

Stato dell'arte e prospettive della valutazione tossicologica di nanomateriali ingegnerizzati

La nanotossicologia è una branca della tossicologia sperimentale che si occupa dell'identificazione e caratterizzazione degli effetti biologici dannosi di nanomateriali ingegnerizzati. Le proprietà fisico-chimiche di tali materiali influenzano le loro interazioni a livello biologico. Dalla prima generazione di studi sperimentali è emersa la necessità di un adattamento ai nanomateriali delle metodologie e strategie correnti di valutazione tossicologica. Particolari sfide sono quelle presentate dalla varietà di materiali da saggiare, dalla definizione delle grandezze dosimetriche di rilievo, dalla standardizzazione della preparazione e caratterizzazione del campione di nanomateriale nelle matrici biologiche, dalle tecniche per la determinazione della biodistribuzione nell'organismo. Le tecnologie "omiche" sono oggi strumento per un approccio tossicologico innovativo basato sulla comprensione dei meccanismi d'azione, che consentirà ai laboratori più avanzati di implementare test di screening ad alte prestazioni

DOI 10.12910/EAI2015-031

■ F. Pacchierotti, M. G. Grollino, G. Leter

La produzione e l'uso di nanomateriali ingegnerizzati sono in continua espansione. Le stesse caratteristiche chimico-fisiche che conferiscono ai nanomateriali proprietà utili per una grande varietà di applicazioni possono attribuire loro una tossicità biologica non presente nel corrispettivo materiale in forma massiva (bulk). Questa considerazione ha portato allo sviluppo di una nuova branca della tossicologia, oggi nota come nanotossicologia. La nanotossicologia fonda una parte dei suoi assunti teorici e dei suoi metodi sperimentali nelle ricerche compiute negli anni sessanta dello scorso secolo sugli effetti sanitari del particolato fine e ultrafine presente in atmosfera e originato prevalentemente dall'inquinamento industriale e dai veicoli a motore a scoppio. Infatti, studi

sperimentali, avviati a seguito di eventi estremi d'inquinamento atmosferico che causarono migliaia di morti, dimostrarono che le nanoparticelle contenute nel particolato ultrafine potevano sfuggire all'attività fagocitaria dei macrofagi polmonari e causare fenomeni infiammatori e alterazioni cardiovascolari.

La valutazione dei rischi per la salute ("risk assessment"), derivanti dall'esposizione a nanomateriali in ambienti di vita e di lavoro, si basa, come per altre potenziali sorgenti di danno, sull'intersezione tra misure di esposizione ("exposure assessment") e dati tossicologici ("hazard characterization") (Figura 1). La nanotossicologia ha il compito di fornire questi ultimi. Per far ciò si avvale di diversi approcci consolidati: test validati di tossicità in vitro e

in vivo; studi di biodistribuzione in organismi complessi (i cosiddetti studi ADME o "absorption, distribution, metabolism, excretion"); studi sui meccanismi d'azione a livello molecolare, cellulare, tissutale, d'organo e sistema; modelli di estrapolazione dei dati tossicologici ottenuti su colture cellulari alla possibile risposta di organismi complessi; costruzione di relazioni tra parametri chimico-fisici e attività biologica per poterne derivare modelli predittivi in silico. Tuttavia, la peculiare reazione dei sistemi biologici ai materiali nanodimensionati ha, molto presto, fatto emergere la

Contact person: Francesca Pacchierotti
francesca.pacchierotti@enea.it

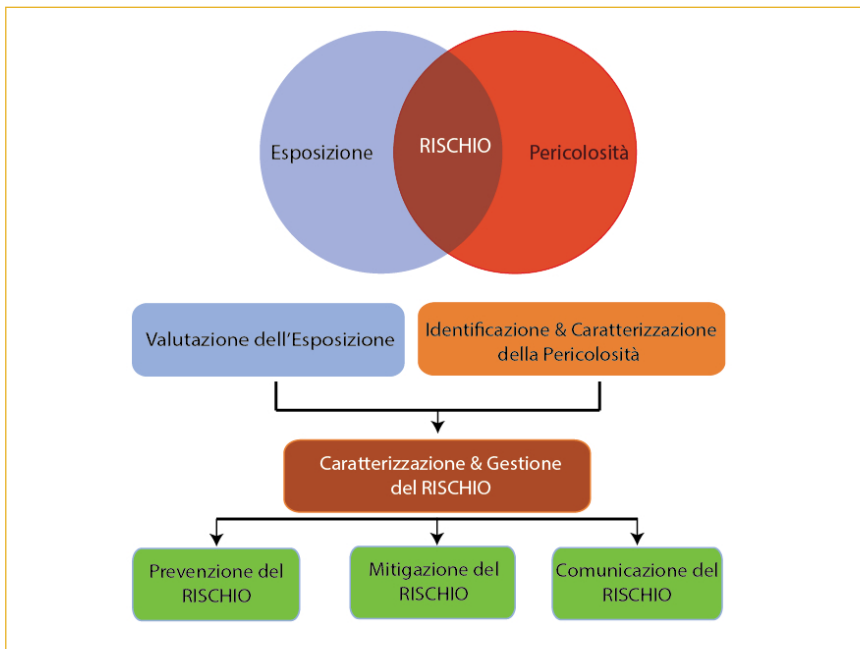


FIGURA 1 Il rischio per la salute è una funzione dipendente dall'esposizione e dalla pericolosità di un agente potenzialmente dannoso. La nanotossicologia sviluppa tecniche e modelli e produce i dati sperimentali necessari per l'identificazione e la caratterizzazione della pericolosità di nanomateriali ingegnerizzati

necessità non tanto di stravolgere le metodiche o l'approccio di caratterizzazione tossicologica quanto di adattarli al contesto, tenendo conto delle sue specificità. Nel seguito di questo articolo verranno esaminate più in dettaglio le principali criticità emerse nella pianificazione e conduzione di test tossicologici applicati ai nanomateriali.

Definizione delle priorità di analisi

Occorre partire dalla considerazione della grande varietà di nanomateriali già oggi prodotti e impiegati o in fase di sviluppo: essi possono

variare, infatti, non solo per la composizione chimica, ma anche per le dimensioni, la forma, le modificazioni di superficie, i metodi di sintesi, tutti fattori che si sono dimostrati influenzare la risposta biologica. Poiché non è realisticamente ipotizzabile moltiplicare i test tossicologici per il numero delle varianti di nanomateriali in esame, i laboratori di ricerca stanno lavorando, ai fini della classificazione e regolamentazione di nanomateriali, per definire le priorità di valutazione e per identificare criteri di classificazione che permettano di raggruppare i nanomateriali in base a diversi livelli di pericolosità, attraverso lo studio dei meccanismi e tipologie di effetti biologici. Ad esempio sarà data priorità allo

studio di nanomateriali già prodotti e immessi in commercio in grandi quantità, o di materiali dei quali una prima valutazione tossicologica abbia evidenziato la pericolosità. Inoltre, si procede con studi che testino sistematicamente le variazioni della risposta biologica al variare delle caratteristiche chimico-fisiche di un dato materiale; per questi studi, sono necessari materiali "modello", di composizione molto omogenea, con caratteristiche chimico-fisiche note, eventualmente sintetizzati allo scopo (Figura 2).

Impatto delle caratteristiche chimico-fisiche sulla risposta biologica

Dagli studi sinora condotti è emerso che le caratteristiche

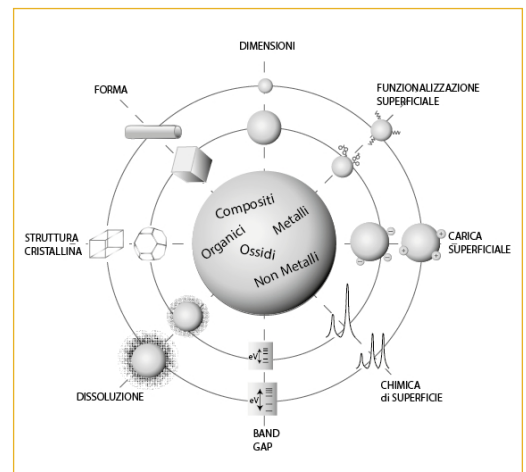


FIGURA 2 L'impatto delle proprietà chimico-fisiche sulla pericolosità di nanomateriali ingegnerizzati andrebbe valutato utilizzando un approccio combinatorio e materiali omogenei, ben caratterizzati, eventualmente sintetizzati ad-hoc

chimico-fisiche dei nanomateriali che influenzano la risposta biologica sono numerose; un elenco non esaustivo include la composizione chimica, il numero e la dimensione delle particelle, la loro forma, il tipo, la carica e l'eventuale funzionalizzazione della superficie. Per valutare il peso relativo dell'una o dell'altra caratteristica occorre determinarle quantitativamente con tecniche affidabili, talvolta raffinate, che forniscano dati solidi e riproducibili, nelle condizioni sperimentali rilevanti. Ad esempio, è noto che lo stato di agglomerazione/agggregazione delle nanoparticelle (e quindi il numero e la dimensione delle entità che interagiscono con i bersagli biologici) varia in funzione del mezzo di dispersione; inoltre, lo stesso sistema cellulare induce alterazioni nelle nanoparticelle con cui interagisce, modificandone chimicamente la superficie a seguito dell'adsorbimento di biomolecole presenti nei fluidi biologici. Pertanto, negli esperimenti di tossicologia su linee cellulari è necessario determinare lo stato di aggregazione delle nanoparticelle sia a secco che nel mezzo di coltura, prima e al termine del trattamento. Infine il livello di caratterizzazione chimico-fisica dovrebbe essere definito in base agli obiettivi dello studio: un maggiore approfondimento in quegli studi pianificati proprio per valutare l'impatto delle proprietà chimico-fisiche sulla risposta biologica, una caratterizzazione "di base" comprendente un set minimo di parametri, concordati all'interno della comunità scien-

tifica internazionale, per assicurare la riproducibilità dei dati e la confrontabilità di studi condotti in laboratori diversi.

Dispersione del materiale per prove di tossicità

Abbiamo già accennato all'importanza della dispersione del materiale nelle prove di tossicità. Tuttavia, nel caso dei sistemi cellulari in vitro, il mezzo di dispersione ottimale è ancora materia di discussione: infatti, da una parte, sarebbe importante, per un approccio conservativo alla valutazione del rischio, ottenere la massima dispersione possibile che porti a contatto con il bersaglio biologico particelle nell'intervallo delle dimensioni molto piccole, ritenute più pericolose; d'altra parte può essere maggiormente significativo, ai fini dell'estrapolazione dei dati ottenuti in vitro alla risposta di organismi complessi, testare il materiale nel mezzo che meglio riproduca le condizioni di dispersione a livello dell'organo o tessuto bersaglio, come nel caso di un surfattante polmonare per valutare la potenziale tossicità di nanoparticelle su cellule dell'apparato respiratorio. Resta comunque un requisito essenziale negli studi di nanotossicologia la standardizzazione, e l'armonizzazione tra laboratori, delle condizioni di dispersione del materiale: tali condizioni sono al momento in corso di definizione nell'ambito di quei progetti internazionali maggiormente orientati agli aspetti di regolamentazione dei nanomateriali (NANO-REG – A common European approach to the regulatory testing of manufactured nanomaterials, <http://www.nanoreg.eu>).

Selezione dei livelli di dose da saggiare nelle analisi di tossicità

I fondamenti della tossicologia classica sono basati essenzialmente sulla valutazione della relazione che intercorre tra la dose, e quindi la quantità della sostanza in esame, e gli effetti che questa produce sul sistema sperimentale sia esso rappresentato da sole cellule, come nel caso dei test *in vitro*, o da organismi animali per i test *in vivo*. Dalle curve dose-risposta sono ricavati i parametri definiti NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) e LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level) utilizzati in pratica per quantizzare la pericolosità di una sostanza. Questo approccio resta valido anche nel caso dei nanomateriali, ma viene reso più complesso da alcune problematiche ancora non pienamente risolte. Innanzitutto la scelta della metrica da usare per esprimere le dosi: è la concentrazione in termini di massa (es. mg/ml di terreno di coltura, mg/kg di peso corporeo) l'unità di misura della variabile indipendente da utilizzare o è tossicologicamente più rilevante il numero delle particelle o l'area superficiale totale? Manca ancora un consenso su queste scelte anche perché diversi effetti biologici sembrano dipendere maggiormente dall'una o dall'altra variabile. Pertanto, allo stato dell'arte, la raccomandazione è quella di definire la dose attraverso un set minimo di parametri (concentrazione di massa, area superficiale totale), e di avere cura di registrare accuratamente tutte le condizioni sperimentali, come, ad esempio, volume della sospensione di nanoparticelle somministrata,

numero di cellule esposte, geometria del sistema espositivo (es. area della piastra di coltura, superficie polmonare totale) che consentano, a posteriori, di ricostruire la dose efficace e di confrontare nel modo più attendibile i risultati prodotti da studi indipendenti.

Esistono sostanzialmente due approcci che possono essere seguiti per disegnare gli esperimenti volti alla determinazione delle relazioni dose-risposta. Da una parte, si possono scegliere le concentrazioni da saggiare all'interno di un intervallo corrispondente a reali scenari di esposizione, dall'altra si può utilizzare un intervallo di dosi più ampio, comprendente anche dosi molto superiori a quelle riscontrabili negli ambienti di vita o di lavoro, con lo scopo di accertare la reale dipendenza dell'effetto biologico analizzato dalla dose e di sostanziare, in tal modo, un rapporto di causalità. Per la nanotossicologia, attualmente, esistono pochi margini di scelta perché gli scenari ed i livelli di esposizione reali sono ancora poco noti, anche a causa delle difficoltà analitiche dovute all'inadeguatezza degli strumenti di misura e delle strategie di campionamento. I dati di esposizione costituiscono oggi l'incognita principale per la stima del rischio e quella sulla quale dovranno concentrarsi i maggiori investimenti nell'immediato futuro.

È necessario infine valutare anche gli effetti indotti da esposizioni protratte nel tempo per verificare eventuali fenomeni di accumulo di nanoparticelle nei tessuti/organi bersaglio e la possibile compromissione a lungo termine dei meccanismi di difesa ed eliminazione.

La quantificazione e qualificazione di eventuali effetti cronici nell'ambito della nanotossicologia sperimentale rende ancora necessario l'utilizzo degli animali da laboratorio, anche se la ricerca e lo sviluppo di modelli avanzati in vitro proseguono intensamente, con l'obiettivo di ridurne quanto più possibile l'impiego (vedi oltre).

Per concludere su questo aspetto, possiamo fare nostra la posizione di chi propone di concentrare le risorse disponibili su pochi materiali, testati ad un numero di concentrazioni/dosi sufficientemente alto per descrivere la risposta cellulare e tissutale (ad es. quella di tipo infiammatorio), piuttosto che ambire a caratterizzare dal punto di vista tossicologico troppi materiali con test di screening basati su un numero insufficiente di concentrazioni.

Selezione dei modelli sperimentali, bersagli ed effetti

Ai fini della caratterizzazione del pericolo dovuto all'esposizione a nanomateriali, occorre considerare che, allo stato attuale delle conoscenze, le principali vie di esposizione umana sono quella inalatoria, alimentare, dermica. Pertanto, la scelta del modello sperimentale più appropriato dovrebbe ricadere su linee cellulari che meglio mimino in vitro gli organi coinvolti in queste vie di assorbimento e su modelli animali trattati secondo una di queste modalità, selezionata in funzione degli scenari espositivi del materiale da saggiare.

Negli studi con modelli animali, per un'interpretazione corretta dei risul-

tati, è essenziale accompagnare la descrizione degli eventuali effetti tossici riscontrati con un accurato studio di biodistribuzione delle nanoparticelle. Infatti, è stato dimostrato che i nanomateriali possono traslocare ed eventualmente accumularsi in organi distali dalle vie espositive d'accesso all'organismo riuscendo a superare le barriere biologiche come quella encefalica, alveolare e testicolare. A tale scopo, sono ancora in discussione i metodi più appropriati, sensibili e specifici (es. microscopia elettronica, spettrometria di massa) per misurare la deposizione delle nanoparticelle negli organi distali. Inoltre, occorre tener conto del fatto che i cosiddetti effetti sistemici, quelli cioè potenzialmente indotti a distanza, possono insorgere non solo a seguito di fenomeni di traslocazione delle nanoparticelle in quanto tali, ma anche a seguito della circolazione di mediatori chimici, come nel caso della risposta infiammatoria.

Per quanto riguarda le raccomandazioni più recenti circa la scelta del tipo di effetti biologici da valutare, la citotossicità, cioè la morte cellulare, è il più diretto indicatore di danno e può essere convenientemente utilizzato come parametro per uno screening iniziale di tossicità in vitro e per definire meglio l'intervallo di dosi sul quale indirizzare i successivi studi di approfondimento. Per quanto possa essere banale il concetto di morte cellulare, i metodi per accertarla e misurarne la frequenza non sono altrettanto univoci, particolarmente nel caso di nanoparticelle, che, nel mezzo di coltura, anche a seguito di fenomeni di agglomerazione/agggregazione, possono interferire con alcuni metodi di misura della vitalità cellulare.

Per questi motivi, è consigliato l'impiego di più metodi complementari, basati su principi diversi, e sono attualmente in corso confronti a livello internazionale per la loro validazione. Oltre alla valutazione della citotossicità, può essere utile determinare l'eventuale induzione di un danno genotossico, cioè di un danno a livello delle molecole di DNA, della struttura, o del numero di cromosomi, perché ciascuno di questi effetti è potenzialmente implicato nei processi di trasformazione tumorale. Infine, i fenomeni infiammatori e lo stress ossidativo, ripetutamente osservati già negli studi sugli effetti del particolato ultrafine, suggeriscono di includere tali indicatori negli screening tossicologici di nanomateriali.

I metodi alternativi all'uso di animali da laboratorio

Grazie ad una crescente sensibilità bioetica e alla disponibilità di nuove tecnologie, negli ultimi anni si va affermando sempre più una cultura e una pratica di sviluppo e validazione di metodi di caratterizzazione tossicologica alternativi a quelli basati sull'uso di animali da laboratorio. Questa tendenza è presente anche nel settore della nanotossicologia, nel quale però devono essere superate alcune difficoltà specifiche: ad oggi, è ancora difficile riprodurre in vitro il complesso network che regola la risposta infiammatoria a livello di organi e sistemi; sono ancora in fase di sviluppo modelli in vitro di "barriere", come la barriera emato-encefalica o la barriera placentare, che permettano di saggiare il potenziale di traslocazione

di nanoparticelle; non sono riproducibili, se non in modo approssimativo, i fenomeni di contrattilità polmonare e cardiaca importanti nei fenomeni di traslocazione; non esistono al momento metodi standardizzati per valutare in vitro esposizioni croniche e possibili effetti cumulativi nel tempo. Comunque, anche nel settore della nanotossicologia, i test in vitro tradizionali possono essere molto utili, ad esempio, per valutare in modo comparativo l'impatto delle caratteristiche chimico-fisiche sulla tossicità e validare, in tal modo, modelli di relazione struttura-attività, o per determinare le capacità di internalizzazione della nanoparticelle in diversi tipi cellulari. Inoltre, una nuova generazione di modelli in vitro, come quelli basati sulla co-cultura di diversi tipi cellulari, o quelli basati sulle colture d'organo, o, infine, quelli basati sul differenziamento di cellule staminali totipotenti o multipotenti in specifiche linee differenziate, offre interessanti prospettive per un approccio in vitro alla valutazione tossicologica di nanomateriali.

Dalla tossicologia del "cosa" alla tossicologia del "come"

L'imponente sviluppo delle tecnologie "omiche", cioè delle tecniche di analisi molecolare per evidenziare specifici cambiamenti nella sequenza del genoma, variazioni di espressione genica, o modificazioni dei pattern metabolici, relativamente alla totalità delle strutture/reazioni cellulari e della rete di connessioni tra le stesse ("genome wide"), ha spostato l'accento da una tossicologia descrittiva ad una tossicologia

interpretativa, cioè dall'osservazione e dalla misura di effetti dannosi all'indagine sulla cascata di reazioni innescate da un'esposizione nociva, che portino come risultato finale ad alterazioni patologiche irreversibili (i cosiddetti "pathways of toxicity"). Questo cambiamento di prospettiva è in atto anche nel settore della nanotossicologia, almeno da parte dei laboratori più attrezzati in termini di infrastrutture e capacità di investimenti. A tal fine i modelli sperimentali migliori sono quelli basati su colture cellulari omogenee e ben caratterizzate che annullano la complicazione derivante dai fenomeni di traslocazione e dall'eterogeneità tissutale della maggior parte degli organi bersaglio. Con questi modelli e tecnologie i laboratori più avanzati propongono test di screening ad alte prestazioni ("high content, high throughput") che consentano di affrontare efficacemente la valutazione della crescente quantità e varietà di nanomateriali disponibili sul mercato al fine di una loro iniziale categorizzazione in classi di rischio. Le tecnologie molecolari, accoppiate alla robotizzazione di alcune fasi sperimentali, consentirebbero, infatti, di valutare contemporaneamente molti parametri biologici in risposta a molti materiali diversi. È stata quindi proposta una strategia di caratterizzazione tossicologica a più fasi, in base alle quali, dopo uno screening in vitro ad alte prestazioni, seguirebbero, per i materiali potenzialmente più nocivi, test in vivo di tossicità polmonare acuta ad alte dosi ed eventualmente, per un ristretto numero di materiali, test di esposizione inalatoria cronica a concentrazioni comparabili a quelle

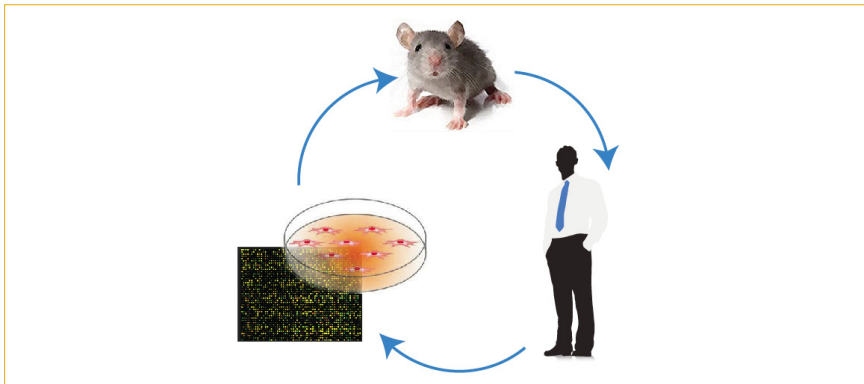


FIGURA 3 Nuove tecnologie “omiche” ad alte prestazioni e alto contenuto di informazioni possono indirizzare un numero limitato di studi con animali da laboratorio, utili per la caratterizzazione della pericolosità di esposizioni umane a nanomateriali

associate ad esposizioni umane (Figura 3).

Standardizzazione, armonizzazione e validazione dei test per la caratterizzazione tossicologica di nanomateriali

Per concludere è importante accennare al percorso in atto sulla standardizzazione, armonizzazione e validazione dei test per la caratterizzazione tossicologica di nanomateriali. Si tratta di un iter normalmente applicato in tossicologia: per essere accettati

a livello internazionale, i dati tossicologici devono essere ottenuti con test eseguiti secondo protocolli ben standardizzati e armonizzati tra i diversi paesi; inoltre, la validazione di un test, cioè la determinazione della specificità e della sensibilità con cui esso permette di predire l'induzione di un effetto nocivo di rilevanza sanitaria (es. quanto un test di citotossicità in vitro su una specifica linea cellulare risulta predittivo della tossicità riscontrata in vivo sull'organo bersaglio, o quanto un test di danno genetico risulta predittivo del potenziale cancerogeno di un composto), è importante

per interpretare correttamente i risultati conseguiti con esso al fine ultimo di salvaguardia della salute umana. L'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE) coordina da molti anni la stesura di Linee Guida per l'esecuzione di test tossicologici, condivise a livello internazionale. Nel 2006 è stato costituito dall'OCSE un gruppo di lavoro specifico per la valutazione dell'impatto di nanomateriali sulla salute umana e sull'ambiente (Working Party on Manufactured Nanomaterials, WPMN). Attualmente il WPMN è impegnato nella valutazione delle Linee Guida vigenti rispetto alla loro adeguatezza per la valutazione di nanomateriali. Gli esperimenti sinora condotti hanno fatto emergere la necessità di modifiche e adattamenti, che sono al momento in fase di consolidamento, e hanno portato alla stesura di alcuni documenti contenenti raccomandazioni per l'esecuzione dei test, che potrebbero essere in futuro implementati in nuove Linee Guida specifiche per la valutazione tossicologica di nanomateriali.

Francesca Pacchierotti,
 Maria Giuseppa Grollino, Giorgio Leter
 ENEA, Unità Tecnica Biologia delle Radiazioni
 e Salute dell'Uomo, Laboratorio di Tossicologia

bibliografia

- [1] <http://www.oecd.org/science/nanosafety>
- [2] OECD. Inhalation toxicity testing: expert meeting on potential revisions to OECD test guidelines and guidance document. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials. No. 35. ENV/JM/MONO(2012)14
- [3] OECD. Guidance on sample preparation and dosimetry for the safety testing of manufactured nanomaterials. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials. No. 36. ENV/JM/MONO(2012)40
- [4] Johnston H., Pojana G., Zuin S., Jacobsen N.R., Moller P., Loft S., Semmler-Behnke M., McGuinness C., Balharry D., Marcomini A., Wallin H., Kreyling W., Donaldson K., Tran L., Stone V. Engineered nanomaterial risk. Lessons learnt from completed toxicology studies: potential solutions to current and future challenges. *Crit Rev Toxicol.* 2013;43(1):1-20
- [5] Nel A., Xia T., Meng H., Wang X., Lin S., Ji Z., Zhang H. Nanomaterial toxicity testing in the 21st century: use of a predictive toxicological approach and high-throughput screening. *Acc Chem Res.* 2013;46(3):607-621
- [6] Seaton A., Tran L., Aitken R., Donaldson K. Nanoparticles, human health hazard and regulation. *J R Soc Interface.* 2010;7:S119-S129
- [7] Som C., Nowack B., Krug H.F., Wick P. Toward the development of decision supporting tools that can be used for safe production and use of nanomaterials. *Acc Chem Res.* 2013;46(3):863-872