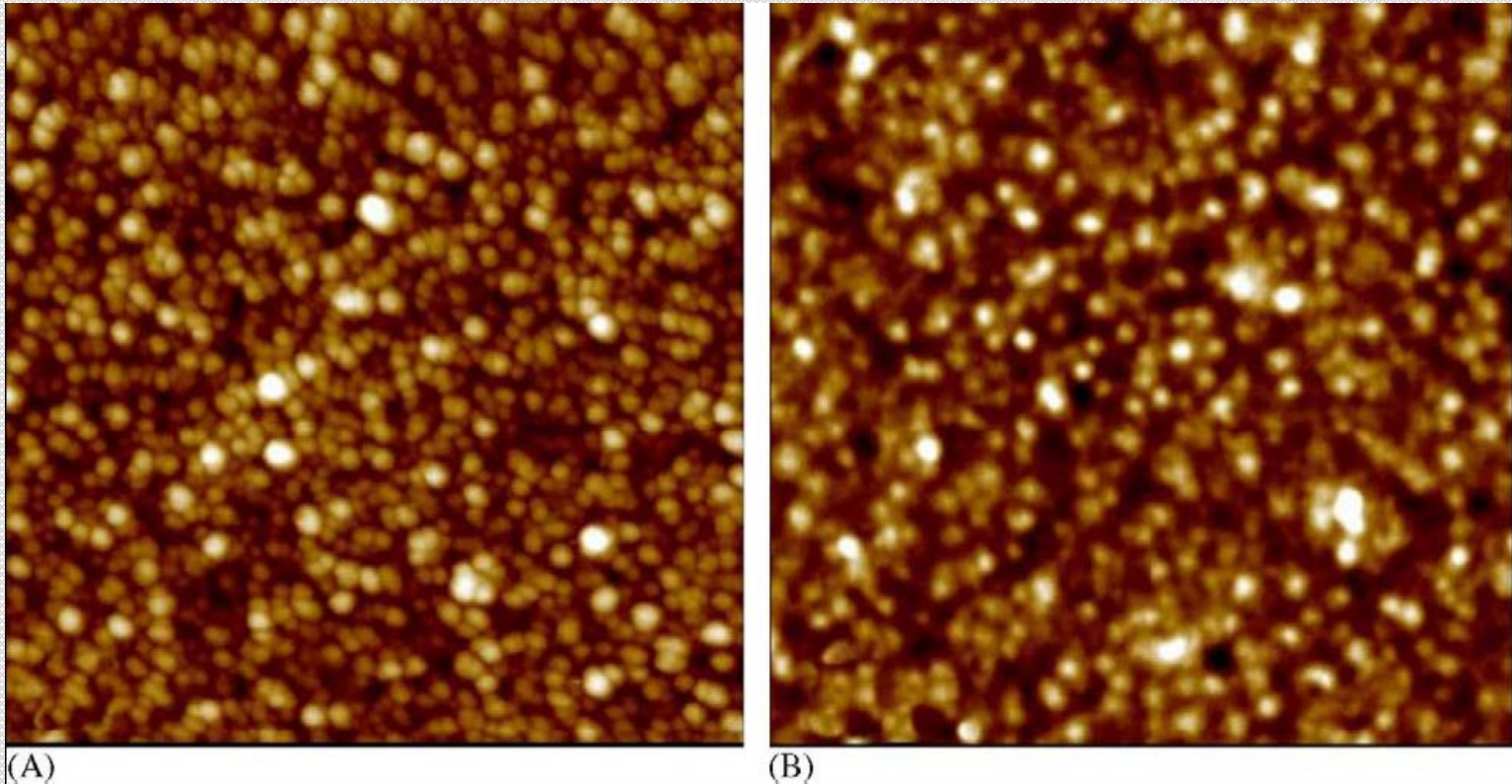
Human epithelial (HEp-2) cells were incubated with increasing doses of SiO₂, Fe₂O₃ and CuO nanoparticles. Data were normalized to cell viability of cells treated with medium only (100% viable) or cells treated with 0.1% saponin (0% viable). CuO significantly reduced cell viability as compared to vehicle only treated cells..

Silica dust: confronto tra diverse forme



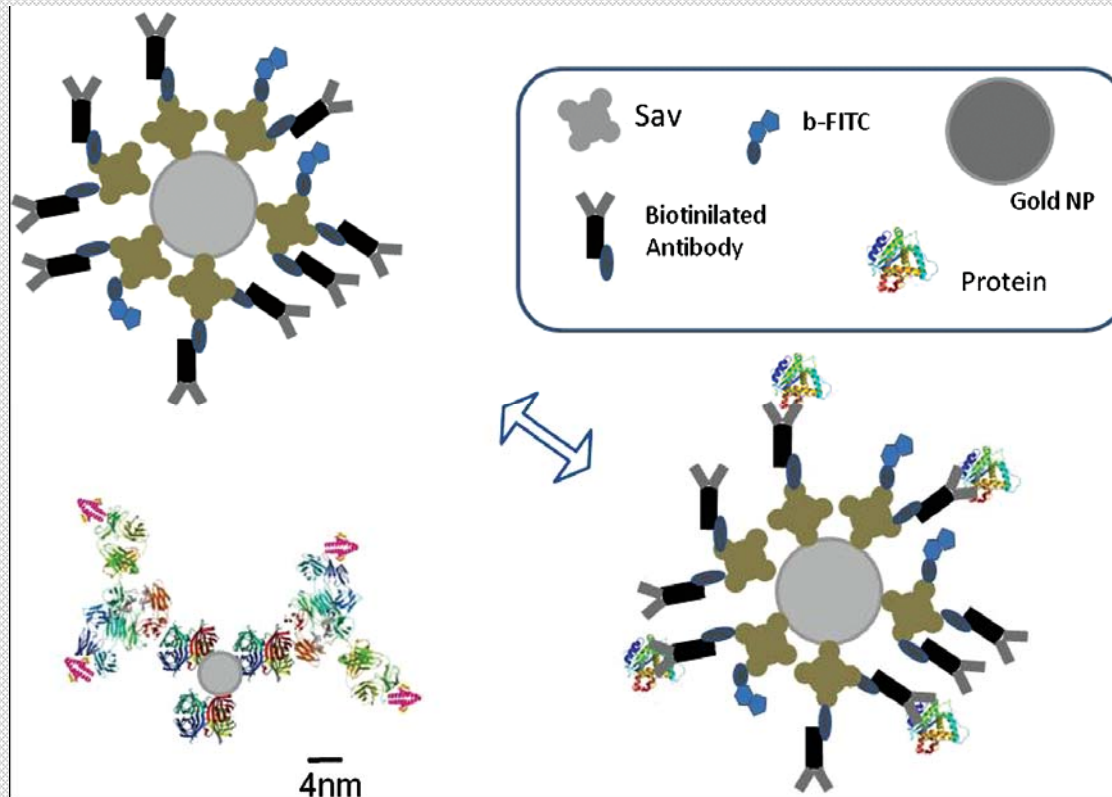
Cytotoxicity to the monocyte-macrophage cell line (J774) of four porosil crystalline silica dusts (MFI, FAU, TON, and MTT) assessed as the number of surviving cells after incubation 24 h at of 5 and 50 ug/mL. Values are expressed as a percentage of cells with respect to control (no dust). At the higher dose, FAU, CRIS-rd, MTT, and TON are significantly cytotoxic ($p < 0.05$). (Fenoglio et.al, 2000)

Utilizzo di nanomateriali per ricerca



(A) AFM image of a cluster-assembled TiO₂ film deposited on a glass coverslip (500500nm², vertical scale 15 nm). The granular nature of the film at the nanoscale is evident, which stems from the ballistic aggregation of precursor clusters stacking on the underlying glass surface during the deposition from the supersonic beam. (B) AFM image of a gelatin-coated glass coverslip (500500nm², vertical scale 3 nm).

Utilizzo di NPs per ricerca *in vitro*

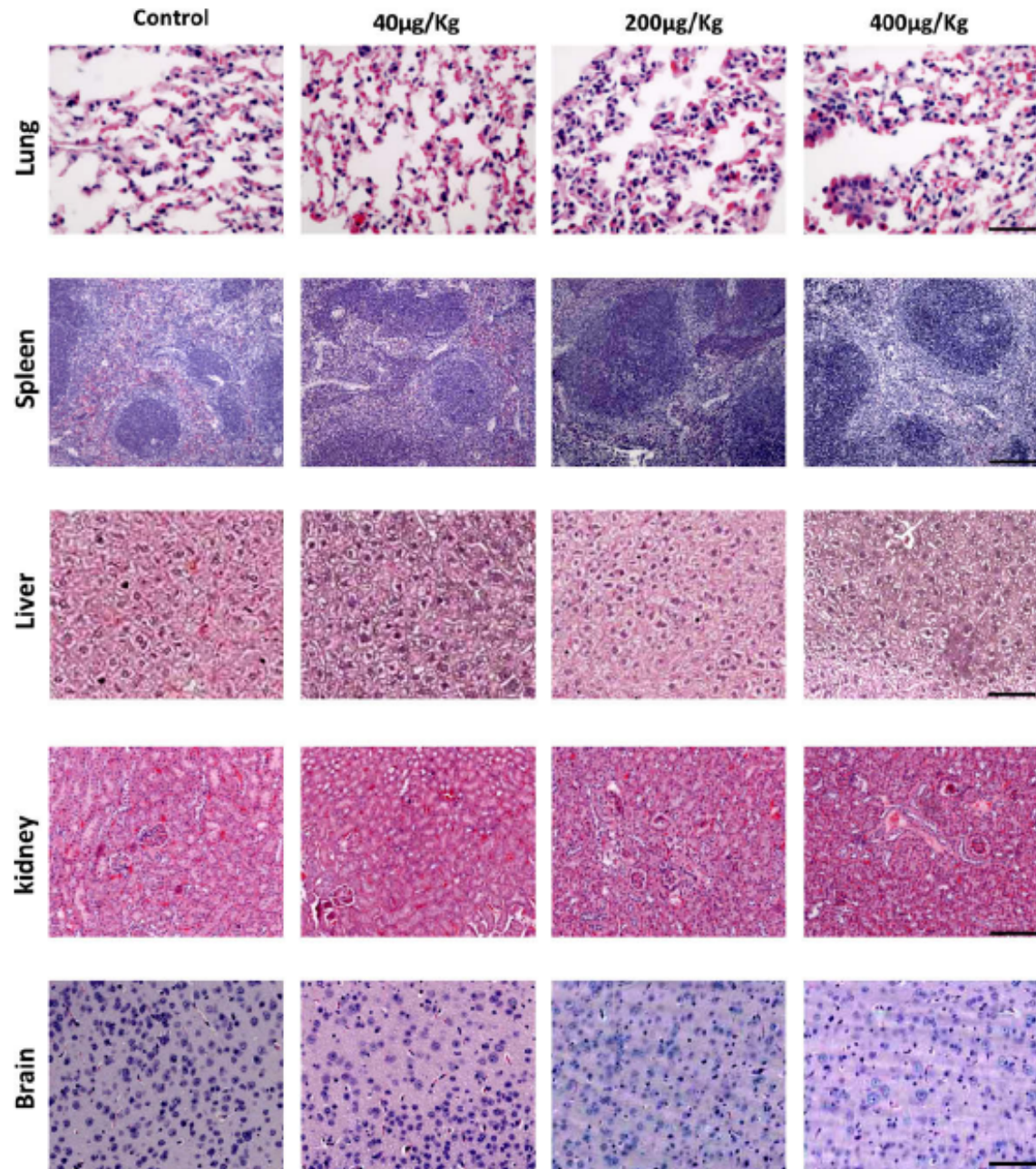


L'individuazione di p53 è ritenuto marker di una precoce diagnosi di cancro. Lo studio di un costrutto fatto da NP di oro (5-10nm) legate a specifici anti-p53 e FITC risulta promettente nella titolazione di estratti totali di cellule p53+o - fatte reagire con l'anticorpo anti-p53 legato ad oro colloidale. Questo costrutto ha promettenti applicazioni di screening in vivo

Utilizzo di NPs per ricerca *in vivo*

Topi con iniezione intra peritoneale di NP oro . Sono state utilizzate le tecniche GFAAS (spettrofotometria ad assorbimento atomico e ICP-MS

GNPs hanno proprietà che le rendono utilizzabili per applicazioni biomediche., per la loro stabilità e abilità di legare peptidi o proteine



Utilizzo di NPs per ricerca *in vivo*

Instillazione intratracheale di topi
con NP di silice amorfa

Histology of lungs from
mice following the
intratracheal instillation of
UFASs.

A control

B.-E instillation 10 mg/kg

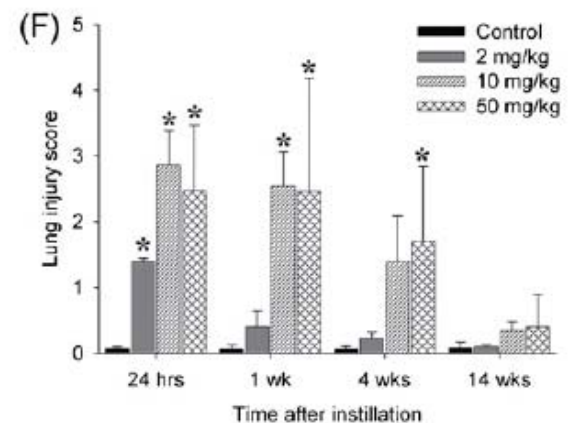
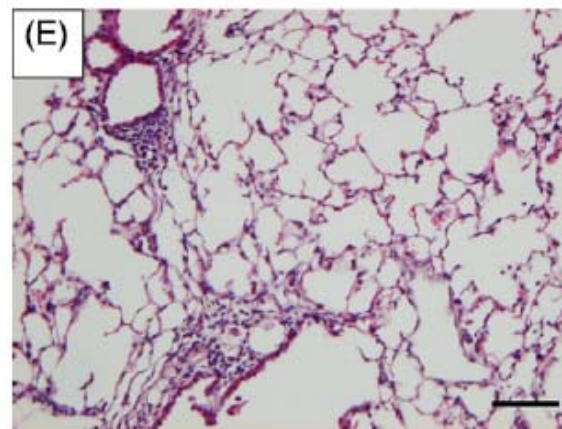
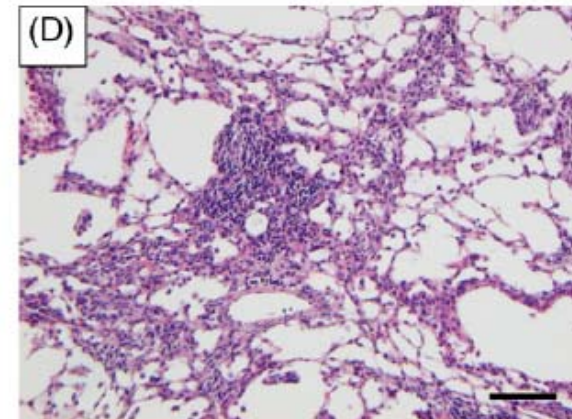
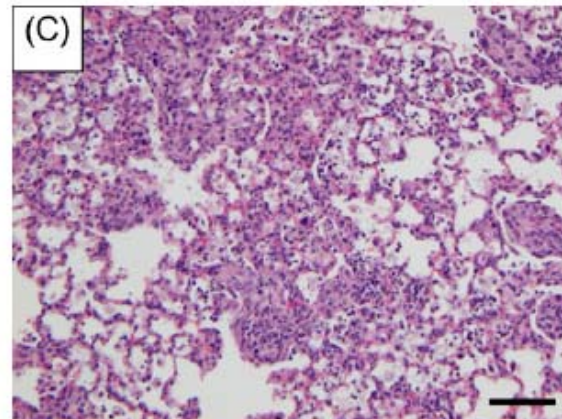
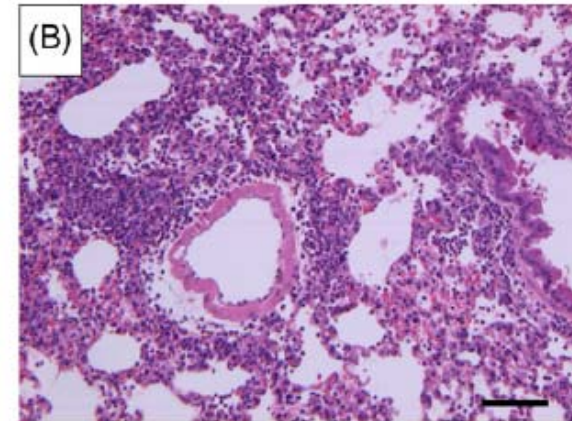
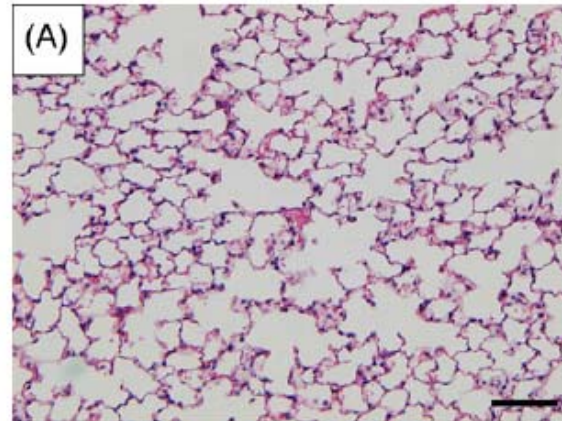
B 24 h

C 1 week,

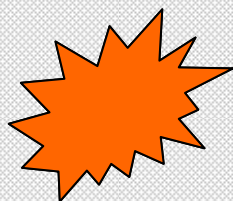
D 4 weeks

E 14 weeks

F) Lung injury score
based on a light
microscopic examination
of the degree of
abnormality in the alveoli,
bronchioles and bronchi,
at different times.



(Jeong et al., 2007)



Interazione particella-cellula

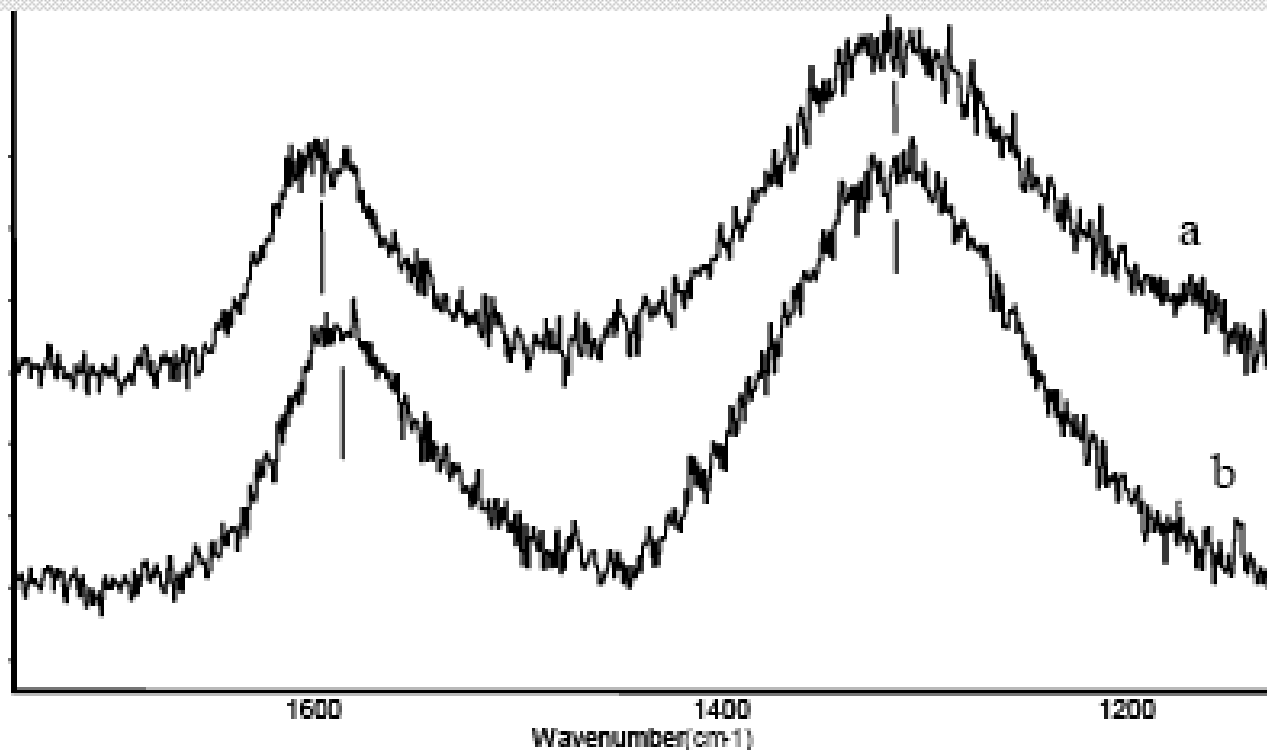
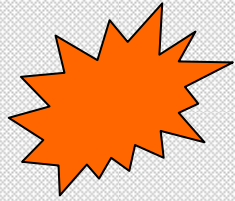
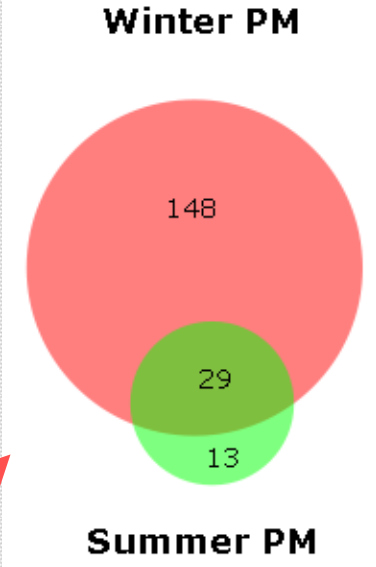
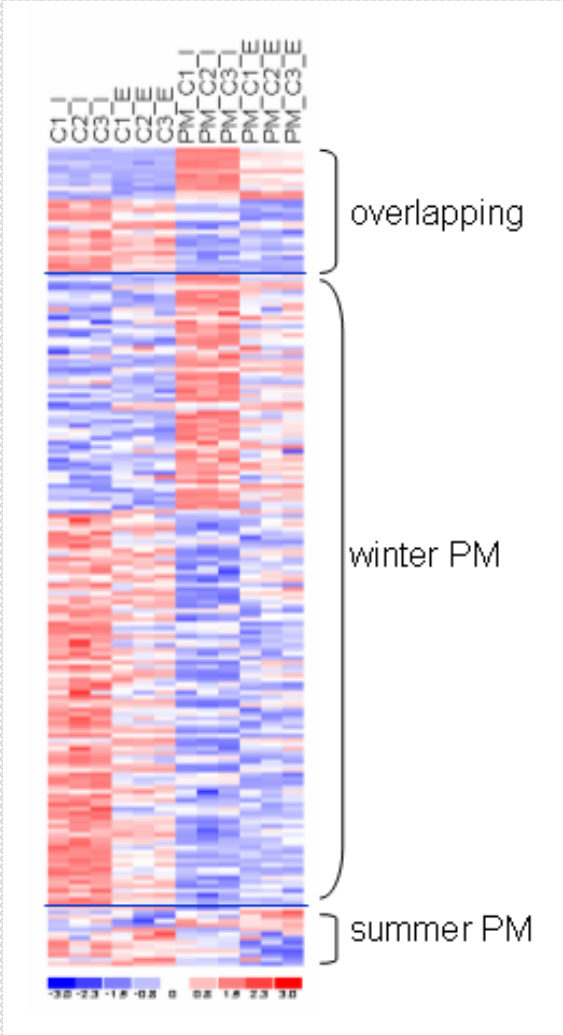
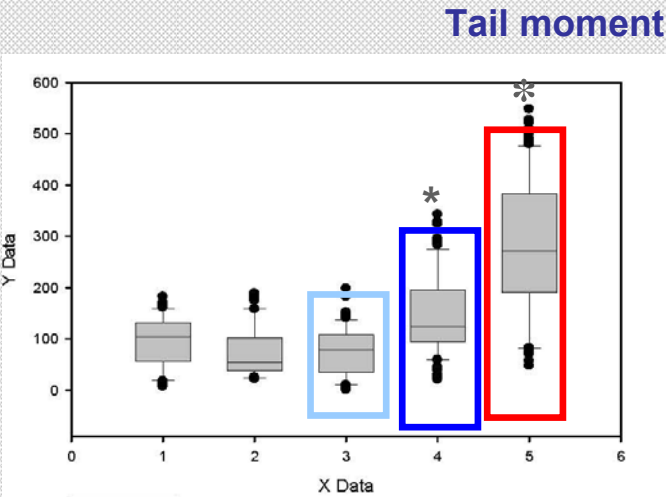
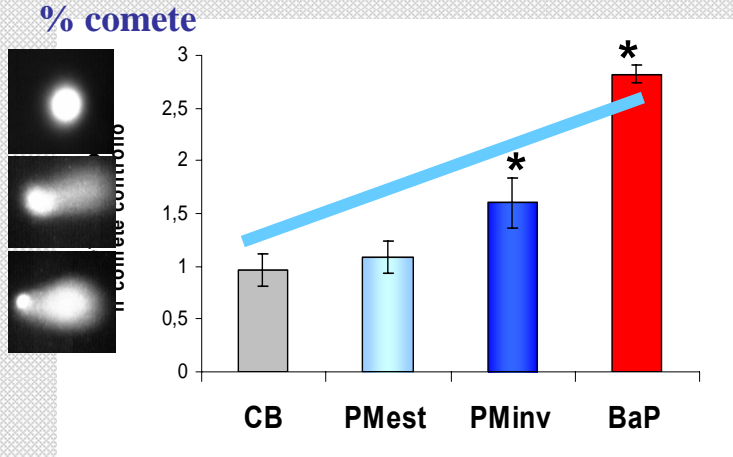


Fig. 8. Raman spectra of pristine fine particles, PM_{2.5} (spectrum a) and of the same particles internalised in alveolar epithelial cells (spectrum b).



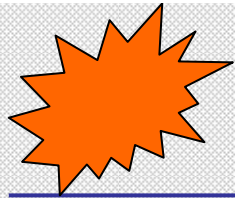
PM fine: genotossicità



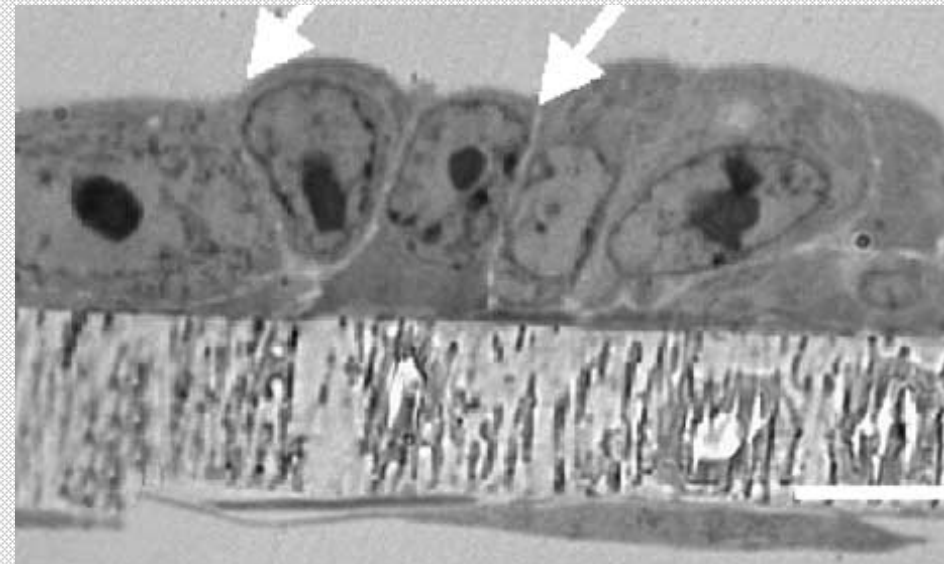
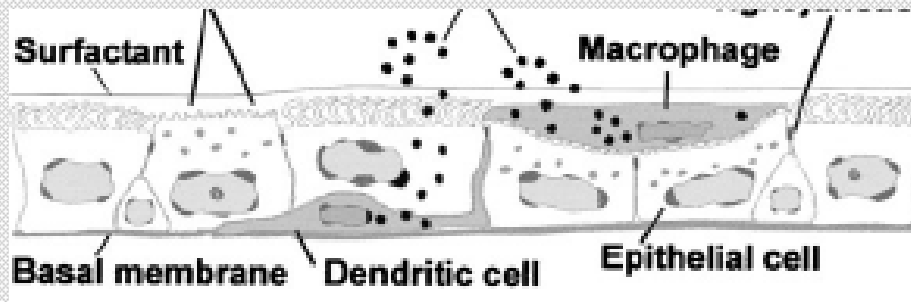
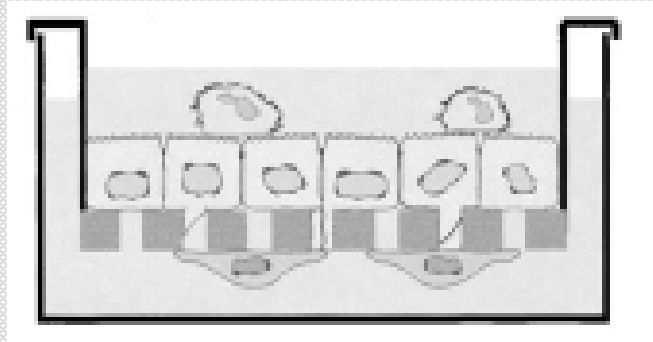
Gene expression profiling in A549 esposte a PM2.5

Il numero di geni attivati da PM invernale è molto maggiore. Molti di questi geni sono implicati nella detossificazione da sostanze xenobiotiche.

Dati di C.Battaglia, LITA Segrate

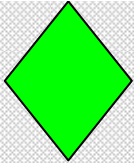


Modello di colture-bidimensionali



Rothen-Rutishauser, American j of respir cell mol biol, 32,281,2005

Hermanns, Laboratory Investigation 84, 736, 2004



Strumenti di controllo di NPs e UFP

Le frazioni considerate biologicamente rilevanti sono:

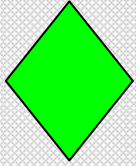
- **inalabile** (entra nell'apparato respiratorio) con diametro aerodinamico inferiore e 10 μm
- **respirabile**, oltrepassa la superficie ciliata dell'epitelio respiratorio, con diametro inferiore e 4.5 μm .

Valori limite di esposizione "occupazionale" sono espressi con la terminologia inalabile o respirabile. Queste definizioni universalmente condivise rappresentano quindi frazioni molto maggiori rispetto a quelle delle UFP e NP.

UK : la legislazione che regola il controllo dell'esposizione di lavoratori a sostanze chimiche è "Control of Substances Hazardous to Health Regulations 2002", che fornisce precise indicazioni sulla valutazione di rischio, sulle misure utili al controllo dell'esposizione e stabilisce le "good and safe working practices" e sono state individuate 4 classi di nanomateriali dal British Standard Institution .

In U.S.A l'agenzia "Occupational Safety and Health Administration" è responsabile dello sviluppo e controllo della sicurezza nei posti di lavoro. Le regole specificano limiti per l'esposizione espressi in termine di concentrazione (massa) per unità di volume. La pratica in uso nel monitoraggio dell'esposizione a particelle in ambiente è l'uso di un device individuale che raccoglie le frazioni presenti (inalabili o respirabili) in accordo a HSE 2000 (detta limiti per operatori di industrie petrolchimiche, compagnie ferroviarie, industrie pesanti etc) e ne determina poi per via gravimetrica la massa e quindi la concentrazione media di un dato periodo

Esiste un draft di raccomandazione che pone valori limite di esposizione per TiO_2 (NIOSH (2005). I limiti sono 1.5 mg/m^3 per fine TiO_2 e 0.1 mg/m^3 per ultrafine TiO_2 . "Fine" è la frazione respirabile e ultrafine è la frazione di particelle respirabili con diametro $r < 100 \text{ nm}$. La determinazione di NPs (ultrafini) è basata sull'osservazione al TEM



Direttive in atto e in divenire

Eistono strumenti che assicurano un livello appropriato di protezione per i lavoratori e le indicazioni sono nella direttiva EU Directive 89/391/EEC

L' esposizione ad agenti chimici in ambienti di lavoro è regolata dalla direttiva 98/24/EC. Le normative inerenti specifiche sostanze a rischio biologico sono nella direttiva Directive 98/8/EC e nella No 1907/2006 (REACH – Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals).

E' in studio la modalità di applicazione di regole appropriate ai nanomateriali

Sono in atto da parte di ISO (Intern Org of Standardization) e OECD (Organization for Economic Cooperation and Development Activities) lo sviluppo di azioni corporative

La Collaborazione tra EU e US intende arrivare a metodologie comuni nei due continenti nella valutazione degli impatti delle nanotecnologie e dei nanomateriali.

Il progetto in atto parte da valutazioni comparative e intende contribuire all'identificazione di metodologie che portino ad una convergenza di regole tra EU e US

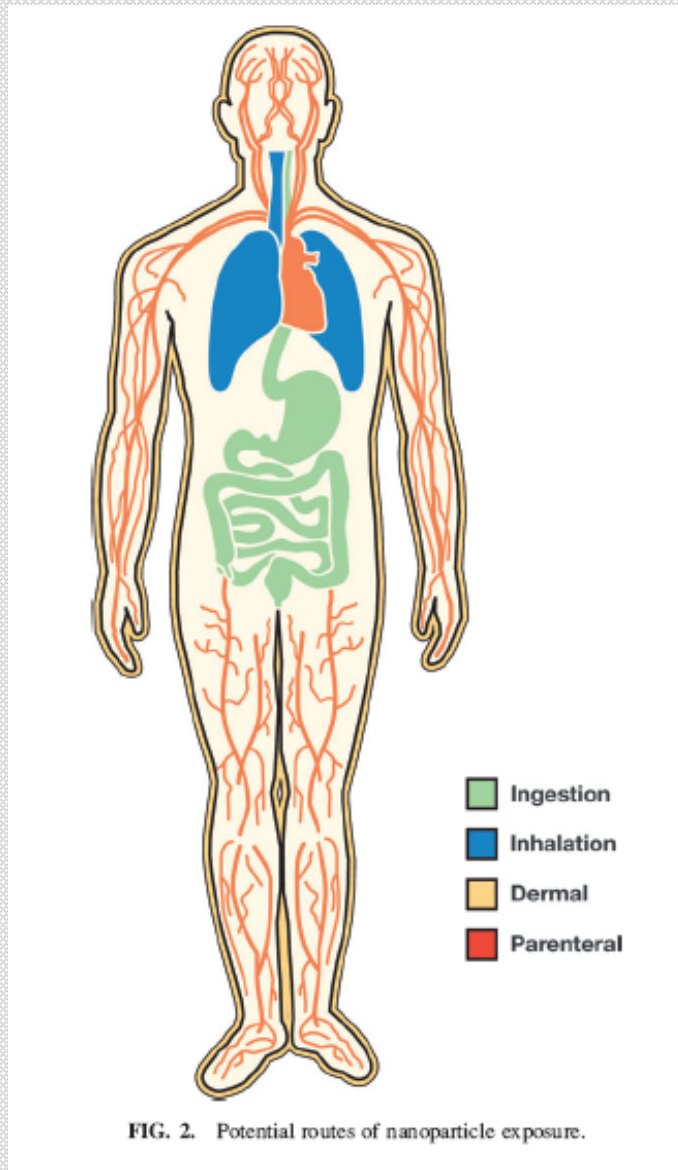


FIG. 2. Potential routes of nanoparticle exposure.

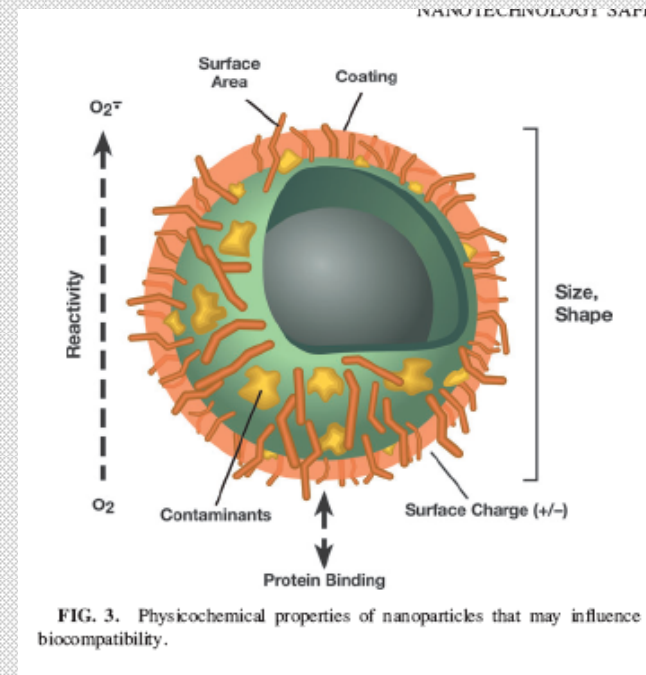
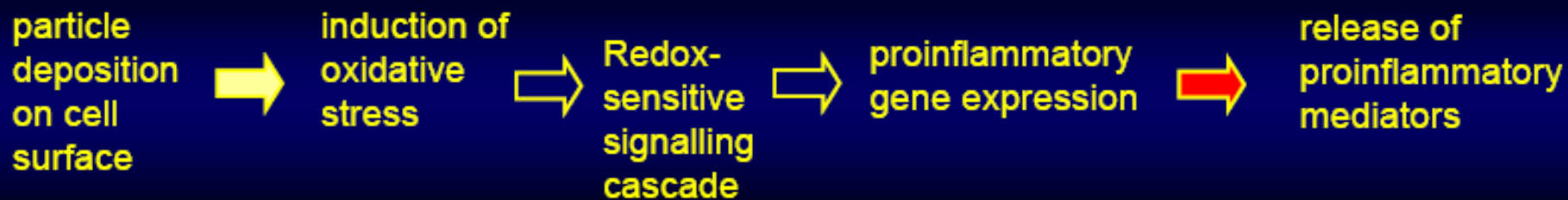
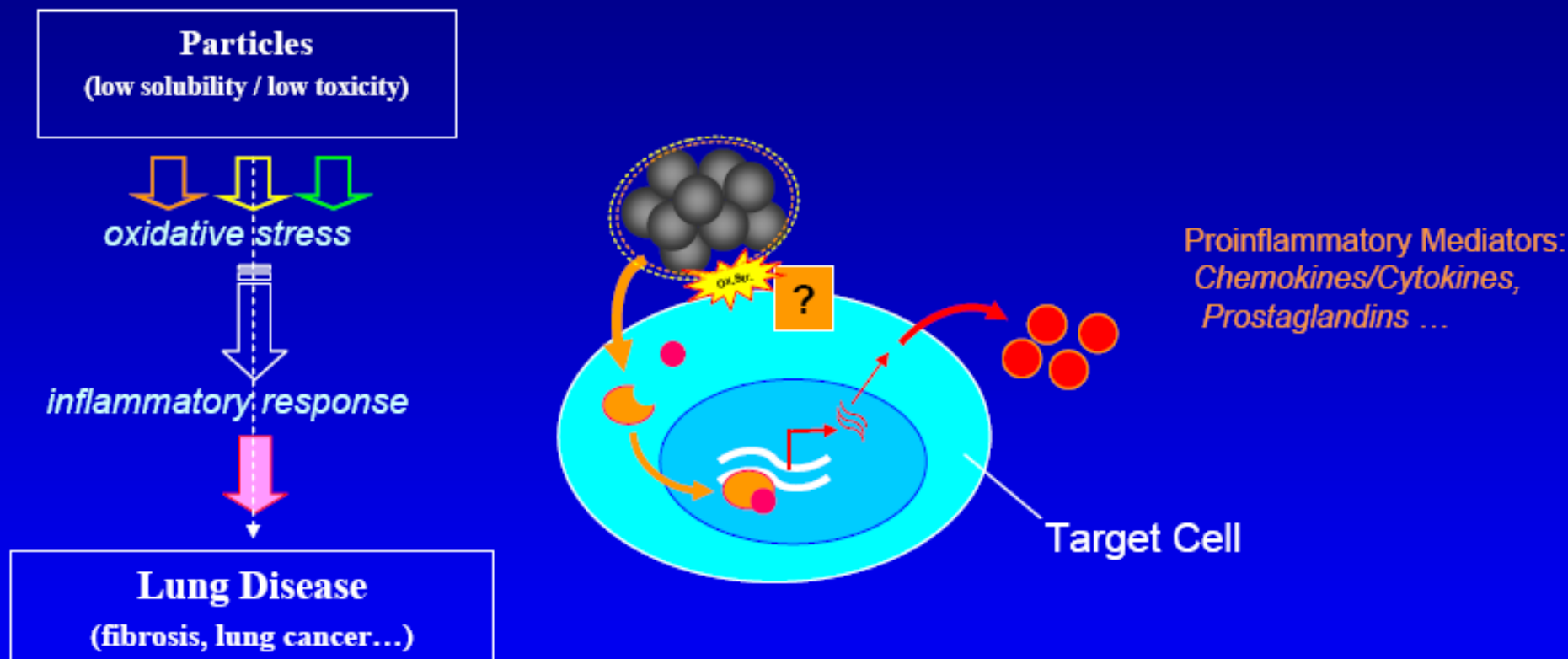


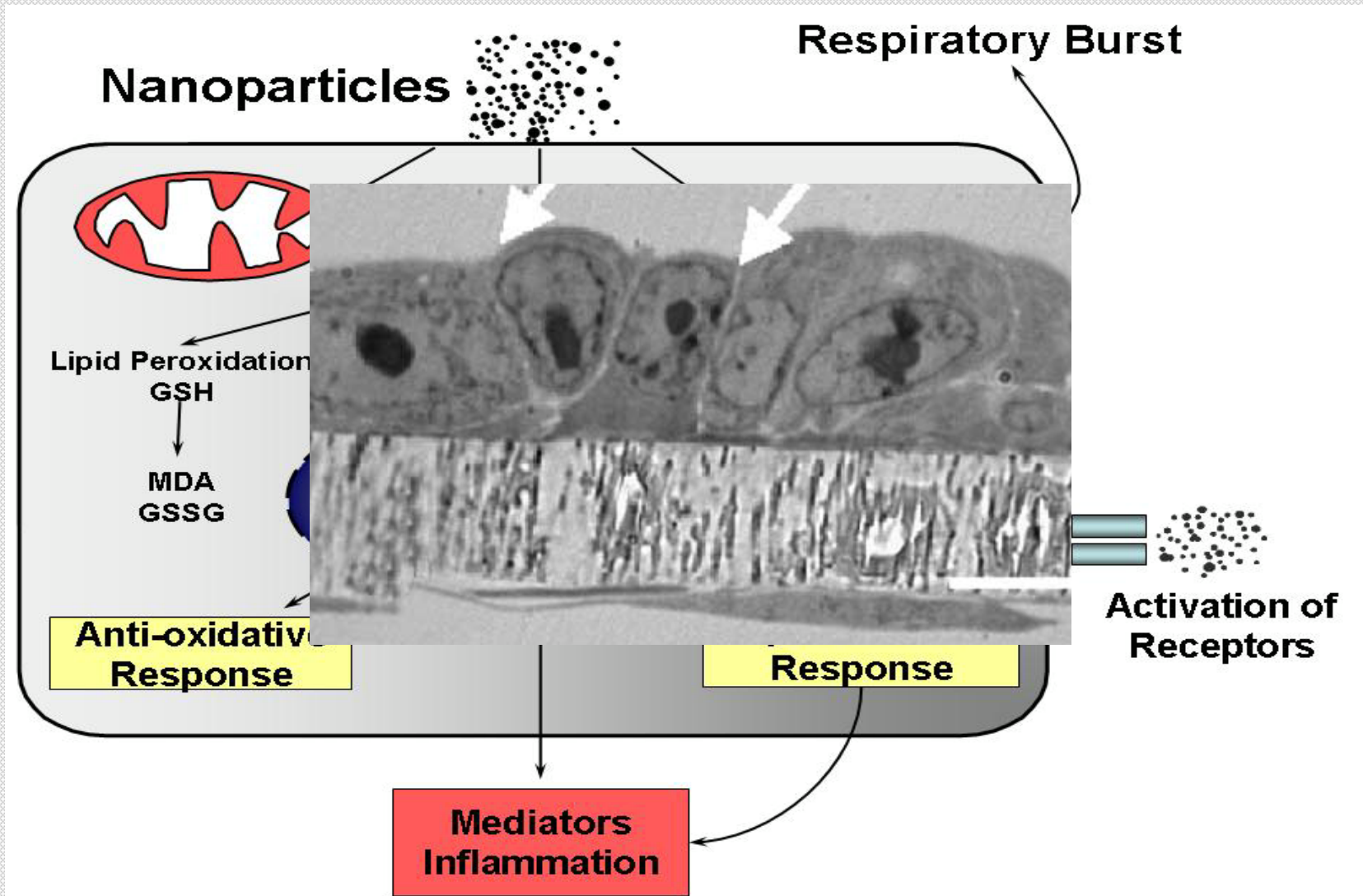
FIG. 3. Physicochemical properties of nanoparticles that may influence biocompatibility.

Particle Surface Toxicity

Hypothetical Mode of Action



Bersagli cellulari di nanoparticelle



Strumenti di campionamento di PM

Campionamento gravimetrico: filtrazione dell'aria con raccolta del particolato in sospensione su un filtro.

Campionatori PM10 , PM2.5, PM 1, PM 0.1

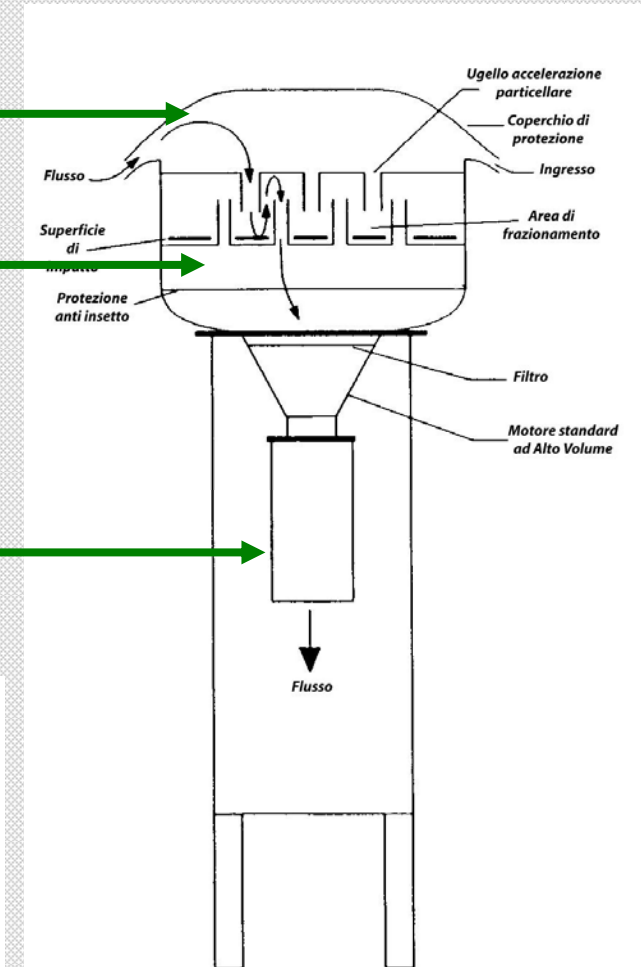


Tabella 1 – Flusso di campionamento

	Flusso
Alto Volume	1- 2000 m ³ /h
Medio Volume	1 m ³ /h
Basso Volume	1-20 l/min

Traffico e polveri fini

Outdoor-Milano



Camatini et al., 2000,2003

**Il detrito d'usura di
pneumatico
contribuisce al 3-5-%
PM fine**



Utilizzo di polverino da pneumatici



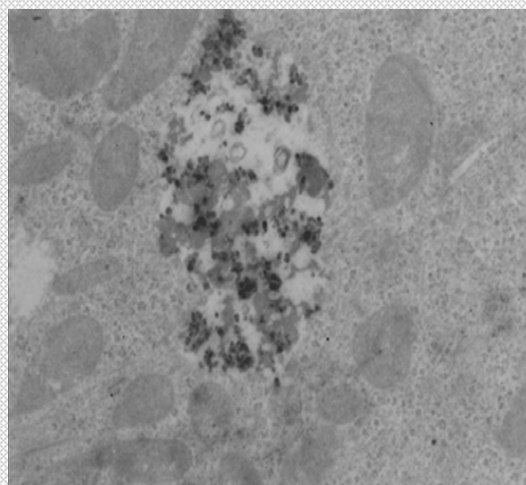
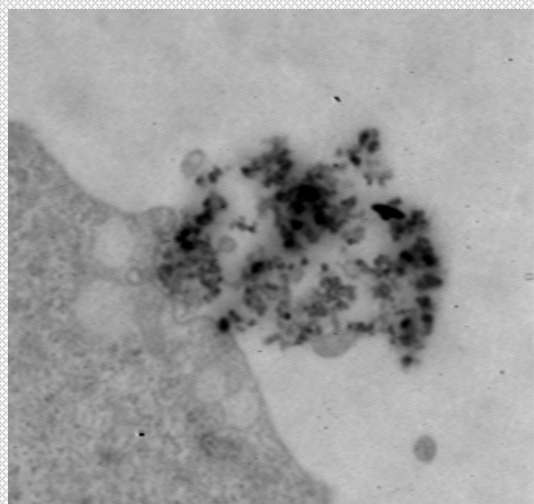
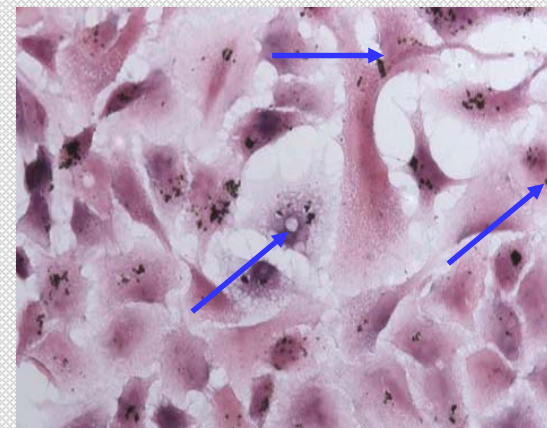
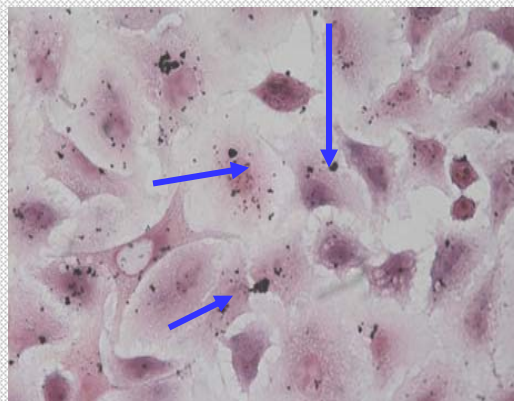
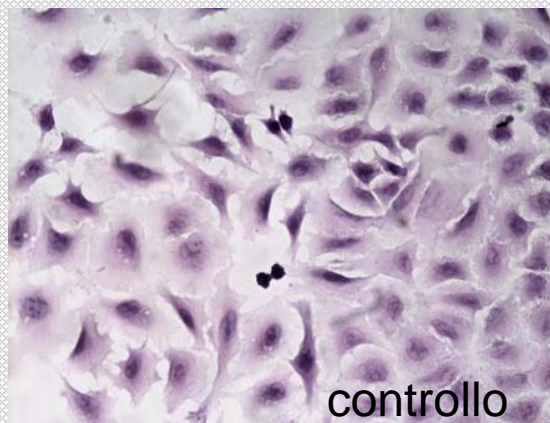
Material frammentato in frazioni molto piccole e inserito in molteplici strutture

POLAGO, 2006

<u>Valutazione citologica</u>	<u>Parametri</u>	<u>Biomarker</u>	<u>Risposte</u>
Citotossicità	Vitalità cellulare	MTT, Trypan Blu	<p>Bar chart showing cell viability (%) over 24h, 48h, and 72h. The y-axis represents '% viable cells' from 0.0 to 45.0. The x-axis represents 'Time' with categories 24h, 48h, and 72h. The legend includes Control (white), DMSO 0.75% (light gray), 10 µg/ml (dark gray), 50 µg/ml (checkered), 60 µg/ml (dark gray), and 75 µg/ml (black). Viability generally decreases over time and with higher concentrations.</p>
Risposte infiammatorie	Espressione di proteine specifiche	Interleukine IL-6 e IL-8	<p>(a) Bar chart showing IL-6 fold increase for Ambient-coarse (black), Ambient-fine (hatched), and Ambient-ultrafine (white) particles at 0, 200, 400, 600, 800, and 1000 µg/ml. The y-axis represents 'IL-6 (fold increase)' from 0 to 8. IL-6 levels increase with particle concentration and are generally higher for coarse particles.</p>
Stress ossidativo	Specie reattive dell'ossigeno (ROS)	Citofluorimetria, microscopia a fluorescenza	<p>Fluorescence microscopy image showing green fluorescent spots representing ROS in cells.</p>
Marker di genotossicità	Danni al DNA	Comet Assay	<p>Two Comet Assay images showing DNA damage as comet tails. The left image shows a single comet with a red head and a blue tail. The right image shows a comet with a red head and a blue tail, with a scale bar.</p>
Morfologia	Interazione particolato - cellule	Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)	<p>Transmission Electron Microscopy (TEM) images (A, B, C) showing cellular ultrastructure and particle interaction. Image A shows a cell with a nucleus and mitochondria, with a scale bar and asterisks. Image B shows a cell with a nucleus and a scale bar. Image C shows a cell with a nucleus (Nu) and a scale bar.</p>

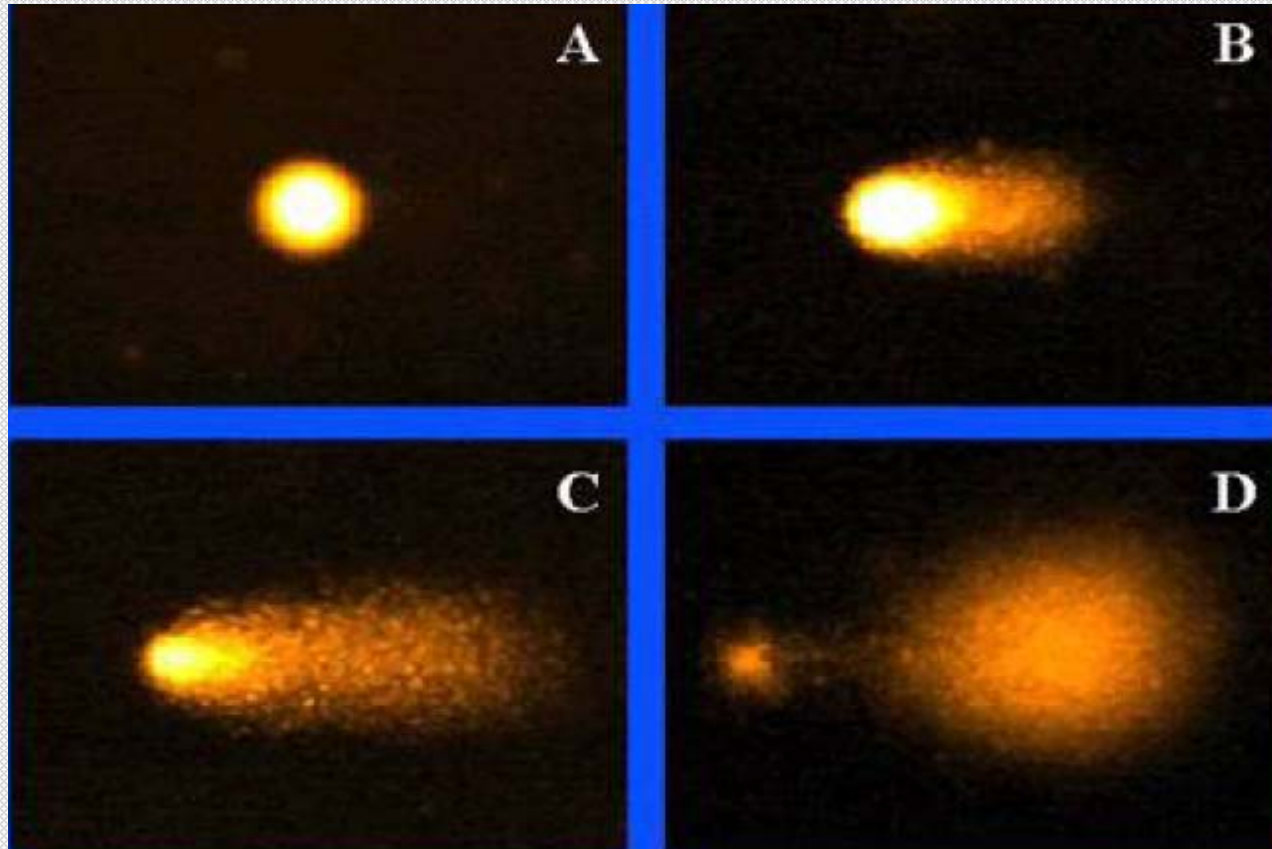
PM fine entra nella linea cellulare alveolare polmonare umana (A549)

Microscopia ottica



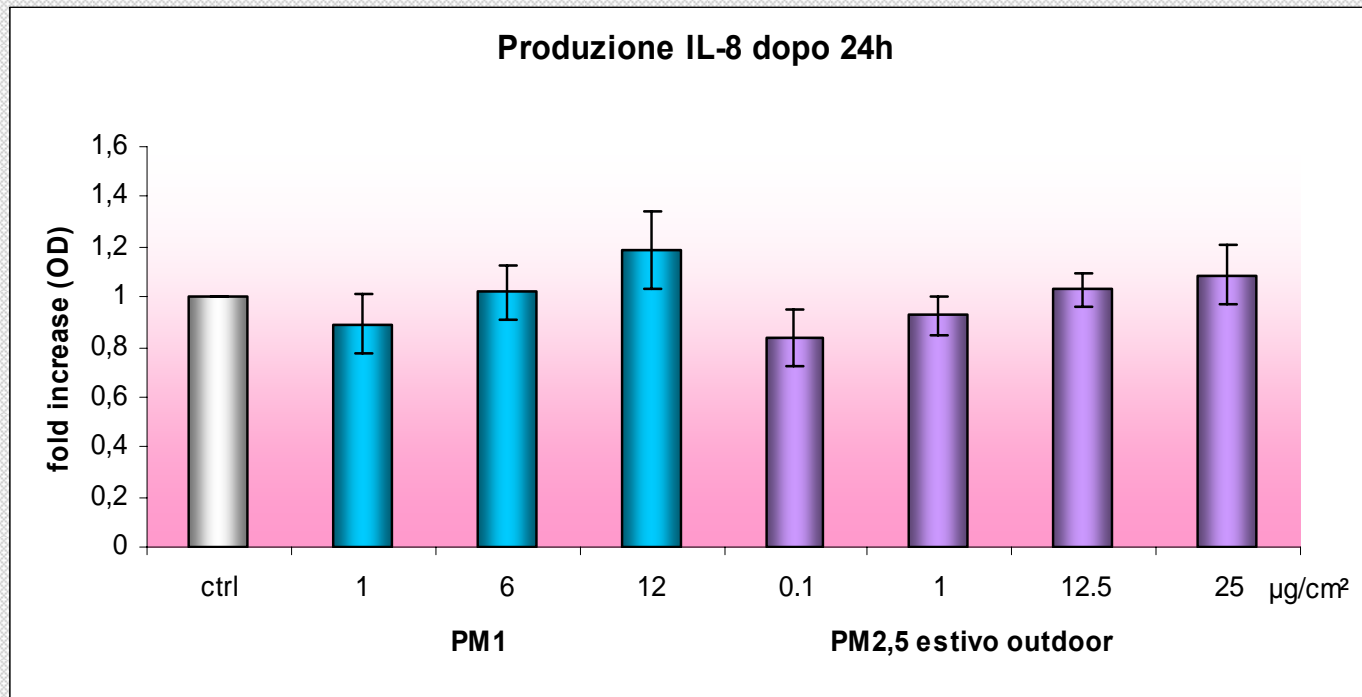
Microscopia elettronica

Danni al DNA : Comet assay



Nuclei di A549: A intatto; B con frammentazioni; C con frammentazioni maggiori; D apoptosi

IL-8 secretion in cells exposed to PM1 and 2.5 outdoor



IL-8 secretion at 24h is apparently dose dependent

In sintesi

le nanoparticelle

- raggiungono gli alveoli e entrano nelle cellule
- la clearance non è efficace per UFP <500nm
- la reattività superficiale provoca ROS
- la loro superficie è più significativa della massa
- traslocano verso altri organi, e l'efficienza di trasferimento risulta <1%
- la piccola dimensione ne facilita l'ingresso nelle cellule, ma il passaggio attraverso le cellule endoteliali e i vasi sanguigni per raggiungere altri organi è da verificare

Conclusioni

- UFPs hanno proprietà biologiche uniche
- i potenziali rischi di utilizzo non sono gli stessi del materiale dal quale derivano.
- i test di tossicità di UFPs devono dare indicazioni sulla sicurezza nell'utilizzo
- le ricerche su UFPs hanno dimostrato che la maggior superficie per massa rende queste particelle più biologicamente attive di quelle di dimensioni maggiori e identica composizione chimica
- l'area e il numero di UFPs sono elementi predittivi nell'induzione di stress ossidativi e processi infiammatori
- la conoscenza delle sorgenti di emissione, della quantità, della dimensione, della composizione chimica di UFPs diventano elementi indispensabili per la previsione di rischio.

Summary

Effective alveolar deposition of inhaled UfPs

- Ineffective clearance of <500nm particles from the lungs
- Surface reactivity drives oxidative stress related toxicity (inflammation)
- Particle surface represents as valid dose metric (better than mass)

Nanoparticle Translocation:

- Translocation efficiency from lung to sec. target organs <1%
- Small size possibly facilitates uptake into cells and transcytosis across epithelial and endothelial cells into the blood and lymph circulation to reach potentially sensitive target sites like lymph nodes, spleen, heart, and bone marrow (*Kreyling et al. 2006*).

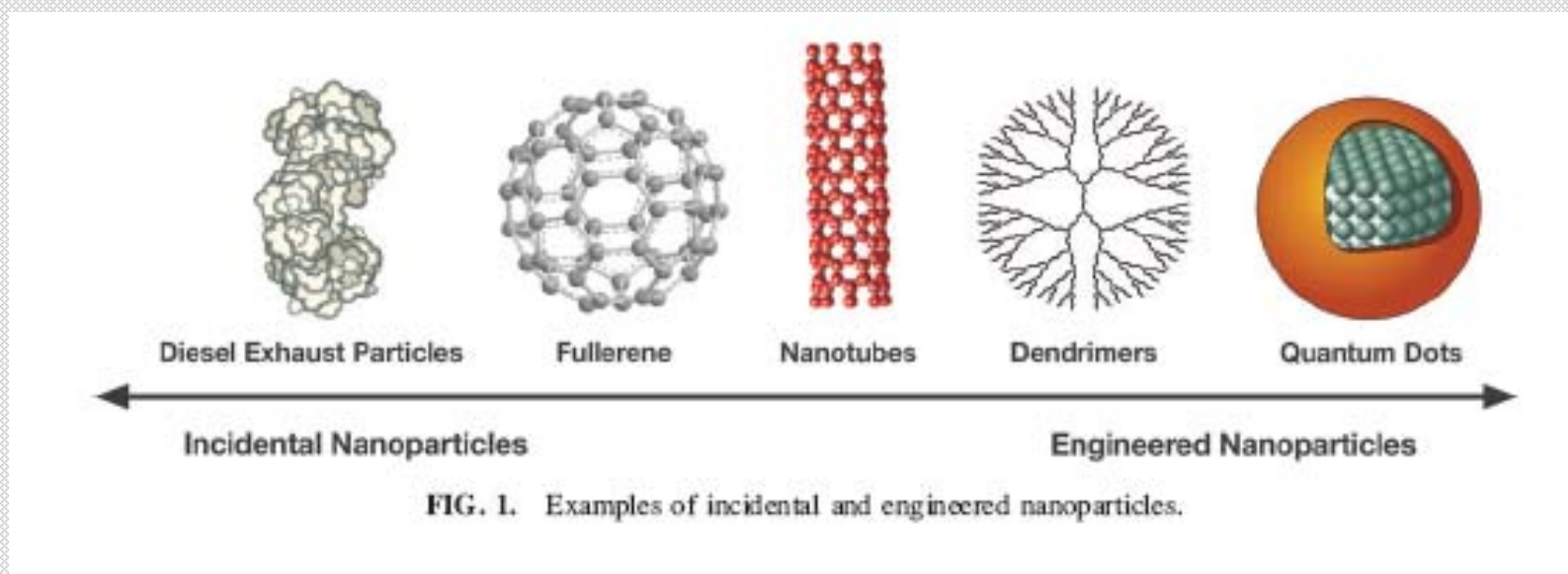
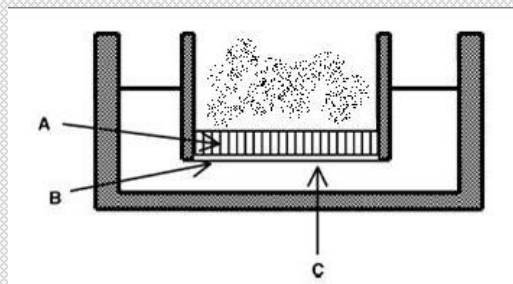


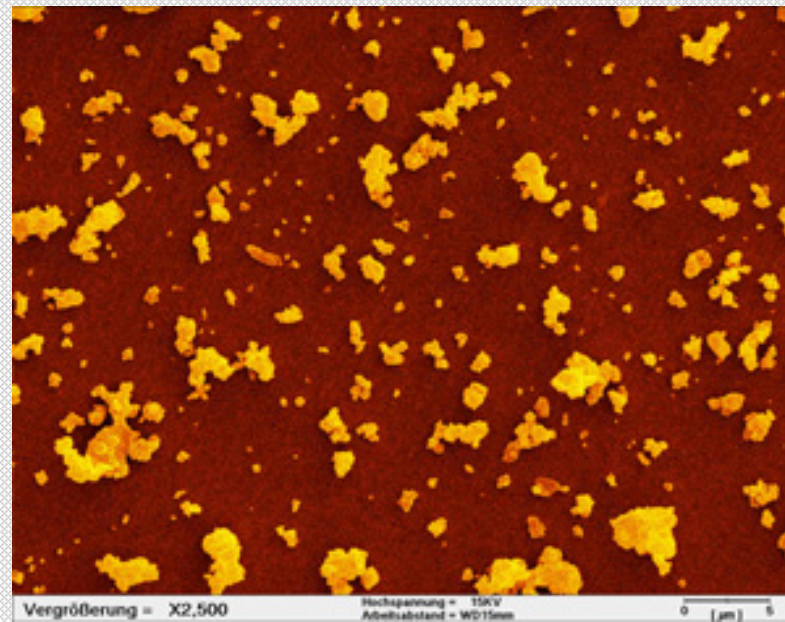
FIG. 1. Examples of incidental and engineered nanoparticles.

Le ricerche presentate sono state
realizzate da: finanziare da:

Maurizio Gualtieri
Paride Mantecca
Pasquale Melchiorretto
Giuseppe Misericocchi
Paola Palestini
Viviana Corvaja
Eleonora Longhin
Elisa Moschini

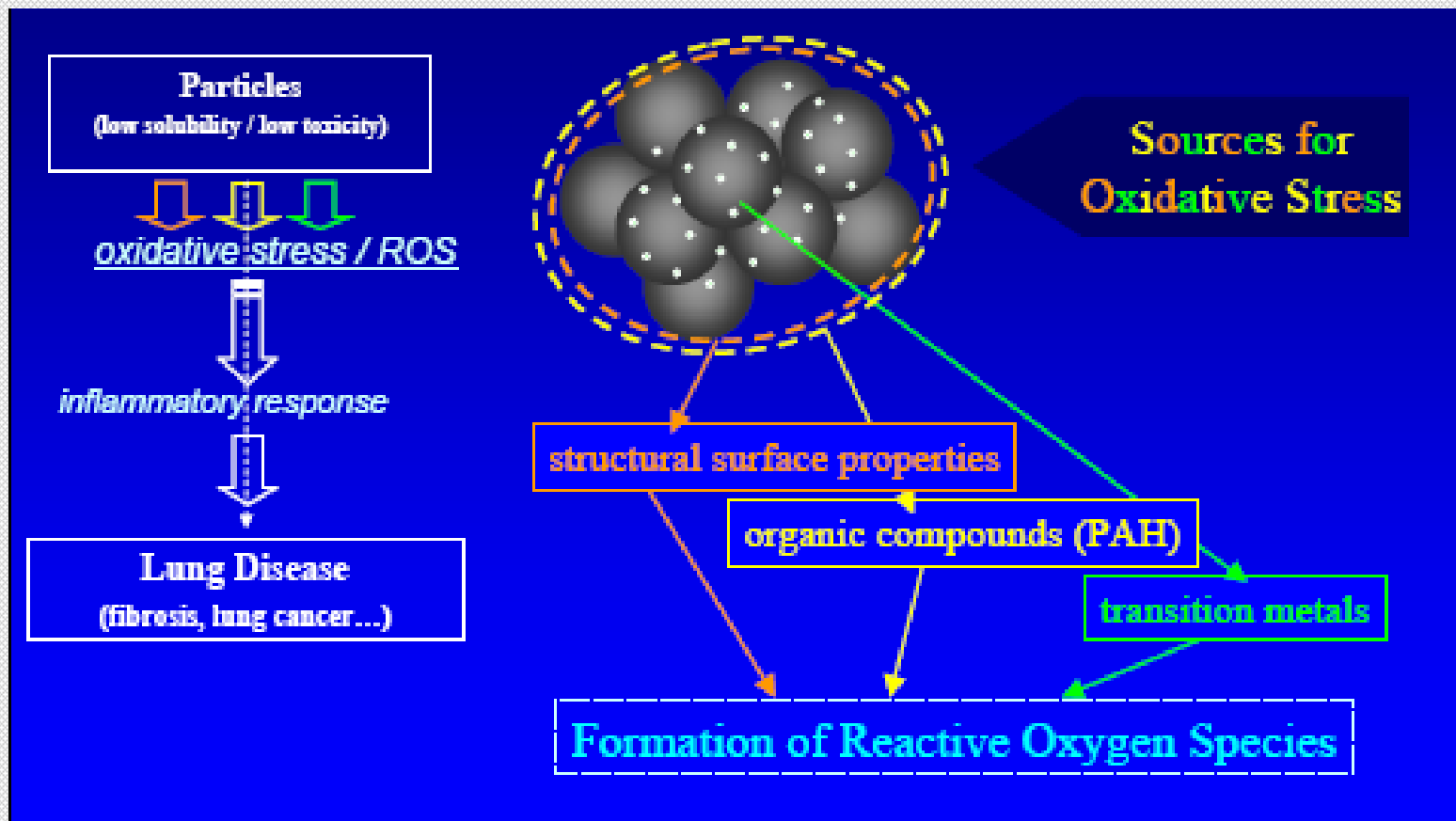


Pirelli Pneumatici
Regione Lombardia
Regione Abruzzo
Provincia di Milano
Comune di Milano
Agenzia Mobilità e Ambiente
Fondazione Cariplo

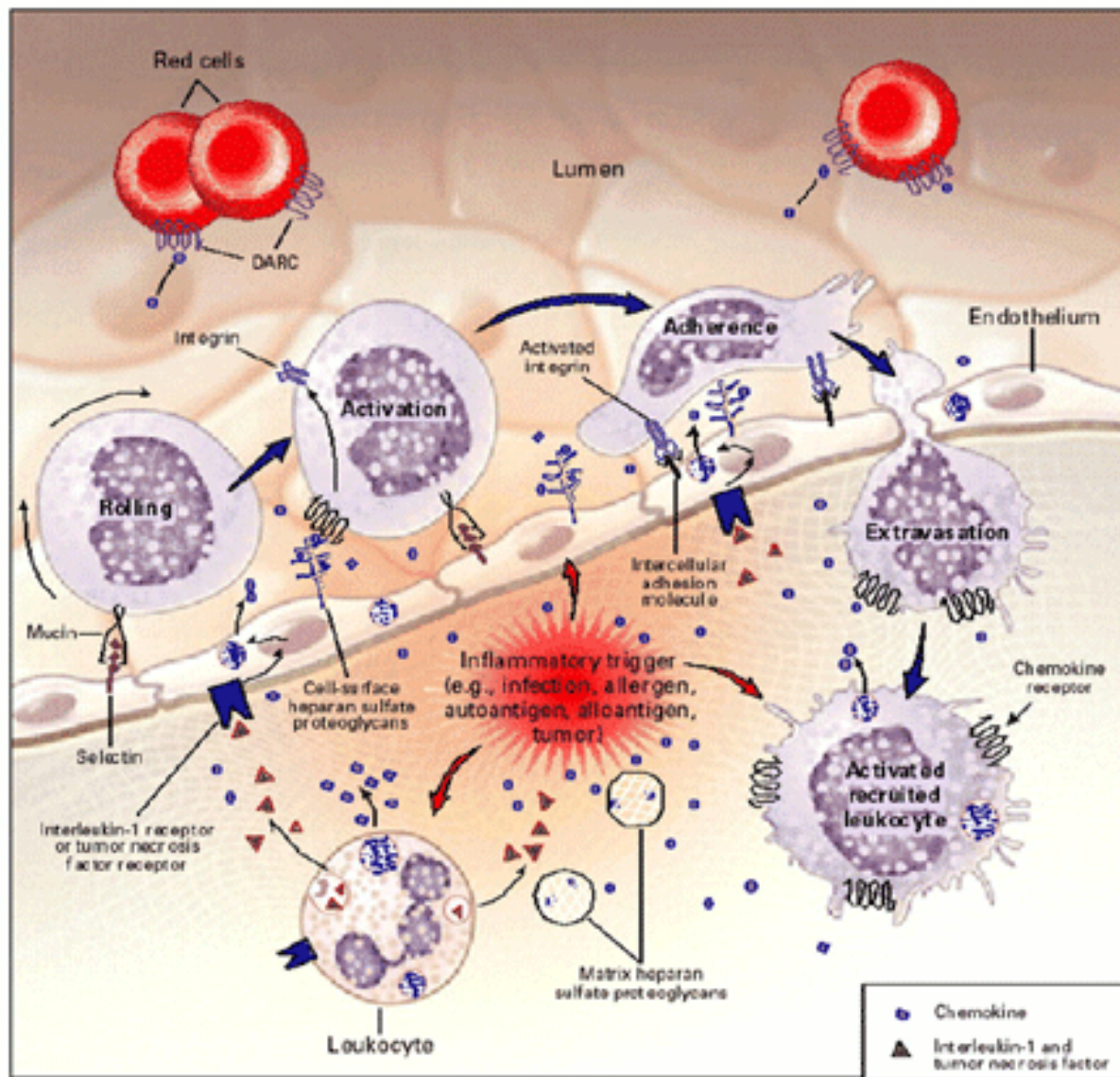


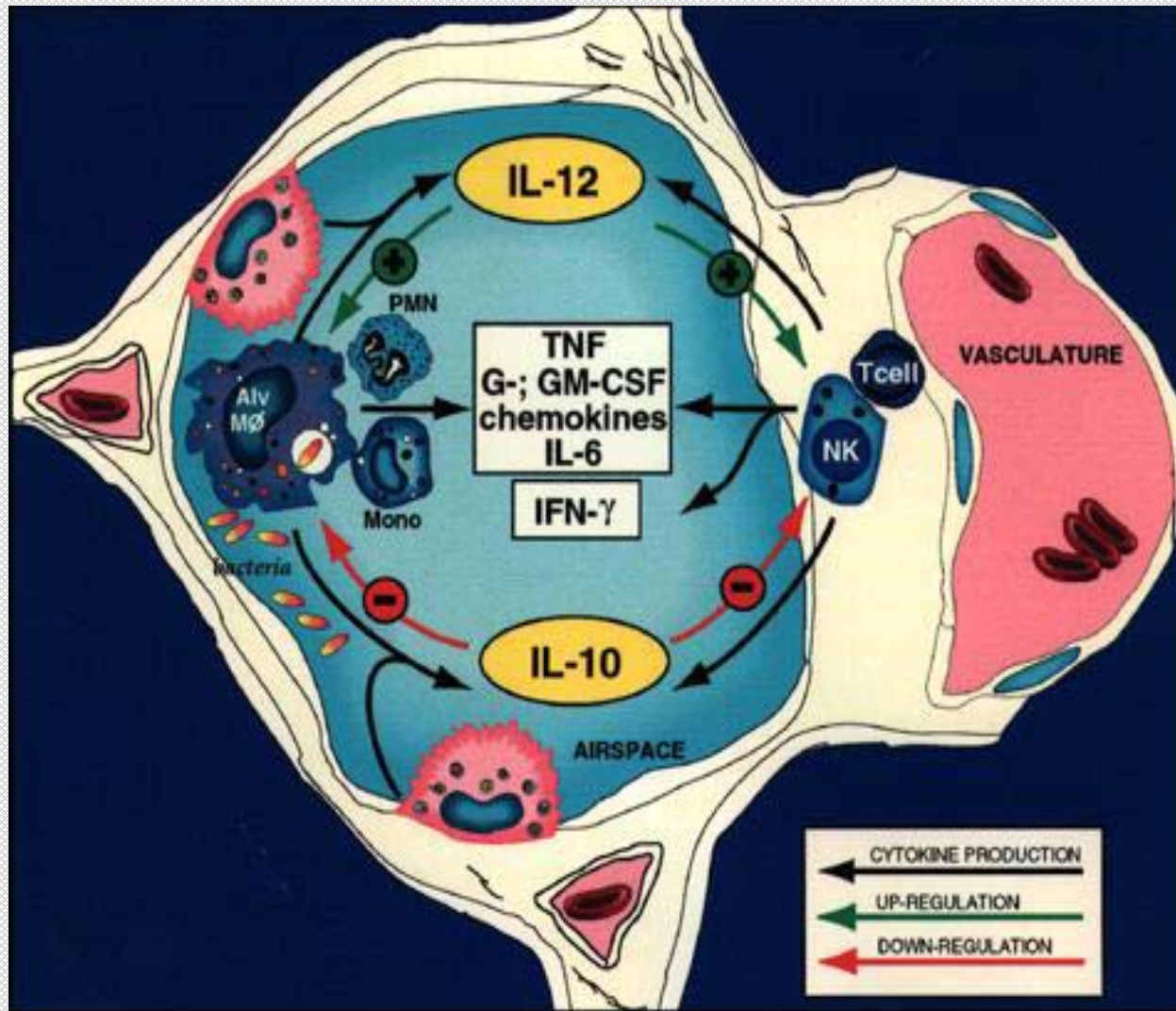
Scanning electron micrograph of fly ash particles from a municipal waste incinerator plant containing ultrafine particles

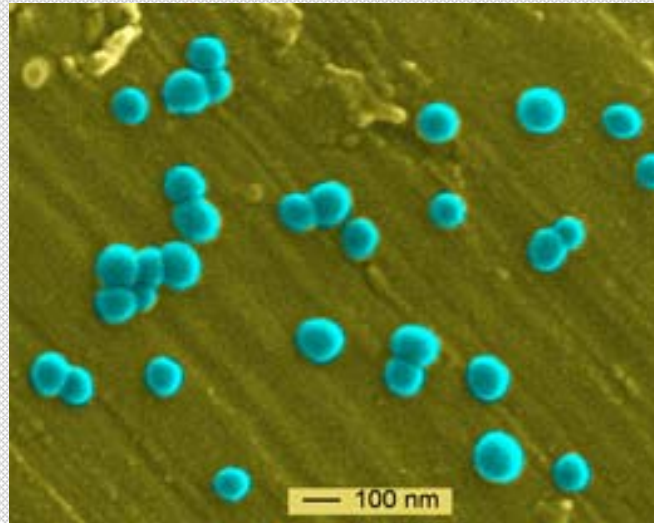
Struttura complessa per composizione chimica



TITOLO DA INSERIRE







Scanning electron micrograph of **silicasol** (amorph SiO_2 , ~ 60 nm).

In general, it has been observed that when NPs enter the body, either inhaled, through the GI track, the skin, or intravenously, they are rapidly found in the liver (up to 90%), then the kidneys and in organs with a high phagocytic activity, such as the bone marrow or the spleen. After a period of time (from hours to months), NPs are expelled from the body through feces and urine. Localization of inorganic NPs in other tissues has also been reported and often related to diseased organs, however, at a much lower quantity than in the previous cases and without a clear knowledge about where this inorganic matter came from, how it entered the body and how it changed since then. In this regard, nanotechnology, as an analytical tool, may have a lot to offer.

Size matters. (a) Compared to a 10 nm nanoparticle, proteins (e.g. APP; X-ray crystal structure obtained from www.pdb.org (Berman et al., 2000), protein ID 2FKL; visualization done by Accelrys Discovery Studio Visualization 1.7 software) and small molecules (e.g. DHED) are small in size and volume. A mammalian cell which is made up of proteins, nucleic acids, and other small to large molecules is thousand times larger in volume and size compared to a 10 nm nanoparticle. (b) Cell membrane incorporating various proteins and a single 10 nm nanoparticle.

