



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Scienze Molecolari e Biomolecolari
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF)
SSD CHIM/09

Sistemi Microparticellari Lipidici con proprietà mucoadesive per il trattamento della Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva

IL DOTTORE
ERIKA AMORE

IL COORDINATORE
CH.MA PROF.SSA PATRIZIA DIANA

IL TUTOR
CH.MO PROF. GAETANO GIAMMONA

CICLO XXX
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2018

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Nanoparticelle lipidiche solide (SLN)	4
1.2 Carrier Lipidici Nanostrutturati (NLC)	6
1.3 Microparticelle Solide Lipidiche (SLM)	9
1.4. Tecniche di Preparazione	11
1.4.1 Omogeneizzazione ad alta pressione (a caldo e a freddo).....	11
1.4.2 Tecnica della precipitazione-diffusione del solvente	13
1.4.3 Tecnica della microemulsione.....	13
1.4.4 Tecnica dell'emulsione multipla W/O/W.....	14
1.4.5 Tecnica dello spray drying.....	15
1.5 Caratterizzazione chimico-fisica	16
1.5.1 Dimensione e indice di polidispersità	16
1.5.2 Potenziale zeta (ζ -potential).....	17
1.5.3 Morfologia.....	18
1.5.4 Grado di cristallinità e polimorfismo.....	21
1.5.5 Diametro aerodinamico.....	23
1.6 Caratterizzazione tecnologico-farmaceutica	25
1.6.1 Drug loading (D.L.).....	25
1.6.2 Cinetiche di rilascio.....	27
1.7 Microparticelle solide lipidiche (SLM) per il rilascio modificato di farmaci attraverso la via respiratoria	30
1.7.1 Somministrazione polmonare.....	34
1.7.2 Delivery devices.....	37
2. SCOPO DELLA TESI	40
2.1 La Broncopneumopatia Cronico-Ostruttiva (BPCO)	40
2.1.1 Terapia farmacologica	46
2.2 Corticosteroidi per uso inalatorio (ICS)	47
2.2.1 Fluticasone Propionato (FP)	50
2.3 Broncodilatatori	58

2.3.1 Salmeterolo Xinafoato (SX)	60
2.4 Antiossidanti	65
2.4.1 Acido docosaesaenoico (DHA)	66
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	71
3.1 Microparticelle solide lipidiche (SLM) contenenti fluticasone propionato (FP)	73
3.1.1 SLM preparate in presenza di oligosaccaridi lattato del chitosano allo 0.1% (p/v).....	74
3.1.2 Nanoparticelle cationiche (cSLN) ed SLM preparate con sodio alginato all'1% (p/v).....	75
3.1.3 Analisi tramite microscopia a scansione elettronica (SEM).....	76
3.1.4 Saggio turbidimetrico.....	77
3.1.5 Determinazione della Drug Loading e dell'Efficienza d'Intrappolamento.....	80
3.1.6 Valutazione del diametro aerodinamico delle SLM caricate con FP..	81
3.1.7 Studi di rilascio del FP in PBS a pH 7.4 contenente SDS 0.1% (p/v).	83
3.1.8 Studi di vitalita' cellulare (saggio MTS) delle SLM e delle cSLN caricate con FP.....	85
3.1.9 Effetti delle cSLN e delle SLM caricate con FP sull'espressione del rapporto ERK1/2 sulle cellule 16-HBE.....	87
3.1.10 Valutazione dell'espressione di survivina.....	90
3.2 Microparticelle solide lipidiche (SLM) contenenti salmeterolo xinafoato (SX)	93
3.2.1 Caratterizzazione delle cSLN e delle SLM preparate con sodio alginato all'1% (p/v) contenenti SX.....	94
3.2.2 Saggio turbidimetrico	96
3.2.3 Spettroscopia fotoelettronica a raggi X dei sistemi caricati con SX.....	98
3.2.4 Determinazione della Drug Loading e dell'Efficienza d'Intrappolamento.....	101
3.2.5 Valutazione del diametro aerodinamico delle SLM caricate con SX..	102

3.2.6 Studi di vitalità cellulare (saggio MTS) delle SLM caricate con SX..	103
3.2.7 Valutazione dell'espressione di cAMP dopo trattamento con SX libero e veicolato.....	104
3.3 Microparticelle solide lipidiche (SLM) contenenti l'acido docosaesaenoico (DHA).....	107
3.3.1 SLM preparate in presenza di chitosano (a basso P.M.) contenenti DHA.....	108
3.3.2 Saggio turbidimetrico.....	109
3.3.3 Determinazione della Drug Loading e dell'Efficienza d'Intrappolamento.....	111
3.3.4 Valutazione del diametro aerodinamico delle SLM caricate con DHA	112
3.3.5 Studi di rilascio del DHA in PBS/EtOH 80:20.....	113
3.3.6 Studi di vitalità cellulare (saggio MTS) delle SLM caricate con DHA	115
4. CONCLUSIONI.....	116
5. MATERIALI E METODI.....	122
5.1 Materiali.....	122
5.2 Metodi.....	123
5.2.1 Preparazione di Microparticelle Solide Lipidiche (SLM) in presenza di oligosaccaridi del chitosano contenenti FP.....	123
5.2.2 Preparazione di Microparticelle Solide Lipidiche (SLM) in presenza di sodio alginato contenenti FP.....	124
5.2.3 Preparazione di Microparticelle Solide Lipidiche (SLM) in presenza di sodio alginato contenenti SX.....	126
5.2.4 Preparazione di Microparticelle Solide Lipidiche (SLM) in presenza di chitosano contenenti DHA.....	127
5.2.5 Determinazione delle dimensioni dei sistemi preparati.....	129
5.2.6 Misure di potenziale zeta (ζ - potential).....	130
5.2.7 Analisi SEM.....	130
5.2.8 Saggio turbidimetrico.....	131
5.2.9 Spettroscopia fotoelettronica a raggi X dei sistemi caricati con SX....	131
5.2.10 Analisi cromatografica del Fluticasone Propionato (FP).....	132

5.2.11 Analisi cromatografica del Salmeterolo Xinafoato (SX).....	134
5.2.12 Analisi cromatografica dell'acido docosaesaenoico (DHA).....	135
5.2.13 Determinazione della Drug Loading (FP, SX, DHA) e dell'Efficienza di Intrappolamento delle SLM preparate.....	136
5.2.14 Valutazione del diametro aerodinamico delle SLM caricate con FP,SX e DHA.....	138
5.2.15 Studi di dissoluzione del FP in PBS a pH 7.4 contenente SDS 0.1 % (p/v).....	139
5.2.16 Studi di rilascio del FP in PBS a pH 7.4 contenente SDS 0.1% (p/v)	140
5.2.17 Studi di rilascio del DHA in PBS a pH 7.4/EtOH 80/20 (v/v).....	141
5.2.18 Saggi di vitalità cellulare (saggio MTS) delle SLM caricate con FP...	143
5.2.19 Saggi di vitalità cellulare (saggio MTS) delle SLM caricate con SX..	144
5.2.20 Saggi di vitalità cellulare (saggio MTS) delle SLM caricate con DHA.....	145
5.2.21 Preparazione dell'estratto di fumo di sigaretta (CSE).....	146
5.2.22 Preparazione delle colture epiteliali bronchiali 16-HBE per la valutazione di survivina e p-erk.....	147
5.2.23 Valutazione dell'espressione della survivina tramite analisi citofluorimetrica dopo trattamento con FP libero e veicolato.....	148
5.2.24 Valutazione dell'espressione di p-ERK1/2 tramite western blot dopo trattamento con FP libero e veicolato.....	149
5.2.25 Preparazione delle colture epiteliali bronchiali 16-HBE per la valutazione dell'cAMP.....	150
5.2.26 Valutazione dell'espressione di cAMP dopo trattamento con SX libero e veicolato.....	151
5.3 Analisi statistica.....	152
6. BIBLIOGRAFIA.....	154

1. INTRODUZIONE

Negli ultimi anni la tecnologia farmaceutica ha sviluppato nuovi “drug delivery systems and targeting”, dal momento che la veicolazione e il direzionamento di farmaci in specifici compartimenti del corpo permette la riduzione della dose terapeutica utilizzata e quindi l’insorgenza di minori effetti collaterali (Langer, 1998; Tiwari et al., 2012). Questi sistemi a rilascio modificato proteggono il principio attivo e ne modificano il profilo di rilascio, l’assorbimento, la distribuzione e l’eliminazione. Il farmaco viene così rilasciato in modo controllato, con il vantaggio di indirizzarlo solamente nel sito target, evitando l’accumulo in organi non interessati. Tutto ciò comporta un miglioramento della compliance del paziente. La composizione della matrice è molto importante affinché possa essere ottenuta una cinetica di rilascio del farmaco alle specifiche esigenze. Il rilascio del principio attivo può avvenire per diffusione dalla stessa matrice e/o per disgregazione della matrice stessa. Tra i più noti sistemi di “drug delivery” ricordiamo: le micelle polimeriche, i liposomi, le nano- e micro- particelle polimeriche e lipidiche (W Mehnert, 2001).

Le micelle polimeriche sono sistemi colloidali che si ottengono dall'associazione spontanea in acqua di macromolecole anfifiliche (fig. 1). Tali sistemi permettono di aumentare la solubilità di farmaci scarsamente solubili in mezzi fisiologici, poiché grazie alle loro caratteristiche anfifiliche sono in grado di formare in acqua aggregati del tipo *core-shell*. In questi aggregati, i segmenti lipofili dei polimeri formano il *core*, nel quale può inserirsi il farmaco lipofilo, mentre le porzioni idrofile formano lo *shell*, che resta a contatto con il mezzo acquoso (De Jong & Borm, 2008).

I liposomi furono i primi sistemi ad essere utilizzati negli anni '70 come veicoli di farmaci. Essi sono definiti come vescicole sferiche costituite da fosfolipidi disposti in doppio strato. La loro struttura consente di intrappolare farmaci lipofili all'interno del doppio strato, mentre i farmaci idrofili possono essere solubilizzati nel core acquoso (fig. 1) (Huang et al., 2014).

Il rilascio del farmaco, la stabilità in vivo e la biodistribuzione sono determinati dalle dimensioni, carica superficiale, idrofobicità e fluidità di membrana. Tali sistemi consentono di ridurre gli effetti tossici ed incrementare l'efficacia terapeutica, ma presentano allo

stesso tempo scarsa riproducibilità, instabilità fisica, bassa capacità di intrappolamento e sono poco adatti alla produzione su larga scala.

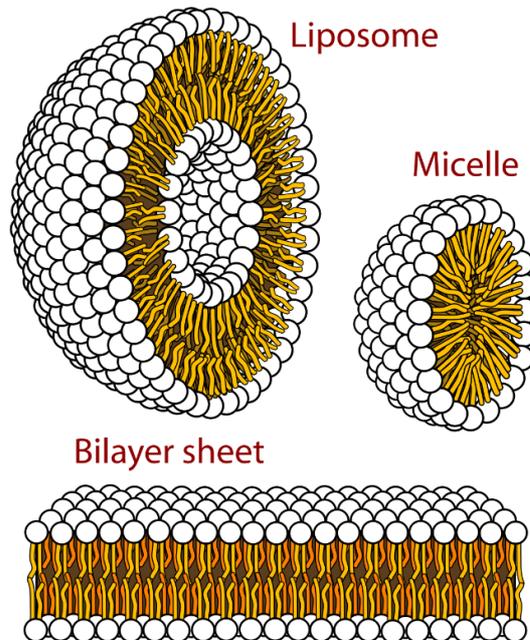


Fig. 1. Rappresentazione schematica di un liposoma e di una micella.

Per tale motivo negli anni '90 furono introdotte le nano- e le micro-particelle lipidiche. Tali sistemi, definiti 'innovativi', consentono di superare gli svantaggi di carriers quali liposomi, sospensioni e sistemi polimerici. Le particelle lipidiche sono costituite da una matrice lipidica solida, sia a temperatura ambiente che alla temperatura fisiologica, stabilizzata da tensioattivi. Essendo costituite da lipidi naturali hanno il vantaggio di essere biocompatibili e di

possedere un basso profilo tossicologico, proprio come i liposomi, ma al contrario di questi sono stabili e possono essere prodotti su larga scala con costi contenuti (De Jong & Borm, 2008; Scalia, Young, & Traini, 2015).

1.1 Nanoparticelle Solide Lipidiche (SLN)

Le nanoparticelle solide lipidiche sono sistemi colloidali, stabilizzati da tensioattivi, con dimensioni comprese tra 10 e 1000 nm e sono preparate utilizzando diversi tipi di lipidi, tra cui trigliceridi puri, complessi misti di gliceridi o cere. Tra i tensioattivi più utilizzati vi sono fosfolipidi, Poloxamers e Polisorbati. La scelta dei lipidi e dei tensioattivi riveste un ruolo importante nel determinare le caratteristiche principali delle nanoparticelle, primo tra tutti il size (le dimensioni) e la carica superficiale. Inoltre la scelta del lipide dipende anche dalle caratteristiche del farmaco da veicolare, in quanto è importante che quest'ultimo sia solubile nel lipide. Il principio attivo può localizzarsi nel core della particella, in prossimità della superficie o può trovarsi disperso nella matrice lipidica. L'utilizzo di nanoparticelle presenta numerosi vantaggi:

- permette il rilascio modificato del farmaco;

- migliora la biodisponibilità di farmaci poco solubili in acqua;
- possibilità di applicazione per diverse vie di somministrazione;
- protezione del farmaco da processi degradativi di tipo chimico, fisico ed enzimatico;
- alta efficienza di intrappolamento del farmaco;
- bassi costi di produzione;
- facile processo di sterilizzazione;
- migliore stabilità rispetto ai liposomi;
- alta biodegradabilità;
- trascurabilità degli effetti tossici (Garud, Singh, & Garud, 2012; Geszke-Moritz & Moritz, 2016).

Le SLN presentano comunque alcuni svantaggi, tra cui la facilità di espulsione del farmaco durante lo stoccaggio, in seguito al passaggio spontaneo della matrice lipidica delle SLN da una forma metastabile α ad una più stabile β (fig. 2). Quest'ultima presenta un più basso contenuto energetico ed è caratterizzata da un reticolo cristallino perfetto (Weber, Zimmer, & Pardeike, 2014).

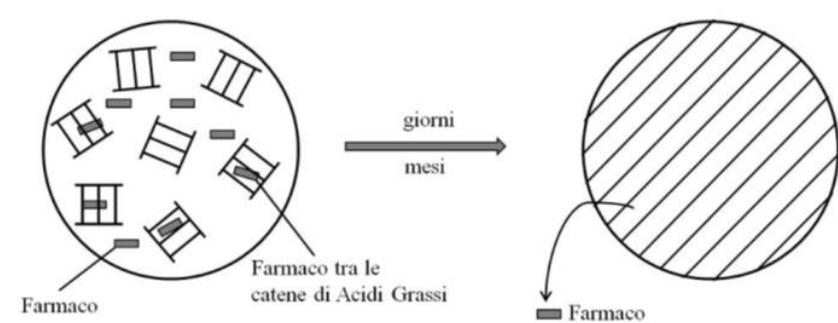


Fig. 2. Processo di espulsione del farmaco durante lo stoccaggio.

Altri svantaggi sono l'elevata polidispersità, la tendenza ad aggregarsi e la bassa capacità di intrappolamento dovuta per lo più alla scarsa solubilità del farmaco nel lipide fuso, alla struttura fisica del lipide solido e al polimorfismo della matrice lipidica (HUO & Zhou, 2007).

1.2 Carrier Lipidici Nanostrutturati (NLC)

I carrier lipidici nanostrutturati sono considerati un'evoluzione delle SLN e sono stati prodotti per superare i problemi di drug-loading e di espulsione del farmaco durante lo stoccaggio. Essi sono costituiti da una miscela di diversi lipidi che formano una matrice meno ordinata e permettono quindi un maggiore caricamento del farmaco e una limitata perdita di p.a. durante il processo di stoccaggio (Weber et al., 2014).

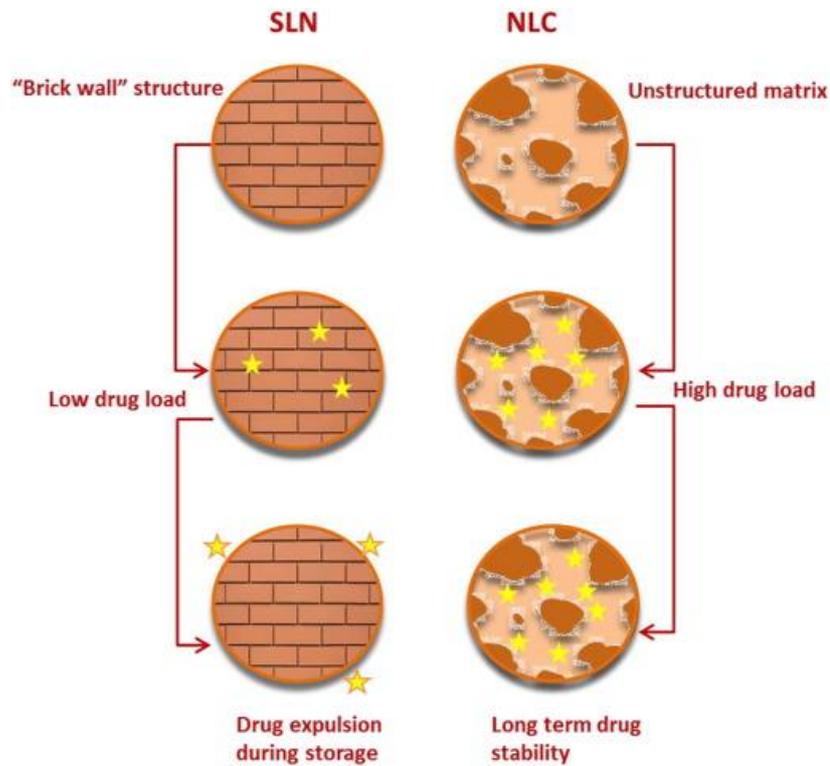


Fig. 3. Illustrazione schematica delle strutture di SLN and NLC.

In base alla composizione e ai parametri di produzione è possibile distinguere le NLC in tre diversi gruppi:

- NLC di tipo imperfetto: sono costituite da lipidi differenti (miscele di gliceridi e acidi grassi diversi). L'uso di tali miscele porta alla realizzazione di NLC in cui i diversi lipidi formano degli spazi tra le catene degli acidi grassi dei gliceridi, generando imperfezioni nel cristallo e quindi una maggiore possibilità di alloggiamento per il farmaco, con conseguente

raggiungimento di sistemi ad elevata drug loading e maggiore stabilità durante la conservazione (fig. 4 (I)).

- NLC di tipo amorfo: si ottengono utilizzando particolari miscele lipidiche, come ad esempio mono- di- e trigliceridi con acidi grassi diversi o a diverso grado di insaturazione. Le particelle, dopo il raffreddamento, diventano solide ma non cristallizzano, evitando così l'espulsione del farmaco causata dalla transizione polimorfa del lipide solido (fig. 4 (II)).
- NLC di tipo multiplo: sono costituite da una matrice solida contenente nanocompartimenti di lipide liquido. Si preparano aggiungendo quantità adeguate di olii alle miscele di lipidi solidi. La differenza di miscibilità dei due lipidi determina la formazione di nanocompartimenti liquidi. Alla temperatura di fusione del lipide solido i due lipidi sono miscibili, mentre durante il processo di raffreddamento, il lipide liquido si separa dal solido, portando alla formazione di minutissime goccioline di olio all'interno della matrice lipidica solida (fig. 4 (III)).
(Tamjidi, Shahedi, Varshosaz, & Nasirpour, 2013)

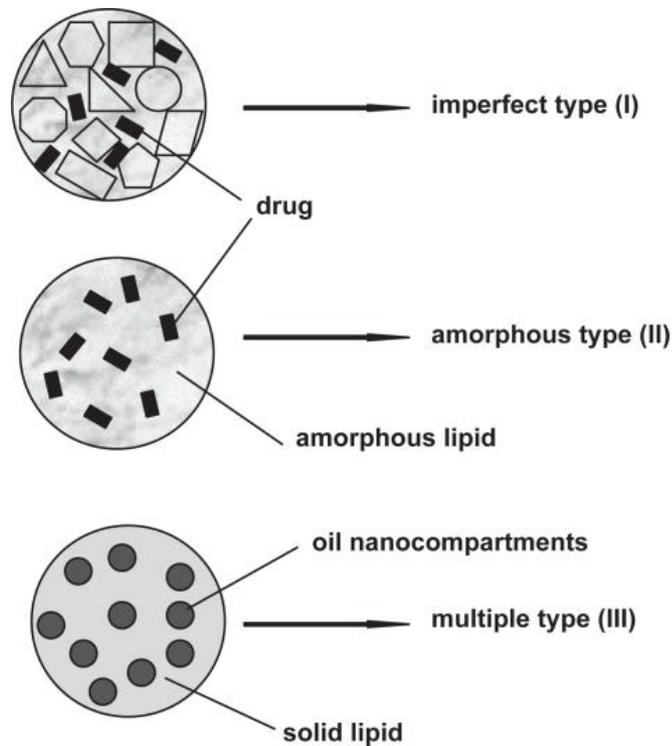


Fig. 4. Illustrazione schematica delle strutture dei diversi tipi di NLC.

1.3 Microparticelle Solide Lipidiche (SLM)

Le microparticelle lipidiche solide, rispetto ai carriers precedentemente descritti, sono caratterizzate da proprietà di rilascio prolungato superiori dovute alle loro maggiori dimensioni, da una migliore stabilità chimico-fisica e da una maggiore capacità di drug loading. Possono essere preparate a partire dagli stessi materiali utilizzati per le SLN, da cui differiscono solo per la dimensione (size). Proprio per questo motivo, inoltre, non sono in grado di oltrepassare le barriere biologiche e si prestano molto bene alla veicolazione di

farmaci che devono espletare un'azione topica, determinando un minore assorbimento del farmaco per via sistemica e quindi una riduzione degli effetti collaterali indesiderati. Questo le rende più idonee per alcune vie di somministrazione quali nasale, polmonare, orale o cutanea (Scalia et al., 2015).

Gli studi condotti in questa tesi sono focalizzati allo sviluppo di sistemi microparticellari lipidici per la veicolazione di farmaci ad azione topica (bronchiale) somministrati per via inalatoria.

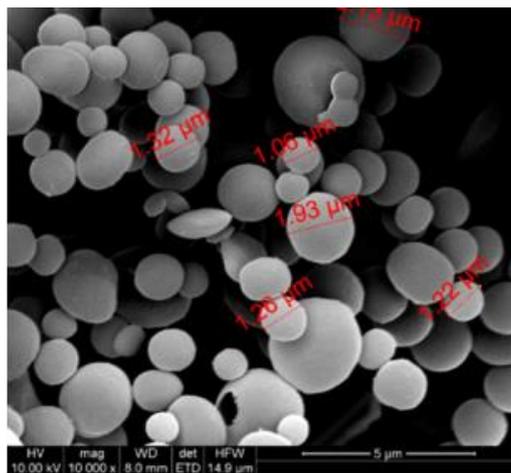


Fig. 5. Immagine al microscopio elettronico a scansione (SEM) di microparticelle lipidiche.

1.4 Tecniche di preparazione

Le nano- e le microparticelle lipidiche possono essere prodotte utilizzando diverse tecniche:

- Omogeneizzazione ad alta pressione (a caldo o a freddo);
- Tecnica della precipitazione-diffusione del solvente;
- Tecnica della microemulsione;
- Tecnica dell'emulsione multipla W/O/W;
- Tecnica dello spray drying.

1.4.1 Omogeneizzazione a caldo ad alta pressione (a caldo o a freddo)

Una delle tecniche più utilizzate a livello industriale è quella dell'omogeneizzazione ad alta pressione, la quale può essere effettuata a caldo o a freddo. In entrambi i casi vi è la preparazione di una pre-emulsione costituita dal lipide fuso contenente il farmaco disperso e i tensioattivi in fase acquosa. Nella tecnica di omogeneizzazione a caldo la fase lipidica viene dispersa in una soluzione acquosa di tensioattivo, precedentemente portata alla stessa temperatura di fusione dei lipidi. Segue una omogeneizzazione ottenuta tramite omogeneizzatori ad alta pressione e successivamente un

raffreddamento per far cristallizzare i lipidi e ottenere le particelle solide lipidiche. Particelle con dimensioni più piccole possono essere ottenute lavorando a temperature più elevate a causa della riduzione della viscosità della fase lipidica. Tale tecnica, prevedendo l'utilizzo di elevate temperature, non può essere utilizzata per il caricamento di farmaci termolabili o idrofili, i quali potrebbero degradarsi o ripartirsi nella fase acquosa durante l'omogeneizzazione. In questi casi si può utilizzare la tecnica a freddo, che prevede il raffreddamento della miscela contenente i lipidi fusi e il farmaco tramite l'ausilio di ghiaccio secco o azoto liquido, con conseguente formazione di microparticelle lipidiche (50-100 μm). Queste ultime vengono successivamente disperse in una soluzione fredda di tensioattivo, fino ad ottenere una pre-sospensione che viene omogeneizzata a temperatura ambiente o inferiore. Le elevate forze cavitazionali applicate alla sospensione permettono la disgregazione delle microparticelle con conseguente formazione di nanoparticelle. Tuttavia i sistemi così ottenuti presentano elevato indice di polidispersità e dimensioni superiori rispetto a quelle ottenute con l'omonima tecnica eseguita a caldo (Garud et al., 2012; HUO & Zhou, 2007; W Mehnert, 2001).

1.4.2 Tecnica della precipitazione-diffusione del solvente

In questo processo al lipide fuso viene aggiunto il farmaco e successivamente una soluzione organica (di solito etanolo) contenente il tensioattivo. La soluzione etanolica calda risultante viene quindi precipitata, sotto agitazione magnetica, in una soluzione acquosa (2-3 °C) contenente il cotensioattivo: la diffusione dell'etanolo nell'acqua determina la precipitazione del lipide e la formazione delle nanoparticelle.

L'eventuale residuo di solvente organico viene allontanato durante il processo di purificazione (Bondi et al., 2015).

1.4.3 Tecnica della microemulsione

Questa tecnica prevede la fusione dei lipidi e l'aggiunta, sotto agitazione magnetica, del farmaco e di soluzioni acquose di tensioattivo e cotensioattivo (generalmente lecitine e sali biliari), preventivamente portate alla stessa temperatura di fusione del lipide. La microemulsione calda così ottenuta viene dispersa in acqua fredda (2-3 °C) mantenendo il sistema sotto agitazione con piastra magnetica o con Ultraturrax.

In genere il rapporto tra i volumi di microemulsione calda e acqua fredda è compreso nel range 1:25-1:50. Il processo di diluizione è fortemente influenzato dalla composizione della microemulsione (Garud et al., 2012).

1.4.4 Tecnica dell'emulsione multipla W/O/W

È una tecnica utilizzata soprattutto per intrappolare farmaci idrofili all'interno di sistemi particellari lipidici. Il processo prevede la solubilizzazione del farmaco in una soluzione di acqua calda, la quale viene aggiunta successivamente, sotto agitazione costante, al lipide fuso contenente un tensioattivo lipofilo. Si ottiene così una emulsione W/O che viene dispersa in una seconda fase acquosa contenente tensioattivi idrofili. Tutto il processo viene effettuato mantenendo sempre il sistema ad una temperatura al di sopra di quella di fusione del lipide. La miscela viene poi raffreddata a temperatura ambiente dando luogo alla formazione dell'emulsione W/O/W. Da questa, per centrifugazione o liofilizzazione, vengono isolate le microparticelle (Garud et al., 2012).

1.4.5 Tecnica dello spray drying

Questa tecnica è comunemente utilizzata per la produzione di particelle per svariate applicazioni, includendo cosmetici, fertilizzanti, coloranti e abrasivi. Inoltre, può essere adattata per creare un ampio spettro di dimensioni di particelle, comprese le microparticelle.

Generalmente, il polimero destinato a formare la maggior parte della particella viene sciolto in un solvente appropriato per formare una soluzione. In alternativa, il materiale può essere sospeso o emulsionato in un non solvente per formare una sospensione o un'emulsione. A questo punto vengono aggiunti altri componenti, ad esempio farmaci o agenti diagnostici. La soluzione viene poi atomizzata per formare una nebbia fine di gocce che entrano immediatamente in una camera di essiccazione dove vengono a contatto con un gas di essiccazione. Il solvente viene quindi evaporato e si ha la formazione delle particelle. Queste ultime vengono caricate elettrostaticamente e raccolte in corrispondenza dell'elettrodo di raccolta.

Con questa tecnica è possibile ottenere particelle con una dimensione compresa tra 300 nm e 5 μm e con un basso indice di polidispersità. (Patil & Sarasija, 2012; "Spray drying method," 2001).

1.5 Caratterizzazione chimico-fisica

La caratterizzazione chimico-fisica dei sistemi preparati è essenziale per il controllo della qualità della formulazione in termini di dimensione, morfologia e stabilità. In particolare i parametri presi in considerazione sono:

- Dimensione e indice di polidispersità (PDI);
- Potenziale Zeta (ζ -potential);
- Morfologia;
- Grado di cristallinità e polimorfismo;
- Diametro aerodinamico.

1.5.1 Dimensione e indice di polidispersità

I metodi più utilizzati per determinare le dimensioni delle nanoparticelle sono la Spettroscopia di Correlazione Fotonica (PCS) e la Diffrazione Laser (LD). La tecnica PCS misura la fluttuazione dell'intensità della luce scatterata causata dal moto browniano delle particelle presenti in dispersione all'interno di una cuvetta. In particolare, particelle più piccole daranno luogo a moti browniani maggiori e quindi l'intensità di luce scatterata sarà maggiore.

Tramite questa tecnica è possibile analizzare particelle aventi dimensioni comprese tra pochi nanometri e 3 μm , ciò significa che la PCS è un buon metodo per caratterizzare le nanoparticelle, ma non è in grado di rivelare microparticelle più grandi. Per queste ultime si può ricorrere al metodo della Diffrazione Laser (D.L.). Questa tecnica sfrutta la dipendenza dell'angolo di diffrazione dal raggio delle particelle: particelle più piccole causano una diffrazione della luce con angoli più grandi e viceversa. Un chiaro vantaggio della D.L. è la copertura di una vasta gamma di dimensioni, da 0.1 a 1000 μm (Garud et al., 2012; Jaspert, Piel, Delattre, & Evrard, 2005; Pardeshi et al., 2012; Scalia et al., 2015).

L'indice di polidispersità o PDI, determinato anch'esso tramite tecnica PCS, fornisce informazioni sulla formazione di una o più popolazioni di nanoparticelle differenti tra loro per il range di appartenenza. Valori di PDI inferiori a 0.3 indicano che il sistema in considerazione è omogeneo (Scalia et al., 2015).

1.5.2 Potenziale Zeta (ζ -potential)

Il potenziale zeta è definito come la differenza di potenziale tra la superficie dello strato più esterno della particella (slipping plane) e

la zona elettricamente neutra. E' tipico delle particelle cariche disperse in un mezzo (acquoso e non) ed è considerato un importante indice di stabilità in quanto influenza le interazioni elettrostatiche tra le particelle in sospensione (Scalia et al., 2015). Particelle con elevata carica superficiale (positiva o negativa) si respingono, mentre particelle con bassa carica superficiale, in valore assoluto, tendono a formare aggregati.

Valori di ζ -potential (positivo o negativo) intorno a 25-30 mV sono di solito associati ad un'elevata stabilità della dispersione nanoparticellare (Garud et al., 2012; Scalia et al., 2015; Tamjidi et al., 2013).

1.5.3 Morfologia

La morfologia superficiale delle particelle lipidiche può essere determinata tramite l'utilizzo di due tecniche: la SEM (Microscopia Elettronica a Scansione) e la TEM (Microscopia Elettronica a Trasmissione). La SEM permette di fare un'analisi molto dettagliata della superficie particellare e permette di visualizzare anche la presenza di eventuali agglomerati. L'unico limite risiede nel basso numero di particelle analizzabili (intorno a 300-500). Il Microscopio a

Scansione Elettronica sfrutta come sorgente di radiazioni un fascio di elettroni generato da un cannone elettrodico (catodo) situato sulla sommità della colonna. Tale fascio, condensato da lenti collimatrici e focalizzato sul campione, è attratto verso l'anodo. Il campione viene preventivamente trattato sottovuoto con polvere di oro al fine di renderlo conducibile. Il fascio elettronico colpisce il campione producendo elettroni secondari e retrodiffusi. I segnali elettrici ottenuti vengono amplificati, convertiti in pixels ed elaborati da un computer.

La TEM permette di ottenere da un campione sufficientemente assottigliato ($< 0.1\mu\text{m}$), immagini ad alta risoluzione prodotte da elettroni ad alta energia (100 KeV) trasmessi su uno schermo fluorescente o su una pellicola fotografica. Le immagini vengono generate usando elettroni al posto della luce visibile che viene usata nel microscopio ottico. Ciò permette un ingrandimento con elevata risoluzione fino a 800 volte maggiore rispetto al microscopio ottico (Reimer & Kohl, 2008).

Un'analisi molto dettagliata ad alta risoluzione può essere effettuata anche con la XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy). Tale tecnica si basa sull'emissione degli elettroni degli orbitali più profondi

(quelli più vicini al nucleo e quindi più fortemente legati) da parte del materiale analizzato, in risposta ad una irradiazione fotonica ad alta energia. Questi elettroni sono emessi ad una energia ben definita e caratteristica per ogni specie chimica e ciò consente una identificazione dettagliata del materiale fornendo informazioni, oltre che sul polimorfismo e sulla morfologia di superficie, anche sul livello di distribuzione del principio attivo sulla particella. Inoltre questa tecnica fornisce informazioni sulla presenza di gruppi funzionali e sul tipo di legami tra gli atomi in superficie (Jaspart et al., 2005; Scalia et al., 2015).

Un'altra tecnica molto utilizzata è la microscopia a forza atomica (AFM), la quale, rispetto alle tecniche precedentemente descritte, fornisce un profilo tridimensionale del campione. Inoltre tale tecnica non richiede nessun trattamento speciale del campione (metallizzazione o grafitizzazione) e la maggior parte delle modalità operative possono essere effettuate in ambiente normale o in ambiente liquido e non necessariamente sottovuoto (Das & Chaudhury, 2011).

1.5.4 Grado di cristallinità e polimorfismo

Un altro parametro importante da considerare è la caratterizzazione dello stato cristallino della matrice lipidica e del suo polimorfismo, poiché eventuali transizioni polimorfe potrebbero condizionare la quantità di farmaco totale incorporata nel sistema e le cinetiche di rilascio. I metodi utilizzati sono principalmente la DSC (calorimetria a scansione differenziale) e la diffrazione a raggi X.

La DSC sfrutta le entalpie di fusione e la variazione del punto di fusione che si verifica in seguito a modificazioni dei lipidi. Al campione viene quindi applicato un gradiente di temperatura e viene misurata la temperatura di transizione e la variazione entalpica associata ad essa. I processi esotermici, come la cristallizzazione, vengono rilevati da una deflessione che è indice di un decremento del flusso di calore; al contrario, per i fenomeni endotermici come la fusione, si osserverà sul termogramma un picco rivolto verso l'alto che corrisponde all'aumento del flusso di calore (fig. 6).

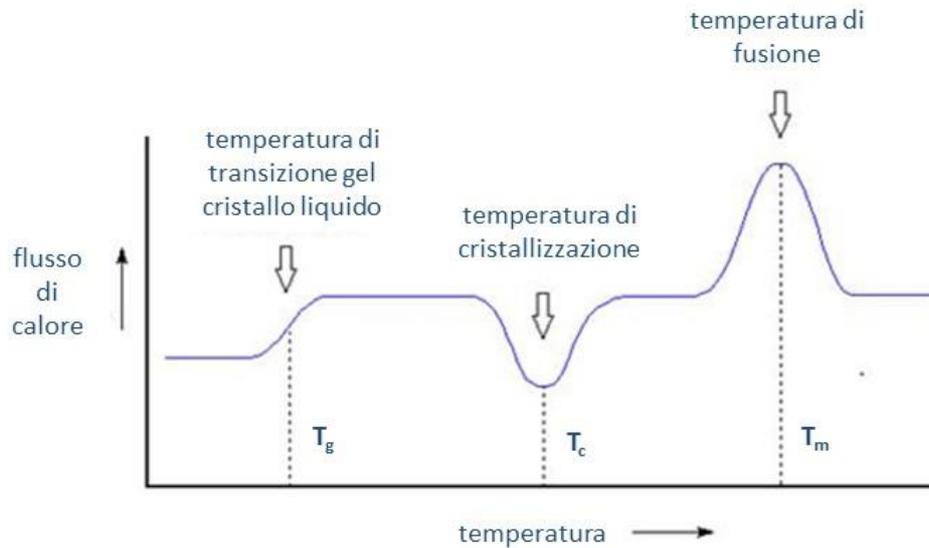


Fig. 6. Variazioni del flusso di calore tra le termocoppie in base al tipo di modificazione chimico-fisica subita dal campione sottoposto a riscaldamento costante.

La diffrazione a raggi X sfrutta invece la capacità dei cristalli lipidici di diffrangere i raggi X in maniera specifica, poiché l'intensità e la posizione delle diffrazioni sono tipiche di ogni struttura cristallina. Il campione viene analizzato comparando il suo valore di intensità con quello di una struttura polimorfica nota (standard) andando così a misurare eventuali variazioni nell'intensità del segnale o nella posizione nello spettro. (Jaspart et al., 2005; Wolfgang Mehnert & Mäder, 2012; Scalia et al., 2015).

1.5.5 Diametro aerodinamico

Il diametro aerodinamico rappresenta uno dei parametri fondamentali da tenere in considerazione per le somministrazioni inalatorie, dal momento che il diametro geometrico delle particelle, da solo, non è sufficiente a prevedere il sito di deposizione delle particelle all'interno del distretto polmonare. Questo parametro è definito come il diametro di una particella sferica avente densità unitaria (1g/cm^3) e comportamento aerodinamico uguale (stessa velocità di sedimentazione in aria) alla particella considerata. Tale valore tiene conto della forma delle particelle, della densità e della dimensione fisica.

Il diametro aerodinamico teorico può essere calcolato sulla base della seguente equazione:

$$d_{\text{aer}} = \sqrt{\frac{\rho_{\text{part}}}{\chi\rho_0}} d_v$$

dove d_v è il diametro geometrico della particella sferica a densità unitaria, ρ_{part} è la densità della particella considerata, ρ_0 è la densità della particella di 1g/cm^3 e χ rappresenta il parametro della forma dinamica ed equivale ad 1 nel caso di sfere perfette (Jaspart et al., 2007; Loira-Pastoriza & Todoroff, 2014).

Generalmente, particelle con diametro aerodinamico inferiore ad 1 μm raggiungono le vie respiratorie periferiche, ma depositano una quantità di farmaco più bassa rispetto a particelle più grandi che sono in grado di rilasciare quantità di farmaco superiori, ma sulle vie aeree più grandi e centrali (Labiris & Dolovich, 2003).

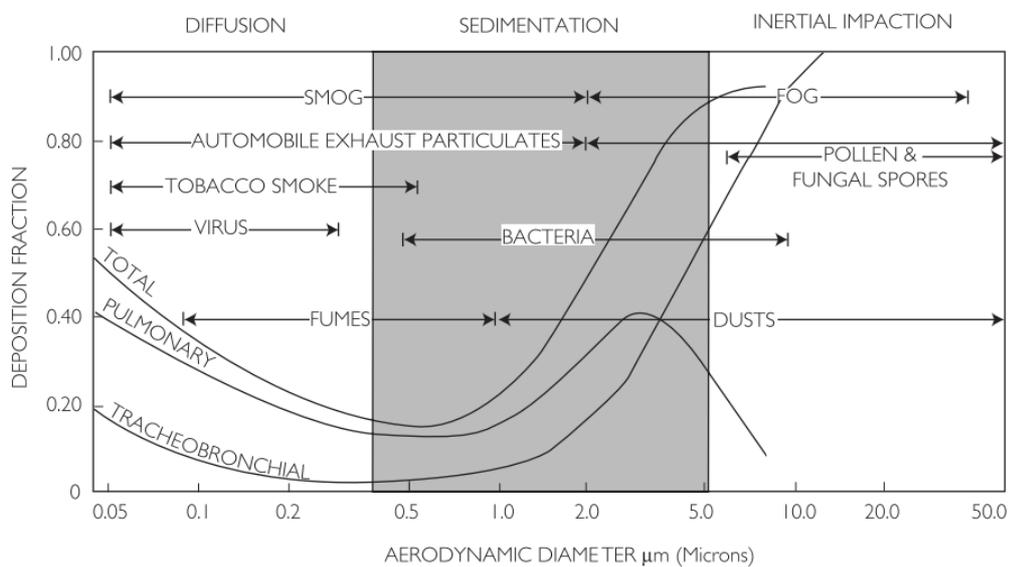


Fig. 7. Relazione tra dimensione delle particelle e deposizione polmonare

1.6 Caratterizzazione tecnologico-farmaceutica

Oltre alla caratterizzazione chimico-fisica le nano- e microparticelle vengono caratterizzate anche in termini di drug loading (capacità di caricamento del farmaco) e cinetiche di rilascio del farmaco.

1.6.1 Drug Loading (D.L.)

La Drug Loading rappresenta la quantità di farmaco, espressa in % (p/p), incorporata all'interno della matrice lipidica. Essa è influenzata da diversi fattori:

- Solubilità del farmaco nel lipide fuso;
- La natura del lipide (i lipidi che formano reticoli cristallini ordinati presentano una bassa capacità d'intrappolamento). È preferibile utilizzare delle miscele di mono-, di- e trigliceridi che producono una struttura più disordinata, creando più spazio per la sistemazione del p.a.;
- Stato polimorfo del lipide. Durante il processo di solidificazione della matrice e la produzione delle particelle, il lipide può cristallizzare in diverse forme polimorfe conosciute come α (instabile), β' e β stabile. All'aumentare della stabilità, aumenta

anche l'ordine del reticolo cristallino e di conseguenza si riduce lo spazio d'incorporazione per il farmaco;

- Metodo di preparazione delle particelle, che può influenzare sia la capacità di carico (es. l'omogeneizzazione a freddo consente una D.L.% maggiore rispetto all'omogeneizzazione a caldo) che la distribuzione del farmaco all'interno della particella;
- Lo stato fisico in cui il p.a. viene disperso (se solido o in soluzione);
- Le dimensioni delle particelle (SLM presentano una maggiore D.L. rispetto alle SLN) (Jaspart et al., 2005; Scalia et al., 2015);
- La quantità di farmaco utilizzata nella preparativa;
- Il pH della fase acquosa poiché molti farmaci sono acidi e basi deboli e quindi la loro ripartizione tra fase lipidica e acquosa è funzione proprio del pH della fase acquosa (HUO & Zhou, 2007; Jaspart et al., 2005; Wolfgang Mehnert & Mäder, 2012; Müller, Mäder, & Gohla, 2000; Pardeshi et al., 2012; Scalia et al., 2015).

1.6.2 Cinetiche di rilascio

Lo studio delle cinetiche di rilascio fornisce informazioni sulla velocità e sulla capacità di rilascio del farmaco da parte del sistema particellare nel tempo; esso risulta quindi essenziale per verificare il controlled release dei carriers. I volumi di mezzo di rilascio vengono valutati ad hoc in modo da assicurare che tutto il farmaco rilasciato sia solubilizzato (condizioni sink). Il mezzo di rilascio varia in base al mezzo fisiologico che si vuole mimare (tampono fosfato a pH 7.4 per le preparazioni che vengono progettate per una somministrazione di tipo parenterale, pH 1.1 e 6.8 per le somministrazioni di tipo orale, etc...). Molto spesso nei mezzi di rilascio vengono addizionati tensioattivi per garantire una completa solubilizzazione del farmaco rilasciato (questo soprattutto per i farmaci con elevata lipofilia che presentano una bassissima solubilità nei mezzi acquosi utilizzati per i rilasci).

In letteratura sono riportati 3 modelli d'incorporazione del farmaco nella matrice lipidica (fig 8):

- Solid solution model (modello a soluzione solida), in cui il farmaco è omogeneamente disperso in tutta la matrice lipidica. È caratterizzato da una cinetica di rilascio prolungata con un

minimo effetto burst (rilascio in pochi minuti di alte concentrazioni di farmaco) (fig. 8a);

- Shell-model in cui il farmaco si dispone principalmente sul guscio esterno della particella. È caratterizzato da un rapido rilascio del farmaco e da un elevato effetto burst (fig. 8b);
- Core-model (fig. 8c) in cui il farmaco viene incorporato nel core (nucleo) della particella. È caratterizzato da un iniziale rilascio di alte concentrazioni di farmaco (burst effect), seguito da un rilascio lento e prolungato nel tempo.

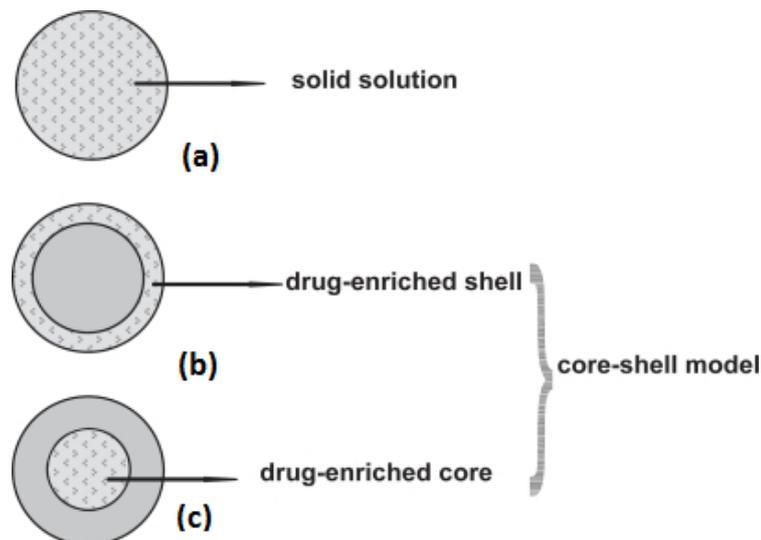


Fig. 8. Modelli d'incorporazione del farmaco all'interno della particella lipidica.

Nella figura sottostante (fig. 9) è mostrato un esempio di burst release iniziale seguito da un rilascio controllato.

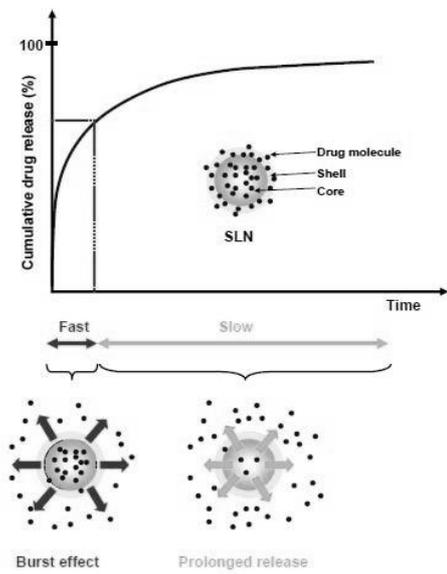


Fig. 9. Curva di rilascio di un farmaco da una SLN: burst effect e rilascio prolungato.

1.7 Microparticelle solide lipidiche (SLM) per il rilascio modificato di farmaci attraverso la via respiratoria

Il rilascio di farmaci per via inalatoria rappresenta una strategia promettente per il trattamento di diverse patologie respiratorie come l'allergia, l'asma e la broncopneumopatia cronico ostruttiva (BPCO), dal momento che consente la somministrazione di dosi elevate di farmaco direttamente al sito target, riducendo al minimo l'esposizione sistemica e la tossicità associata a somministrazione orale o endovenosa. Tuttavia, l'efficacia terapeutica dei farmaci per via inalatoria è spesso limitata dalla rapida clearance del sito d'azione a causa dell'assorbimento sistemico o della degradazione metabolica nei polmoni (Ibrahim & Garcia-Contreras, 2013; Loira-Pastoriza & Todoroff, 2014; Olsson et al., 2011; Popov, Schopf, Bourassa, & Chen, 2016); ciò comporta dosaggi frequenti e insorgenza di maggiori effetti collaterali.

Negli ultimi anni le microparticelle solide lipidiche (SLM) hanno destato un notevole interesse proprio a causa della loro elevata applicabilità. Esse, rispetto alle SLN (nanoparticelle solide lipidiche), sono caratterizzate da proprietà di rilascio prolungato superiori dovute

alle loro maggiori dimensioni, da una migliore stabilità chimico-fisica e da una maggiore capacità di Drug Loading. Le SLM, a causa delle loro dimensioni, non sono in grado di oltrepassare le barriere biologiche e si prestano molto bene alla veicolazione di farmaci che devono espletare un'azione topica, determinando una riduzione degli effetti collaterali indesiderati. Il destino dei sistemi particellari inalati dipende dalla loro zona di distribuzione all'interno dell'apparato respiratorio. Il primo fattore che influenza la deposizione delle particelle a livello polmonare è il diametro aereodinamico (Sakagami, 2006). In letteratura è riportato il range dimensionale ottimale che garantisce una deposizione efficace all'interno dell'albero bronchiale, ed esso è compreso tra 1 e 5 μm . Infatti particelle con valori dimensionali maggiori (tra 5 e 10 μm) tendono a depositarsi principalmente nell'orofaringe, mentre particelle con un diametro ≤ 1 μm (≤ 0.5 μm) sono in grado di raggiungere gli alveoli (fig. 10) (Liang, Ni, Zhou, & Mao, 2015; Sakagami, 2006; Umerska, Mouzouvi, Bigot, & Saulnier, 2015). Per tale motivo i sistemi microparticellari rappresentano oggi il sistema ideale per il trattamento topico di patologie respiratorie (Amore et al., 2017).

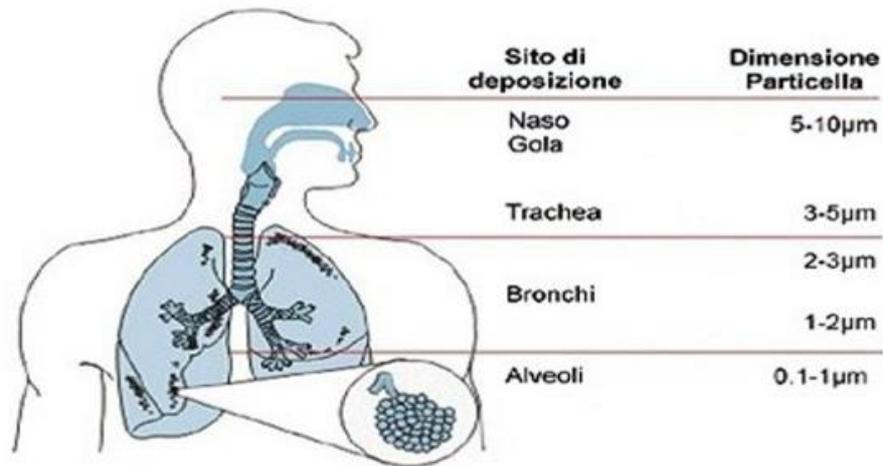


Fig. 10. Distribuzione delle particelle lipidiche a livello dell'apparato respiratorio in funzione delle dimensioni.

Dopo inalazione le particelle possono depositarsi all'interno dell'apparato respiratorio con tre meccanismi diversi:

- **Impatto inerziale:** caratteristico delle microparticelle (o aggregati nanoparticellari) con peso elevato e con diametro $\geq 5 \mu\text{m}$. L'impatto inerziale si produce proprio perché, a causa delle dimensioni, le particelle non riescono a seguire i rapidi cambi d'aria che si verificano all'interno dell'orofaringe e nelle vie aeree superiori, depositandosi così a livello delle biforcazioni;

- **Sedimentazione gravitazionale:** esclusivo di particelle con diametro inferiore ai $5 \mu\text{m}$. E' il tipico deposito del tessuto di conduzione (bronchioli e alveoli) dove vi è una bassa velocità di flusso;

- Diffusione browniana: tipico di particelle con diametro inferiore ai 5 μm e sottoposte ai moti browniani. Avviene nel tessuto di conduzione e negli alveoli dove il flusso è minimo.

- Attrazione elettrostatica: dovuta all'interazione elettrostatica tra le pareti e le particelle inalate (Liang et al., 2015; Loira-Pastoriza & Todoroff, 2014; Weber et al., 2014).

Le particelle inalate vengono infine eliminate con diversi processi che dipendono dalla solubilità della particella nei fluidi, dal diametro e dalla zona di deposizione. Le particelle insolubili, depositate a livello delle vie aeree superiori, vengono eliminate entro 24-48 ore grazie al movimento del muco sull'epitelio ciliato che trasporta le particelle fino alla glottide, dove vengono disciolte o espettorate. Le particelle che si trovano invece nelle vie aeree più basse possono essere eliminate per internalizzazione all'interno di fagociti e macrofagi quando insolubili, oppure tramite penetrazione attraverso l'epitelio e trasferimento in linfa o circolo sanguigno, quando solubili (Liang et al., 2015; Weber et al., 2014).

1.7.1 Somministrazione polmonare

La terapia inalatoria consente il trattamento di patologie sia di tipo locale che sistemico. Come si evince in figura 11, l'inalazione orale può essere mirata alle vie respiratorie (punti 1, 2 e 3) o essere destinata al rilascio del farmaco, attraverso i polmoni, al cuore (4), al cervello (5) e/o alla circolazione sistemica (6). La somministrazione di farmaci attraverso i polmoni risulta particolarmente efficace per il rilascio di molecole con difficoltà farmacocinetiche orali e/o soggette al metabolismo di primo passaggio epatico (de Kruijf & Ehrhardt, 2017).

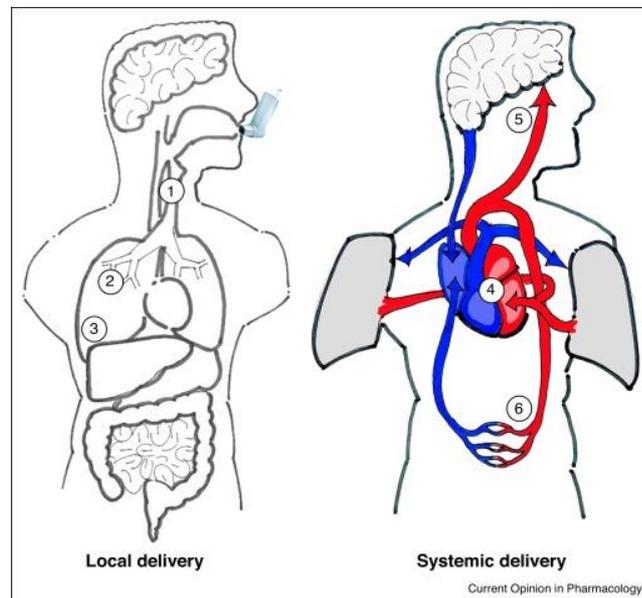


Fig. 11. Rilascio locale o sistemico attraverso la via inalatoria.

Per il trattamento di patologie polmonari la terapia inalatoria consente di ottenere maggiori concentrazioni di farmaco in loco, minimizzando gli effetti collaterali rispetto ai farmaci assunti per via sistemica. Essa si presta bene alla somministrazione di farmaci gassosi o volatili (anestetici generali), ma anche a farmaci presenti sotto forma di particelle solide disperse (polverizzate) o liquide. Tramite questa via di somministrazione il farmaco arriva direttamente al sito desiderato con la possibilità di utilizzare una dose molto inferiore rispetto ad altre vie di somministrazioni come la via orale o parenterale. Inoltre, la bassa attività metabolica dei polmoni permette un assorbimento sistemico, evitando gli effetti di stasi gastrica o le alterazioni dipendenti dal pH.

L'apparato respiratorio è costituito da una zona di conduzione comprendente cavità nasali, nasofaringe, trachea, bronchi, bronchioli e da una zona respiratoria costituita dalla parte terminale dei bronchioli e dagli alveoli. Presenta un'elevata area superficiale compresa tra i 100 e i 140 m² (Jaspart et al., 2007) e presenta una consistente vascolarizzazione di circa 5 l/min. Dal punto di vista epiteliale, le vie aeree presentano marcate differenze (fig. 12): trachea, bronchi e bronchioli sono costituiti da un epitelio respiratorio ciliato e ricoperto

da uno strato superficiale di muco. Le ciglia presenti in questa zona svolgono un importante ruolo nello spostamento del muco e delle particelle inalate verso la faringe, dove possono essere ingerite o eliminate. A livello alveolare, invece, l'epitelio è costituito da pneumociti di tipo I e presenta un rivestimento composto da tensioattivi e caratterizzato da uno spessore di circa 0.1-0.2 μm . Al di sotto di questo sono presenti vasi linfatici e sanguigni ed è proprio in questa zona che avvengono tutti gli scambi gassosi e l'assorbimento dei farmaci che raggiungono così il circolo sistemico (Liang et al., 2015; Weber et al., 2014).

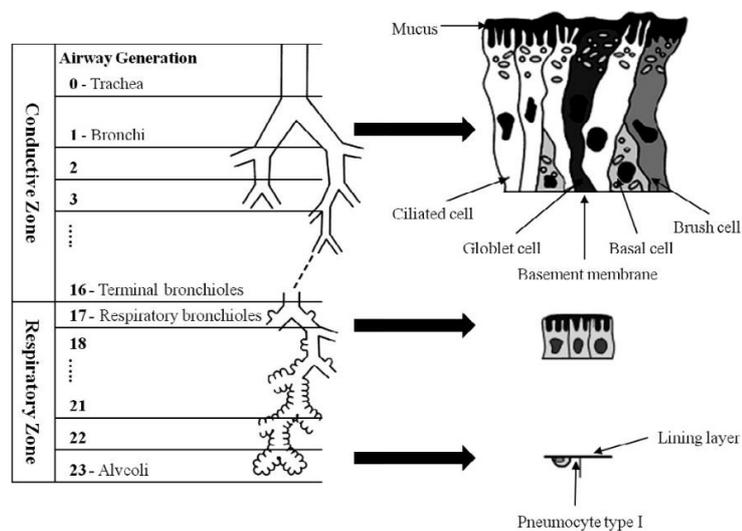


Fig. 12. Differenze nella struttura epiteliale dell'albero bronchiale.

1.7.2 Delivery devices

I sistemi utilizzati per il rilascio dei farmaci attraverso la via inalatoria, per potere essere impiegati in terapia, devono rispettare alcuni criteri:

- Essere costituiti da particelle con diametro inferiore ai 10 μ m (ideale compreso tra 0.5-5 μ m);
- Produrre dosi di farmaco riproducibili;
- Proteggere la stabilità chimico-fisica del farmaco;
- Essere semplici da utilizzare.

Tra i *devices* utilizzati per ottenere un adeguato deposito polmonare troviamo: nebulizzatori, inalatori a dose controllata (MDI) e inalatori a polvere secca (DPI).

Nebulizzatori

I nebulizzatori sono stati tra i primi *devices* ad essere utilizzati nella terapia inalatoria; essi generano aerosol a partire da sospensioni o soluzioni di farmaci in appropriati solventi. Nelle soluzioni il principio attivo è disciolto in un solvente con formazione di una fase omogenea, mentre per i farmaci insolubili si utilizza la sospensione e

quindi un sistema eterogeneo. Nel nebulizzatore a getto d'aria l'aerosol è formato attraverso un flusso d'aria ad alta velocità, generata da una sorgente pressurizzata direzionata contro un sottile strato di soluzione liquida. Il nebulizzatore ultrasonico, invece, utilizza la vibrazione di un cristallo piezoelettrico per generare le goccioline (Steckel & Eskandar, 2003).

Inalatori a dose controllata (MDI)

Sono attualmente tra i più utilizzati per la somministrazione inalatoria di farmaci e sono disponibili commercialmente come pressurizzati. Il farmaco all'interno del contenitore viene mescolato con un propellente (gli idrofluoroalcani (HFA hanno sostituito già da diversi anni i clorofluorocarburi (CFC)) e tale miscela, in seguito all'attivazione del *device*, viene espulsa in quantità standardizzate (Day, Brodie, & Corris, 2000; Khale, 2011). Il propellente viene quindi utilizzato come fonte di energia per espellere la formulazione dalla valvola e come mezzo disperdente per il farmaco e gli altri eccipienti.

Tali devices richiedono una buona coordinazione fra l'erogazione dell'aerosol e l'atto inspiratorio, che devono avvenire

contemporaneamente. Per tale motivo gli aerosol dosati presentano dei limiti sia nei bambini che negli anziani.

Inalatori a polvere secca (DPI)

Questi inalatori sono utilizzati in terapia fin dagli anni '50 e sono attivati direttamente dal respiro del paziente. Infatti, il farmaco è inalato nello stesso momento in cui il paziente inspira, sono facili da utilizzare e non richiedono propellenti dannosi per l'ambiente. Distinguiamo *devices* a singola dose dove il meccanismo base è costituito dalla foratura della capsula contenente il principio attivo e dalla conseguente inspirazione del paziente e *devices* a dose multipla, i quali contengono una grossa quantità di farmaco, “*reservoir*”, rilasciata in dosi terapeutiche dopo ciascuna attivazione (Berger, 2009; Hess, 2012; Khassawneh et al., 2008).

2. SCOPO DELLA TESI

Durante il mio dottorato di ricerca mi sono occupata della progettazione, preparazione e caratterizzazione di Microparticelle Solide Lipidiche (SLM) per il rilascio controllato e direzionato a livello bronchiale di farmaci (corticosteroidi, broncodilatatori e antiossidanti), utili nel trattamento della Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO). Inoltre, in collaborazione con il gruppo di pneumologia dell'Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare del CNR di Palermo, ho avuto modo di valutare da un punto di vista biologico tutti i sistemi da me preparati maturando così un'esperienza multidisciplinare nel settore della tecnologia farmaceutica applicata al trattamento delle patologie respiratorie.

2.1 La Broncopneumopatia Cronico-Ostruttiva (BPCO)

La broncopneumopatia cronico ostruttiva (BPCO) è una malattia polmonare caratterizzata da un'ostruzione progressiva delle vie aeree che non è completamente reversibile ed è associata ad una anormale risposta infiammatoria a particelle o gas inquinanti. Essa rappresenta al momento la quarta causa di morte

nel mondo, ma le proiezioni la pongono al terzo posto tra le cause di morte entro il 2020 (Lozano et al., 2012).

Sebbene la spirometria sia essenziale per stabilire la presenza di limitazioni del flusso d'aria e per la diagnosi della BPCO, non è sufficiente a valutare da sola l'impatto e la gravità della malattia. Infatti, per un'efficace gestione a lungo termine della malattia è necessaria una valutazione clinica e funzionale completa, comprendente la valutazione delle condizioni di comorbidità che interessano il paziente (Marco et al., 2017).

La ridotta capacità di generare flussi espiratori, nei pazienti affetti da BPCO, è il risultato di una complessa interazione tra meccanismi respiratori anormali, tra cui l'ostruzione delle vie aeree periferiche e il ridotto ritorno elastico polmonare.

L'assunzione di fumo di sigaretta e l'inalazione di particelle nocive sono considerati i principali fattori di rischio nell'insorgenza della malattia, tuttavia solo il 25% dei fumatori sembrerebbe contrarre la BPCO, indicando la possibile presenza di fattori genetici o epigenetici che ne predispongono allo sviluppo.

Le principali caratteristiche della BPCO sono:

- Ostruzione delle vie aeree in seguito all'aumentata contrazione della muscolatura liscia ivi presente, con conseguente riduzione del lume (fig. 13);
- Aumento delle secrezioni di muco e processi di rimodellamento delle basse vie aeree in seguito a fenomeni di iperplasia da parte delle cellule dell'epitelio.

Ne deriva la perdita del ritorno elastico tissutale ed eventi enfisematosi che provocano distruzione del parenchima, distruzione dei setti alveolari e conseguente riduzione del FEV₁ (volume di espirazione forzata in un secondo), insufficiente riempimento e iper-insufflazione polmonare.

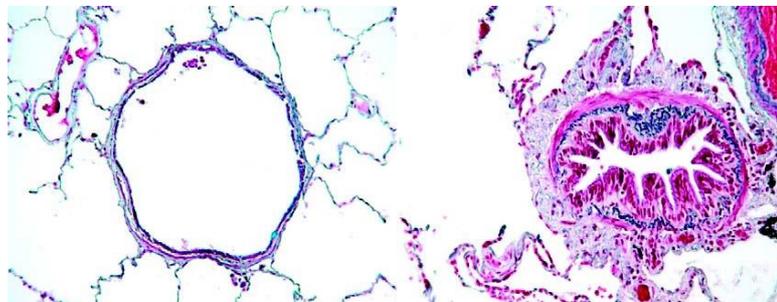


Fig. 13. Rappresentazione di una via aerea di un soggetto sano (a sinistra), messa a confronto con la via aerea di un soggetto malato di BPCO. Notare il massiccio inspessimento della via aerea causato dai vari processi infiammatori e riparativi.

Come accennato in precedenza, il principale promotore della BPCO è il fumo di sigaretta, che produce un danno diretto a

livello epiteliale provocando, per attivazione dei recettori epiteliali (TLR) 4 e 2, l'innescò di processi infiammatori non specifici. In seguito all'attivazione, sono rilasciate citochine quali $TNF\alpha$, LTB_4 , IL-1 e IL-8 che provocano il richiamo nel sito infiammato di neutrofili, macrofagi e cellule dendritiche, le quali rilasciano enzimi proteolitici e specie reattive dell'ossigeno che promuovono infine il danno tissutale (Decramer, Janssens, & Miravittles, 2012). A livello del parenchima polmonare ritroviamo anche un'alta distribuzione di linfociti T, principalmente della specie citotossica $CD8+$, che provocano citolisi e apoptosi. In letteratura è indicata una correlazione tra numero di cellule T, gravità dell'ostruzione delle basse vie respiratorie e distruzione alveolare.

Le cellule epiteliali in pazienti affetti da BPCO presentano un'aumentata espressione delle chemochine CXCL9, CXCL10 e CXCL11 che legano con grande affinità il recettore chemochina CXCR3 presente sulla superficie dei linfociti T (Peter J. Barnes, 2000). Spesso l'aumento di cellule T può essere causato da eventi infettivi delle basse vie respiratorie che provocano a loro volta l'aumento di linfociti T $CD8+$ e $CD4+$ con successiva produzione di anticorpi da parte delle cellule B (fig. 14) (Decramer et al.,

2012). Queste cellule B sembrerebbero implicate anche nell'eliminazione delle proteine carbonilate prodotte in seguito a stress ossidativo durante l'evento infiammatorio (Peter J. Barnes, 2000; Durham, Caramori, Chung, & Adcock, 2016).

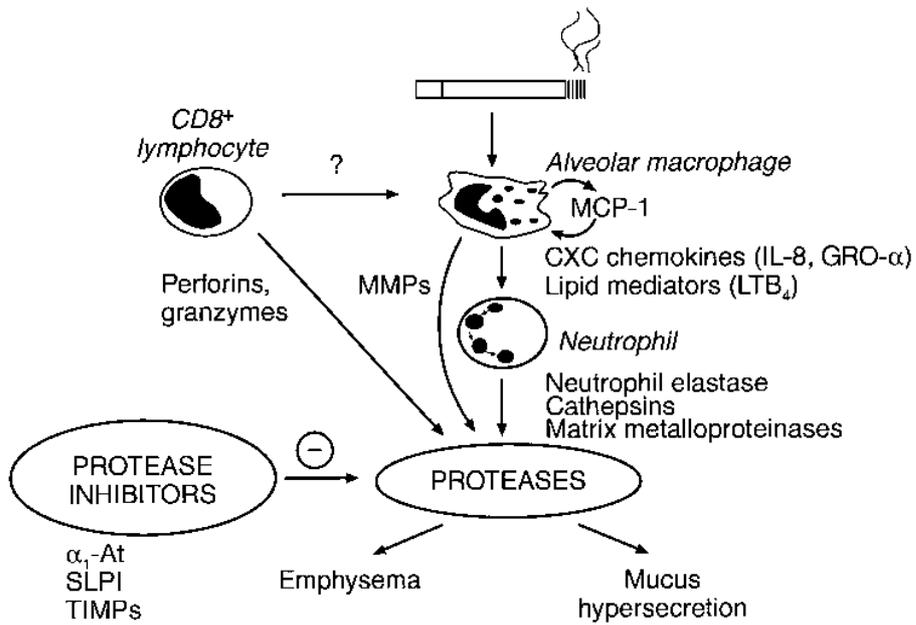


Fig. 14. Illustrazione schematica del meccanismo infiammatorio nella BPCO.

La BPCO, se non trattata adeguatamente, determina la comparsa di diversi effetti indesiderati quali incremento di tosse, dispnea, polmoniti, embolie polmonari e produzione di espettorato, spesso purulento. Si riduce inoltre la qualità della vita dei pazienti e aumenta il rischio di morte. Molto comuni sono gli eventi di comorbilità quali ischemie, diabete, atrofia muscolare

scheletrica, cachessia, osteoporosi, depressione e cancro (Decramer et al., 2012). I pazienti affetti da BPCO, presentando difficoltà respiratorie, non svolgono normalmente un adeguato esercizio fisico e questo porta allo sviluppo o/e aggravamento di malattie cardiovascolari. Inoltre, in letteratura è ampiamente riportato che tale patologia causa un aumento della concentrazione di proteine pro-infiammatorie che determina un aumento della produzione di fibrinogeno, con conseguente rischio di produzione di trombi e di danni a livello cardiovascolare (“Inhaled corticosteroid/long-acting bronchodilator treatment mitigates STEMI clinical presentation in COPD patients,” 2017).

Peraltro, l'elevata attività piastrinica nei pazienti affetti può portare a formazione di aggregati piastrine-monociti e quindi aterotrombosi.

2.1.1 Terapia farmacologica

La terapia farmacologica per il trattamento della BPCO viene utilizzata per ridurre i sintomi, la frequenza e la gravità delle riacutizzazioni, migliorare la tolleranza allo sforzo e lo stato di salute. Ad oggi, non vi è alcuna evidenza conclusiva di studi clinici che i farmaci disponibili per la BPCO possano modificare il declino a lungo termine della funzione polmonare. Le classi di farmaci attualmente utilizzate in terapia sono:

- Corticosteroidi per via inalatoria (ICS) in combinazione con broncodilatatori ad azione prolungata;
- Antibiotici;
- Mucolitici (mucocinetici, mucoregolatori) e agenti antiossidanti (N-acetilcisteina, carbocisteina).

Inoltre, in alcuni casi viene consigliata anche la vaccinazione antinfluenzale, poiché quest'ultima può ridurre il tasso di patologie gravi, come infezioni del tratto respiratorio inferiore, che richiedono ospedalizzazione. In particolare, la vaccinazione antipneumococcica, PCV13 e PPSV23, è raccomandata per tutti i pazienti ≥ 65 anni di età. Il PPSV23 è anche raccomandato per pazienti più giovani affetti da BPCO con comorbidità significative

cardiache croniche o polmonari (Alfageme et al., 2006; Tomczyk et al., 2014).

2.2 Corticosteroidi per uso inalatorio (ICS)

I corticosteroidi per uso inalatorio sono farmaci steroidei che vengono assunti per via aerea al fine di ottenere effetti antinfiammatori a livello polmonare. Agiscono mediante inibizione diretta da parte del complesso recettore-glucocorticoide (GR-GC) di AP-1 ed NF- κ B e relativo blocco dei processi flogistici. Il p.a. viene somministrato con l'ausilio di strumenti dosatori quali nebulizzatori, MDI (Metered Dose Inhaler) e DPI (Dry Powder Inhaler) e una volta depositato a livello polmonare, il farmaco permane per diverso tempo nelle vie aeree, in funzione della sua lipofilia. Ad un alto valore di log P corrisponde una bassa velocità di dissoluzione, minori effetti sistemici, ma anche una maggiore reattività da parte del sistema mucociliare che riconosce le particelle di farmaco non disciolto come estranee eliminandole. Di contro una minore lipofilia aumenta l'attività del farmaco, ma anche la sua distribuzione sistemica e i conseguenti effetti indesiderati. Inoltre durante la somministrazione, una parte di

farmaco assunto può ritrovarsi a livello gastro-intestinale (G.I.) e produrre diversi effetti collaterali (fig. 15) (Duane D. Miller, Robert W. Brueggemeier, 2009; Hochhaus, 2007; Montuschi, 2016).

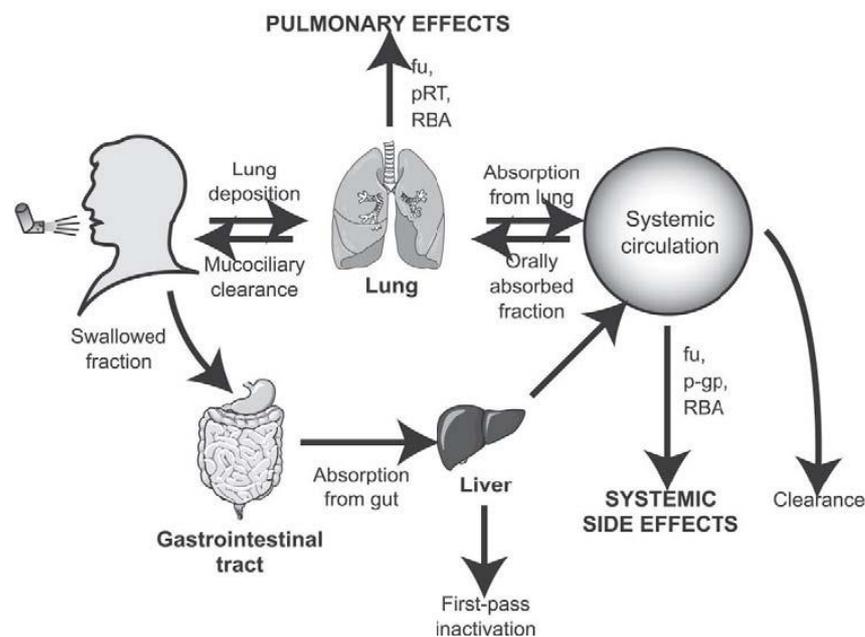


Fig. 15. Percorso schematico di un ICS. Oltre la quota assorbita per via G.I., gli effetti collaterali possono essere prodotti anche dall'assorbimento polmonare.

In molti pazienti affetti da BPCO sono stati riscontrati fenomeni di resistenza all'attività indotta dagli ICS che sembrerebbero essere attribuiti a variazioni indotte dalla patologia nel microambiente cellulare, come ad esempio alterazioni dei recettori GR, azioni a valle mediate da citochine, ipossia e stress ossidativo. Quest'ultimo sembra essere il principale induttore della

resistenza agli ICS; infatti nei malati di BPCO risulta fortemente ridotto un enzima reclutato direttamente dagli ICS, ovvero l'enzima HDAC2 (istone deacetilasi-2), che ha la funzione di deacetilare gli istoni e quindi di bloccare l'espressione di proteine pro-infiammatorie (fig. 16). L'inibizione di HDAC-2 è prodotta dall'enzima PI3K- δ , una chinasi attivata proprio dagli eventi ossidativi (Mario Cazzola, Rogliani, Novelli, & Matera, 2013; Durham et al., 2016; Hochhaus, 2007; Parente, 2016).

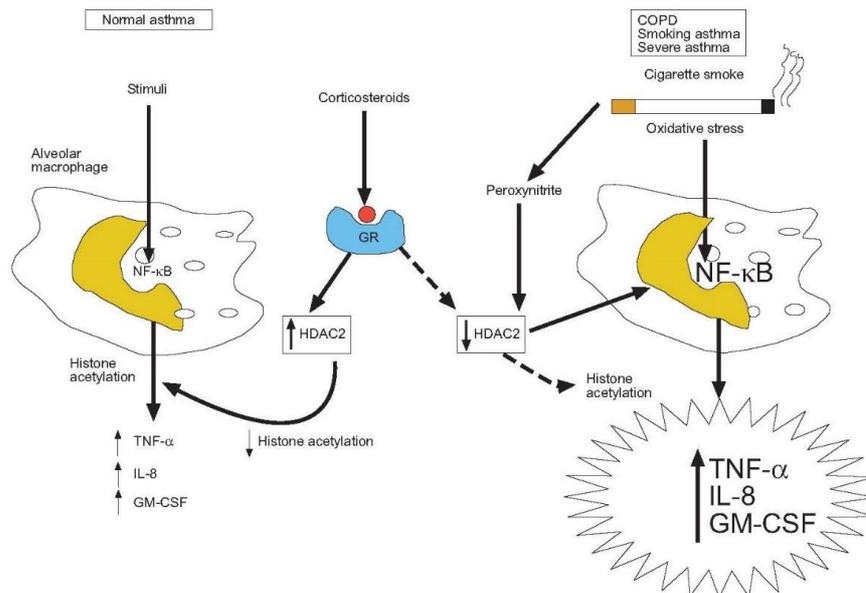


Fig. 16. Riduzione dell'enzima HDAC-2 a causa dello stress ossidativo indotto da BPCO, fumo di sigaretta e asma grave (a destra). Questo riduce l'effetto antinfiammatorio degli ICS. A sinistra è illustrata l'attivazione da parte del legame GC-GR dell'enzima HDAC-2 in un soggetto normale o con asma lieve. (P J Barnes, 2006).

2.2.1. Fluticasone Propionato (FP)

Il fluticasone propionato (FP) è un trifluoro derivato appartenente alla classe dei glucocorticoidi (fig. 17). Presenta un log P pari a 3.4 e una bassa biodisponibilità orale (< 1%); l'assorbimento polmonare è piuttosto lento a causa dell'elevata lipofilia della molecola stessa e la biodisponibilità polmonare, fortemente influenzata dal tipo di carrier adoperato, oscilla tra il 16 e il 30%.

IL FP è caratterizzato da un ampio volume di distribuzione (318 L, in accordo con l'elevata lipofilia e il tempo di residenza a livello polmonare) e da un'emivita dopo inalazione di circa 10 ore. (Derendorf, Hochhaus, Meibohm, Möllmann, & Barth, 1998; Duane D. Miller, Robert W. Brueggemeier, 2009).

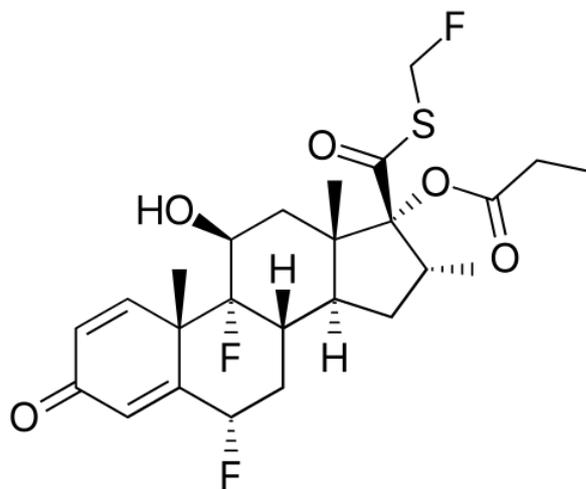


Fig. 17. Struttura molecolare del fluticasone propionato.

Esso presenta un'altissima affinità per il recettore GR (fig. 18) e, una volta raggiunto il circolo sistemico, si lega per l'80-90% alle proteine plasmatiche (Hochhaus, 2007; Umerska et al., 2015). La quota di farmaco che raggiunge il tratto G.I. è soggetta all'effetto di primo passaggio epatico e risulta inattivata per il 99% (Patlolla et al., 2010).

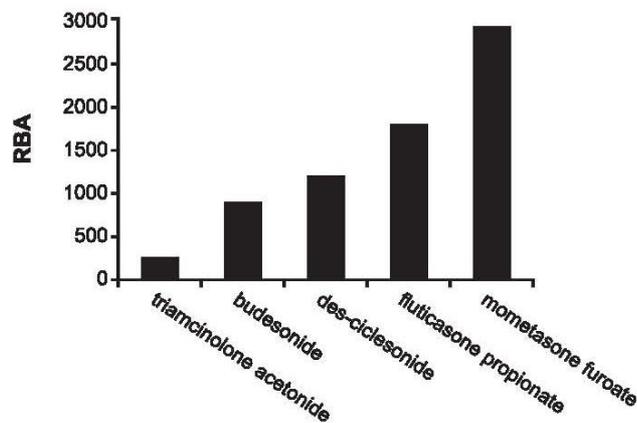


Fig. 18. Affinità per i recettori GR di alcuni ICS. Il valore per il FP è circa 1800 RBA (Receptor Binding Affinities).

Il meccanismo d'azione del fluticasone propionato si esplica a livello nucleare, in seguito al suo ingresso per diffusione nella cellula. In quest'ultima è presente infatti il recettore per i glucocorticoidi (GR), di cui si conoscono due diverse isoforme: una denominata GR_β (forma inattiva che sembrerebbe contribuire al fenomeno di resistenza tissutale ai glucocorticoidi) e l'altra denominata GR_α che, in assenza dell'ormone, si trova in forma inattiva, come eterodimero con due

proteine appartenenti alla famiglia delle heat shock protein (hsp), hsp90 e hsp56. Il cambiamento di conformazione indotto dal legame tra recettore GR_{α} e ormone (o farmaco) provoca il distacco delle isoforme hsp sopradescritte e la produzione di un omodimero GR_{α} - GR_{α} -ormone. Quest'ultimo trasloca nel nucleo dove interagisce con specifiche sequenze di DNA chiamate GRE che sono classificate, in funzione della loro attività di promotori o inibitori dell'espressione genica, rispettivamente $GRE_{positivi}$ e $GRE_{negativi}$ (fig. 19).

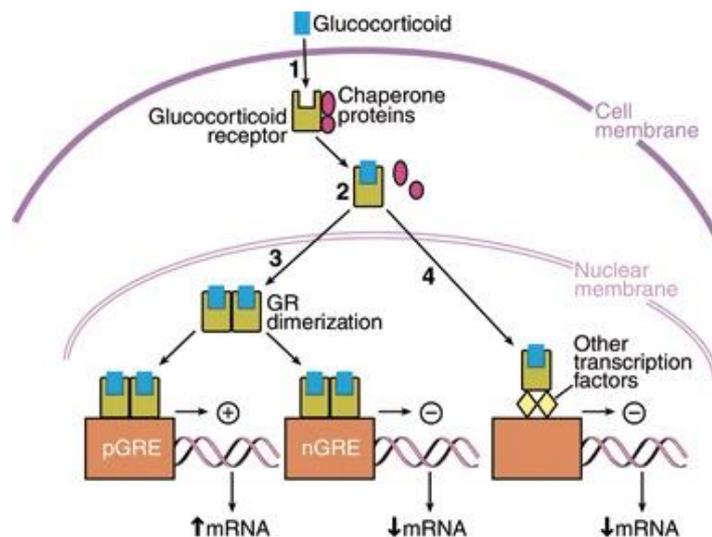


Fig. 19. Meccanismo d'azione dei glucocorticoidi.

Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che la regolazione dell'espressione genica da parte dei glucocorticoidi dipende dallo stato di acetilazione degli istoni prodotto dall'attività di cofattori enzimatici

con attività acetiltransferasica, quali HAT (istone acetiltransferasi) e HDAC (istone deacetilasi) (fig. 20) (Parente, 2016; Rhen & Cidlowski, 2005).

L'effetto antiflogistico è il principale effetto terapeutico attribuito ai farmaci corticosteroidi. Infatti queste molecole sono in grado d'inibire l'attività trascrizionale dei fattori di crescita AP-1 ed NF- κ B, responsabili della sintesi di chemochine, citochine, interleuchine e fattori pro-infiammatori. Questo processo d'inibizione avviene attraverso tre meccanismi che prevedono:

- Formazione di un legame diretto proteina-proteina tra l'isoforma α di GR e i due fattori di crescita (senza interazione diretta con il DNA);
- Formazione di un legame diretto con i coattivatori acetiltransferasici (HAT), quali pCAF, CBP o CREB, che provocano l'acetilazione degli istoni e sono quindi essenziali per la trascrizione di NF- κ B e AP-1 (fig. 20);
- Attivazione da parte del GR $_{\alpha}$ della proteina specifica I κ B $_{\alpha}$, che ha la funzione di mantenere NF- κ B in forma inattiva.

L'inibizione dei fattori di crescita non è comunque l'unica attività antinfiammatoria dei glucocorticoidi. Infatti questi, tramite

attivazione di GRE positive, sono in grado di stimolare la sintesi di proteine antinfiammatorie come l'annessina-1, che blocca la formazione di fosfolipasi A-2 e di conseguenza la cascata dell'acido arachidonico. Inoltre inducono la sintesi di MAPK fosfatasi-1, in grado di defosforilare tutte le MAPKs, responsabili della produzione di fosfolipasi-A2 e la jun-k, responsabile della produzione a monte di AP-1.

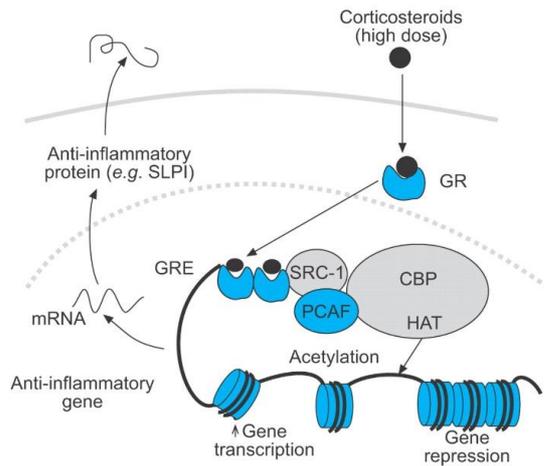


Fig. 20. Processo di acetilazione da parte del cofattore CBP ad attività HAT (istone acetiltransferasi). Nel caso illustrato in figura, il complesso GC-GR lega CBP portando all'acetilazione degli istoni e al legame con GRE positiva, che provoca la sintesi di proteine antinfiammatorie.

Sono infine in grado di indurre la sintesi della proteina GILZ (Glucocorticoid-induced Leucine Zipper), responsabile anch'essa dell'inibizione delle MAPKs e quindi del blocco degli eventi derivati dall'attivazione dei fattori di crescita.

Inoltre, il recettore GR_{α} attivato è in grado di interagire con i processi di replicazione genica anche legando sequenze GRE negative, sia come omodimero che come monomero; questo provoca l'inibizione di geni che codificano per ormoni quali CRH, POMC, osteocalcina e cheratina (fig. 21).

Tramite i meccanismi discussi fino ad ora, è chiaro come i glucocorticoidi siano in grado di inibire ogni aspetto del processo flogistico, riducendo edema, vasodilatazione, febbre e migrazione cellulare.

Nonostante il loro elevato valore terapeutico come antinfiammatori, questi farmaci presentano importanti effetti collaterali, soprattutto se somministrati per lunghi periodi di tempo, a causa delle alte dosi che possono raggiungere il circolo sistemico durante la terapia. Tali effetti indesiderati derivano dalla loro forte interazione con i processi di regolazione genica legati proprio all'attivazione di sequenze $GRE_{negative}$ (fig. 21). Tra i più comuni effetti collaterali ricordiamo l'azione immunosoppressiva con conseguente suscettibilità alle infezioni, aumento della risposta alle catecolamine (per incremento della sintesi di β_2), riduzione della protezione a livello gastrico e conseguente ulcera gastro-duodenale,

effetti simili a quelli causati da una iperproduzione di mineralcorticoidi e soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, soprattutto quando somministrati per lunghi periodi di tempo. Sono spesso stati riscontrati anche eventi di osteoporosi per inversione del rapporto osteoblasti/osteoclasti ed effetti cutanei per inibizione della sintesi di collagene I e III (Parente, 2016; Rhen & Cidlowski, 2005).

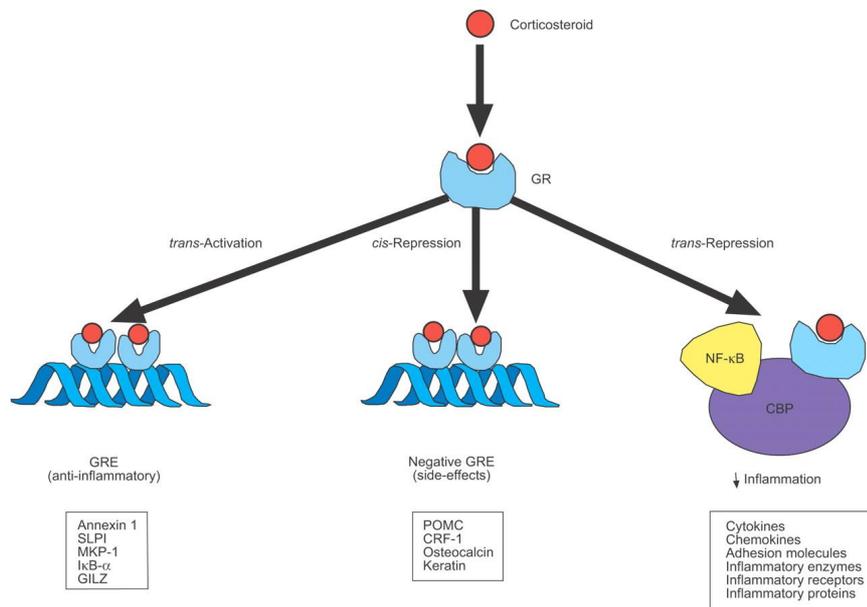


Fig. 21. Eventi derivanti dall'attivazione di GREpositivi (effetti antinfiammatori), GREnegativi (principali effetti collaterali) e dall'inibizione diretta di fattori di crescita (es. NF-κB).

Alla luce di quanto detto finora, risulta evidente come l'utilizzo di un sistema per il rilascio controllato e direzionato a livello bronchiale, possa ridurre fortemente gli effetti collaterali descritti sopra, derivanti dal passaggio del farmaco nel circolo sistemico. La

preparazione di SLM di opportune dimensioni (2.5-5 μm) potrebbe consentire deposizione del p.a. veicolato a livello dei bronchi secondari, impedendone così la diffusione a livello alveolare e quindi la comparsa di effetti collaterali sistemici.

2.3 Broncodilatatori

I broncodilatatori appartengono a differenti classi di farmaci, con altrettanti diversi meccanismi d'azione, e sono responsabili del rilassamento della muscolatura liscia delle vie respiratorie. In generale è possibile identificare i seguenti broncodilatatori:

- β 2-agonisti breve durata d'azione (SABA);
- β 2-agonisti a lunga durata d'azione (LABA);
- Antimuscarinici o anticolinergici (LAMA);
- Metilxantine (teofillina).

I β 2-agonisti a breve durata d'azione vengono utilizzati per un rapido controllo dei sintomi. L'insorgenza d'azione avviene entro cinque minuti dall'assunzione e l'effetto massimo viene raggiunto entro 30-60 minuti. Questi farmaci non sono in grado di ridurre l'infiammazione caratteristica delle vie aeree e vengono usati per lo più per alleviare i sintomi al bisogno e ridurre il broncospasmo da sforzo. La frequenza di utilizzo non dovrebbe superare i due giorni a settimana.

La somministrazione di un β 2-agonista a lunga durata d'azione, invece, migliora la funzione polmonare, i sintomi e le riacutizzazioni, e riduce il ricorso a una terapia d'emergenza a base di un beta2-

agonista a breve durata d'azione. Questi farmaci sono disponibili in commercio, nella maggioranza dei casi, in associazione ad uno steroide inalatorio (Mario Cazzola & Matera, 2014; Ricciardolo, Blasi, Centanni, & Rogliani, 2015).

Le linee guida per il trattamento della BPCO, emesse dall'Iniziativa Globale su Malattie ostruttive polmonari (linee guida GOLD, 2009) e dall'Istituto Nazionale di Salute e di Eccellenza Clinica (NICE) (National Clinical Guideline Center, 2010), raccomandano l'uso di β -2 agonisti a lunga durata quando la malattia è diagnosticata e l'aggiunta di corticosteroidi inalatori o di altri broncodilatatori a lunga durata quando la malattia progredisce e raggiunge uno stadio più severo (Cave & Hurst, 2011).

2.3.1 Salmeterolo Xinafoato (SX)

Nel 1990, una sostituzione a livello della catena laterale del salbutamolo (SABA) ha portato alla sintesi del salmeterolo, primo agonista β -2 selettivo a lunga durata d'azione, con effetto di broncodilatazione fino a 12 ore.

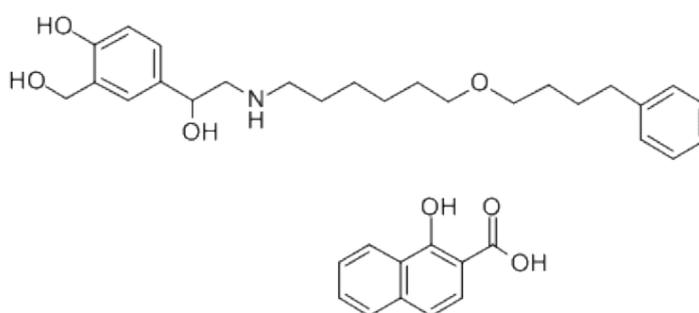


Fig. 22. Struttura molecolare del Salmeterolo Xinafoato.

Il meccanismo d'azione dei β -2 agonisti selettivi presuppone l'interazione con i recettori β -adrenergici, proteine integrali di membrana a sette domini accoppiati a proteine G. In seguito all'interazione tra agonista e specifico recettore (V e VI dominio transmembrana) si verifica una modificazione conformazionale con attivazione delle proteine GS (stimolatrici) che a loro volta determinano un'attivazione diretta dei canali al k Ca dipendenti, oppure una stimolazione dell'adenilato ciclasi cui consegue un aumento dell'AMP ciclico intracellulare, responsabile a sua volta

dell'attivazione di due protein chinasi (PKA,PKG). In particolare, la PKA provoca l'inattivazione, mediante fosforilazione, della chinasi delle catene leggere della miosina e quindi determina la riduzione dell'interazione actina-miosina, con conseguente rilassamento della muscolatura liscia bronchiale.

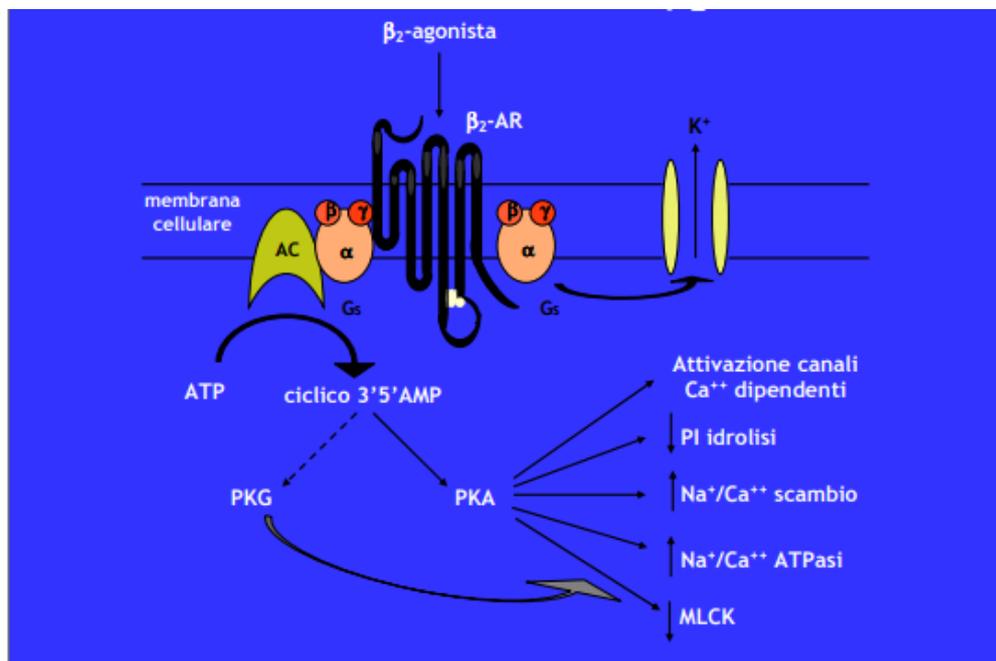


Fig. 23. Meccanismo d'azione dei beta-2 agonisti.

I beta-2 agonisti inducono broncodilatazione attraverso la stimolazione diretta dei recettori beta2 adrenergici localizzati a livello della muscolatura liscia delle vie aeree, oppure possono determinare broncodilatazione in maniera indiretta attraverso l'inibizione del rilascio di mediatori della broncostrizione da parte di cellule

infiammatorie e di neurotrasmettitori liberati dalle fibre nervose localizzate a livello delle vie aeree (Johnson, 2001).

Tali farmaci aumentano la clearance muco-ciliare, che risulta alterata nell'asma, promuovendo la secrezione mucosa da parte delle ghiandole sottomucose e il trasporto di ioni lungo l'epitelio delle vie aeree.

Inoltre, i β -2 agonisti riducono la permeabilità capillare e, quindi, la comparsa di edema della mucosa bronchiale dopo esposizione a mediatori come l'istamina.

Le reazioni avverse dei β -2 agonisti sono in gran parte dovute alla stimolazione dei recettori β -2 extrabronchiali. Ai normali dosaggi terapeutici, infatti, la terapia con β -2 agonisti a lunga durata d'azione può determinare stimolazione cardiovascolare (tachicardia, extrasistoli), tremori muscolari e ipopotassiemia. Tali eventi sono legati alla stimolazione diretta dei β -recettori cardiaci e in parte ad una attivazione simpatica riflessa conseguente a vasodilatazione sistemica.

I tremori muscolari rappresentano la reazione avversa più comune e sono dovuti alla stimolazione dei recettori β -2 localizzati a livello della muscolatura scheletrica. L'ipopotassiemia, invece, è dovuta prevalentemente all'attivazione delle pompe NA/K-ATPasi

annesse alle varie membrane cellulari contenenti i recettori β -2 e rappresenta sicuramente la reazione endocrino-metabolica di maggior rilievo.

Altri eventi metabolici sono rappresentati da iperglicemia e aumento dei corpi chetonici nel plasma (M Cazzola & Donner, 2000; Jetzer, Morrical, Fergenson, & Imanidis, 2017; Santus et al., 2015).

L'esposizione cronica ai farmaci agonisti β -2 adrenergici selettivi può portare a tolleranza farmacologica per desensibilizzazione recettoriale (down regulation). Tale fenomeno si verifica in seguito a tre processi principali:

- Disaccoppiamento dei recettori dall'adenilato-ciclasi;
- Internalizzazione dei recettori disgiunti;
- Fosforilazione dei recettori interni.

La portata della desensibilizzazione dipende dal grado e dalla durata della risposta agonistica e inoltre, essendo questo un processo associato all'efficacia del farmaco, segue che un agonista parziale come il salmeterolo risulti meno incline ad indurre desensibilizzazione recettoriale rispetto ad un agonista pieno come il formoterolo (Johnson, n.d.; Oehme et al., 2015).

In letteratura è ampiamente dimostrata la sinergia tra glucocorticoidi e β -2 agonisti. In uno studio condotto dall'Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare del CNR di Palermo, in collaborazione con l'INSERM U454 di Montpellier, infatti, è stato dimostrato come la combinazione di fluticasone propionato e salmeterolo aumenti significativamente l'apoptosi delle cellule periferiche T (PBT), che risulta ridotta in patologie come l'asma e la BPCO. Tale sinergia è associata ad un'attivazione più efficiente delle caspasi -8 e -3 e ad una maggiore traslocazione nucleare del recettore per i glucocorticoidi (GR) (Pace et al., 2004).

2.4 Antiossidanti

Lo stress ossidativo polmonare svolge un ruolo patogenetico importante in diverse malattie, tra cui la lesione polmonare acuta (ALI), la sindrome da stress respiratorio acuto (ARDS), l'iperossia, il trapianto di polmone e la BPCO. Le specie di ossigeno reattivo (ROS), rilasciate da macrofagi attivati e leucociti o formate nelle cellule epiteliali ed endoteliali polmonari, danneggiano i polmoni e danno inizio a reazioni pro-infiammatorie a cascata che caratterizzano lo stress a livello polmonare e sistemico. Diverse molecole tra cui piccoli composti organici (ad esempio glutazione, tocoferolo (vitamina E), flavonoidi) funzionano come antiossidanti naturali, riducendo i componenti cellulari ossidati ed eliminando i prodotti tossici. Inoltre, farmaci mucolitici come N-acetil-L-cisteina e polifenoli alimentari (curcumina, resveratrolo, tè verde, catechine/ quercetina), sono utilizzati per controllare l'attivazione del fattore nucleare NF- κ B, la regolazione dei geni della biosintesi di glutazione, il rimodellamento della cromatina e quindi l'espressione del gene infiammatorio. Gli enzimi antiossidanti possono facilitare queste reazioni antiossidanti (per esempio le perossidasi che utilizzano il glutazione come agente riducente) o

decomporre direttamente i ROS (ad esempio la superossido dismutasi [SOD] e catalasi).

La somministrazione di piccoli antiossidanti attraverso le vie orali, intratracheali e vascolari per il trattamento dello stress ossidativo, a breve e lungo termine, ha mostrato modesti effetti protettivi negli studi sugli animali e sull'uomo. Attualmente sono impiegati diversi sistemi per la somministrazione di antiossidanti (tra cui i liposomi) e tali sistemi sono stati sperimentati principalmente in animali e, in piccola misura, nell'uomo. Ulteriori studi sono tuttavia necessari per sviluppare e stabilire applicazioni efficaci di antiossidanti polmonari utili nella pratica clinica (Christofidou-Solomidou & Muzykantov, 2006; Rahman, 2006).

2.4.1 Acido docosaesaenoico (DHA)

Le attuali terapie per il trattamento della BPCO riducono i sintomi, la frequenza e la gravità delle esacerbazioni, aumentano la capacità di esercizio, ma non agiscono sull'infiammazione sistemica e sullo stress ossidativo. Le nuove terapie, invece, includendo l'utilizzo di inibitori della 3-idrossi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) riduttasi o statine, antiossidanti e acidi

grassi polinsaturi (PUFAs), agiscono sull'inflammazone sistemica e sul controllo dello stress ossidativo.

A seconda della posizione del primo doppio legame lungo la catena dell'acido grasso, partendo dall'estremità del metallo, i PUFAs possono essere distinti in omega-6 (ω -6) o omega-3 (ω -3). Tra gli omega-6 ricordiamo l'acido linoleico (LA) e l'acido arachidonico (AA), mentre tra gli omega-3 ricordiamo l'acido docosaesaenoico (DHA), l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido α -linolenico (ALA) (fig. 24).

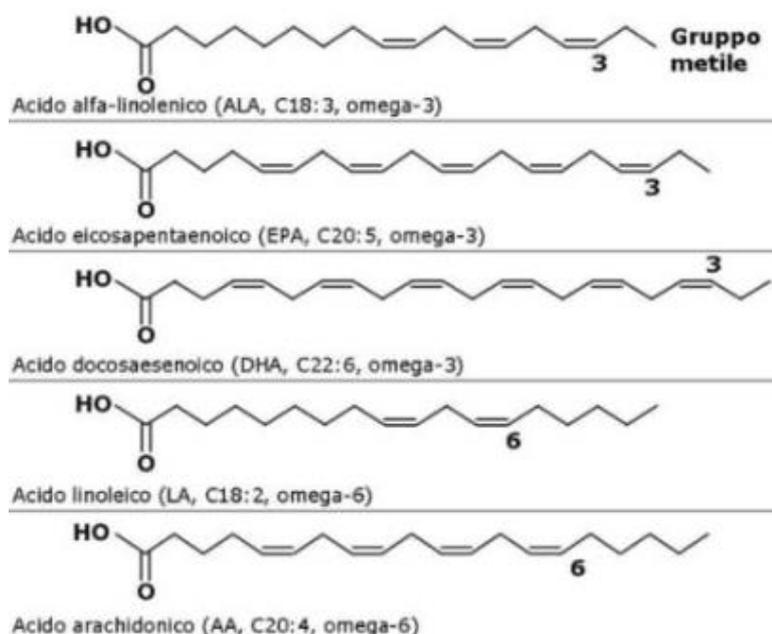


Fig. 24. Strutture molecolari degli omega-3(ω -3) e degli omega-6 (ω -6).

La composizione lipidica della dieta alimentare influenza notevolmente la reattività del sistema immunitario e il processo infiammatorio. Un'elevata assunzione di omega-6, specialmente di AA o del suo precursore LA, contribuisce notevolmente all'aggravamento del processo infiammatorio. L'acido arachidonico, infatti, una volta liberato dalle cellule può rapidamente essere metabolizzato attraverso la lipossigenasi (LOX), la ciclossigenasi (COX) o il pathway del citocromo P450, portando alla formazione di leucotrieni (LTB₄), cystenil-leucotrieni (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) e prostaglandine, che svolgono un ruolo fondamentale nella fisiopatologia dell'asma e della BPCO. Il LTB₄ è un potente fattore chemotattico per numerose cellule coinvolte nell'infiammazione delle vie aeree, promuove il reclutamento degli eosinofili nei polmoni e stimola la formazione di muco. Elevate concentrazioni di cysteinil-LT sono state riscontrate nel liquido di lavaggio broncoalveolare, nello sputo e nella condensa di respiro esalato da pazienti asmatici (Giudetti & Cagnazzo, 2012). Fino ad oggi non sono stati pubblicati studi sugli effetti del supplemento di omega-3 nel trattamento della BPCO, tuttavia è stato osservato che il DHA è in grado di ridurre i marker di stress infiammatorio e

ossidativo nei modelli animali di malattie epatiche grasse e diabete di tipo 2 (Williams, Baines, Smart, Gibson, & Wood, 2016). Esso è inoltre in grado di modulare l'attività anti-infiammatoria attraverso diversi meccanismi. Una via comprende l'inibizione del metabolismo dell'acido arachidonico (AA), in quanto questo omega-3 è capace di competere con l'AA come costituente di membrane lipidiche o direttamente come substrato per la cicloossigenasi e la lipossigenasi, portando alla sintesi di mediatori più bioattivi di quelli derivanti dall' AA. Inoltre, EPA e DHA sono in grado di ridurre le attività pro-infiammatorie legate all'attivazione del fattore nucleare NF- κ B, portando ad una ridotta espressione di citochine infiammatorie.

Risulta quindi evidente come l'elevata assunzione di acidi grassi omega-3 possa essere associata ad un rischio ridotto di alti livelli di TNF α nel siero e quindi ad una attività antiinfiammatoria, mentre l'assunzione di acidi grassi omega-6 sia correlata ad un aumento della formazione di marcatori pro-infiammatori (IL-6 e proteina C reattiva (CRP)) (De Batlle et al., 2012).

L'effetto antiinfiammatorio esercitato dagli omega-3 potrebbe inoltre essere dovuto all'effetto modulatorio che questi

esercitano sulle *tight junction* (TJ) presenti a livello della membrana dell'epitelio respiratorio e sulla produzione di muco. I risultati riportati in diversi studi indicano che gli omega-3 non esercitano cambiamenti strutturali sulle cellule epiteliali delle vie aeree, tuttavia, sono responsabili di cambiamenti funzionali come l'aumento della fluidità della membrana. Inoltre, studi in vivo e in vitro hanno mostrato un'associazione inversa tra i PUFAs e l'ipersecrezione del muco. Il muco è un gel viscoelastico e adesivo che protegge le vie aeree del polmone. La maggior parte dei particolati, inclusi i sistemi convenzionali di *drug delivery* polmonari, quando intrappolati nel muco, vengono eliminati in breve tempo a seconda della posizione anatomica, ostacolando in tal modo l'efficacia del farmaco (Ghadiri et al., 2016b). Un sistema di rilascio controllato a base di DHA potrebbe quindi rappresentare una promettente strategia per il trattamento delle BPCO.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Il lavoro svolto durante il periodo di dottorato ha previsto la realizzazione di diversi sistemi microparticellari lipidici (SLM) con proprietà mucoadesive, in grado di veicolare farmaci utili nel trattamento della BPCO. In particolare, sono state preparate SLM utilizzando anche polimeri di rivestimento biocompatibili, quali oligosaccaridi lattato del chitosano, sodio alginato e chitosano. In letteratura, è ampiamente riportato che carriers con proprietà mucoadesive sono capaci di interagire con lo strato di mucina presente sulla superficie dell'epitelio respiratorio tramite la formazione di legami a idrogeno, elettrostatici o forze di van der Waals (Mishra & Mishra, 2012; Wittaya-Areekul, Krueenate, & Prahsarn, 2006). Inoltre le dimensioni delle microparticelle preparate (1-5 μm) avrebbero le caratteristiche per assicurare un rilascio del p.a. a livello dei bronchi secondari, evitando gli effetti collaterali sistemici che si verificherebbero con l'assorbimento del farmaco a livello alveolare, quando somministrato con un sistema di dimensioni nanometriche (Amore et al., 2017).

Tutti i sistemi sono stati prodotti con la tecnica della precipitazione etanolica, come descritto nella sezione di Materiali e Metodi. I farmaci veicolati dalle SLM sono stati:

- Fluticasone Propionato (FP);
- Salmeterolo Xinafoato (SX)
- Inoltre è stata utilizzata una molecola naturale con spiccate proprietà antiossidanti utile nel controllo dei processi infiammatori caratteristici delle broncopneumopatie e che svolgerebbe un'azione sinergica con i corticosteroidi (De Batlle et al., 2012; Ghadiri et al., 2016a; Giudetti & Cagnazzo, 2012; Williams et al., 2016). In particolare abbiamo scelto di utilizzare:
 - Acido Docosaesaenoico (DHA). I carriers preparati sono stati caratterizzati in termini di: diametro medio (size), potenziale Zeta (ζ -potential), mucoadesione, diametro aerodinamico, morfologia e caratteristiche superficiali. Inoltre sono stati effettuati studi da un punto di vista tecnologico-farmaceutico in termini di Drug Loading (DL%) ed Efficienza di Intrappolamento (EE%). Inoltre, sono state valutate anche le cinetiche di rilascio.

Infine, sono stati effettuati studi biologici di citotossicità in vitro tramite saggi MTS utilizzando la linea cellulare epiteliale bronchiale 16-HBE e saggi per la valutazione dell'efficacia del farmaco libero rispetto al farmaco veicolato dai sistemi microparticellari preparati.

3.1 Microparticelle solide lipidiche (SLM) contenenti fluticasone propionato (FP)

Per la veicolazione del fluticasone propionato sono stati realizzati due sistemi microparticellari lipidici. In particolare, un primo sistema è stato preparato in presenza di oligosaccaridi lattato del chitosano a basso peso molecolare, mentre il secondo sistema è stato ottenuto tramite rivestimento di nanoparticelle cationiche lipidiche (cSLN) con una soluzione acquosa di sodio alginato all'1% (p/v), considerando un rapporto in peso cSLN:sodio alginato di 1:8 (p/p).

Tali sistemi sono stati ampiamente caratterizzati da un punto di vista chimico-fisico e tecnologico-farmaceutico ed inoltre, sono stati effettuati studi biologici in vitro per la valutazione dell'espressione della survivina e del fattore p-ERK dopo stimolazione con fumo di sigaretta.

3.1.1 SLM preparate in presenza di oligosaccaridi lattato del chitosano allo 0.1% (p/v)

I sistemi microparticellari preparati in presenza di oligosaccaridi lattato del chitosano (vedi 5.2.1 Materiali e Metodi) hanno mostrato dimensioni medie comprese tra 1500-2400 nm in tutti i mezzi considerati. In particolare, in acqua e in NaCl 0.9% (p/v) le SLM vuote presentavano valori dimensionali simili e non si sono osservati fenomeni di aggregazione, probabilmente perché i sistemi presentavano un valore di potenziale zeta nei medesimi mezzi (+20 mV) che era sufficiente ad assicurare un'adeguata repulsione tra le particelle. Al contrario, in PBS a pH 7.4 le SLM vuote mostravano un valore di size più elevato dovuto probabilmente alla riduzione del potenziale zeta che assumeva valori prossimi allo zero. Le SLM caricate con FP, invece, presentavano un incremento di size in entrambi i mezzi salini considerati, probabilmente a causa della marcata riduzione del potenziale zeta. I dati ottenuti sono mostrati in fig. 25 (A-B).

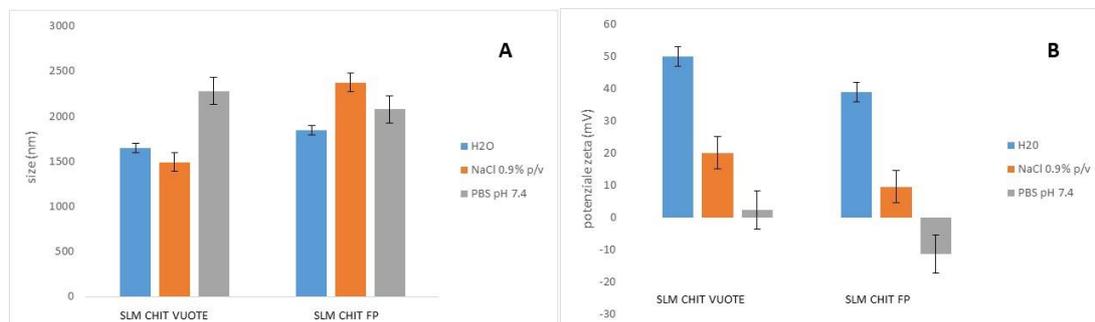


Fig. 25. Size (A) e potenziale zeta (B) delle SLM preparate in presenza di chitosano vuote e cariche di farmaco.

3.1.2 Nanoparticelle cationiche (cSLN) ed SLM preparate con sodio alginato all'1% (p/v)

Sia le nanoparticelle cationiche (cSLN) che le microparticelle, ottenute dopo rivestimento delle prime con una soluzione di sodio alginato, sono state analizzate in termini di size e potenziale zeta in acqua bi-distillata e in soluzioni acquose di NaCl 0.9% (p/v) e PBS a pH 7.4. Le cSLN (sia vuote che caricate con FP) hanno mostrato una importante tendenza ad aggregarsi nei mezzi salini, probabilmente a causa della riduzione del potenziale zeta. Il sistema microparticellare (sia vuoto che carico di FP), invece, è risultato stabile nei tre mezzi considerati, in quanto non sono state riscontrate variazioni significative in termini di size e di carica superficiale. (fig. 26 A-B).

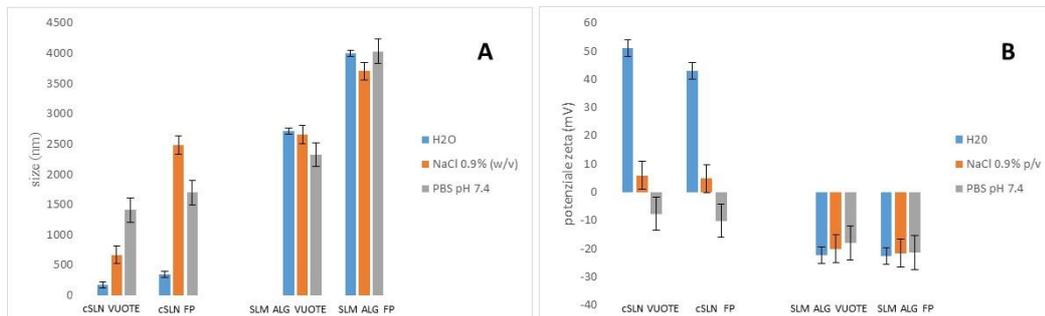


Fig. 26. Size (A) e potenziale zeta (B) delle cSLN e delle SLM preparate con sodio alginate vuote e cariche di farmaco.

3.1.3 Analisi tramite microscopia a scansione elettronica (SEM)

La morfologia delle microparticelle preparate è stata studiata tramite microscopia a scansione elettronica. Le immagini ottenute (figg. 27-28 A e B) hanno confermato la forma sferica delle particelle, nonché le loro dimensioni, come già sopra descritto (analisi PCS).

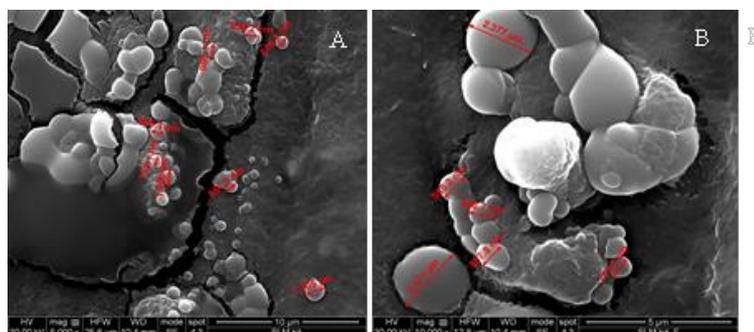


Fig. 27 Immagini SEM di SLM con chitosano vuote (A) e cariche di FP (B). Le barre in basso a destra rappresentano la misura in μm .

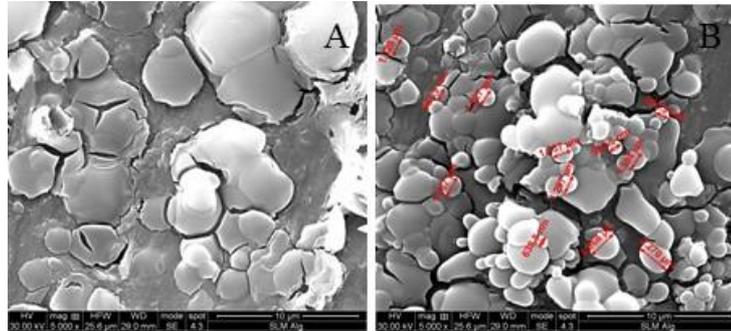


Fig. 28. Immagini SEM di SLM preparate con sodio alginato vuote (A) e cariche di FP (B). Le barre in basso a destra rappresentano la misura in μm .

3.1.4 Saggio turbidimetrico

La mucoadesione dei sistemi preparati è stata valutata tramite analisi turbidimetrica. In questo saggio, le interazioni mucoadesive tra le particelle e la mucina si traducevano in un assorbimento della mucina intorno alla superficie delle particelle e conseguentemente in una leggera aggregazione che può essere rilevata come un incremento dell'assorbimento all'UV (Bonferoni et al., 2010). L'analisi è stata effettuata incubando diverse sospensioni acquose di SLM (preparate con chitosano e alginato) con una soluzione acquosa di mucina allo 0.1% (p/v) fino ad un tempo di 6 ore (Takeuchi et al., 2005).

I dati sperimentali hanno mostrato un incremento della turbidità di entrambe le dispersioni SLM+mucina rispetto alla sola mucina, dimostrando una buona interazione tra quest'ultima ed entrambi i

sistemi microparticellari a tutte le concentrazioni considerate (figg. 29-30).

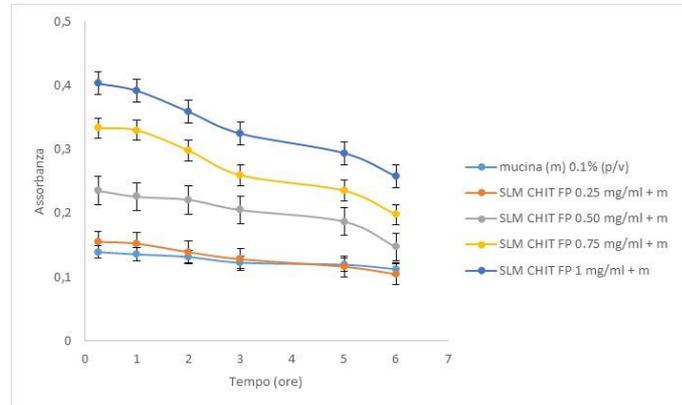


Fig. 29. Valutazione dell'interazione tra differenti sospensioni acquose di SLM con chitosano contenenti FP e la mucina tramite saggio turbidimetrico.

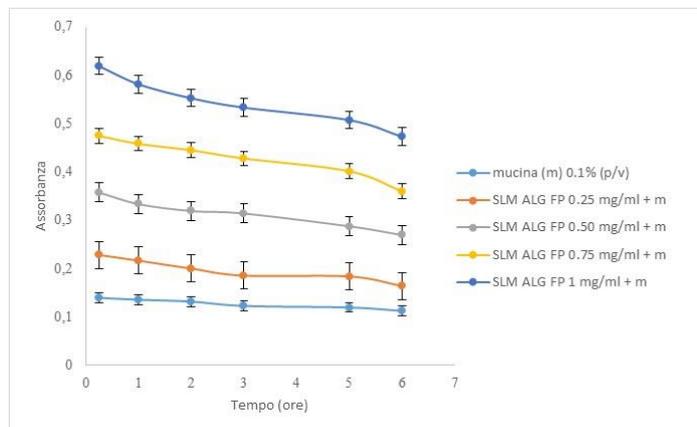


Fig. 30. Valutazione dell'interazione tra differenti sospensioni acquose di SLM con alginato contenenti FP e la mucina tramite saggio turbidimetrico.

Inoltre, dai dati mostrati si evince la maggiore capacità mucoadesiva da parte del sistema con alginato rispetto al sistema con chitosano. Infatti, mettendo a confronto la turbidità della dispersione di SLM-alg/mucina con quella di SLM-chit/mucina, a tutte le concentrazioni considerate, il sistema con alginato presenta un valore di assorbanza maggiore e quindi una maggiore affinità con la mucina.

Considerando le interazioni coinvolte nel processo di mucoadesione (legami a idrogeno, legami ionici, Van der Waals e interazioni idrofobiche) e la composizione della mucina, costituita da proteine altamente glicosilate e cariche negativamente, ci saremmo aspettati una maggiore forza di adesione da parte delle microparticelle cariche positivamente (SLM con chitosano), vista la maggiore forza del legame ionico rispetto alle interazioni idrofobiche (Luo, Teng, Li, & Wang, 2015; Mansuri, Kesharwani, Jain, Tekade, & Jain, 2016). I risultati ottenuti possono essere giustificati dal fatto che esiste una relazione diretta tra il peso molecolare del chitosano e le sue proprietà mucoadesive. Infatti, un chitosano avente peso molecolare compreso tra 3,000 e 5,000 Da risulta meno abile nella formazione di legami non covalenti con la mucina (Bravo-Osuna, Vauthier, Farabollini,

Palmieri, & Ponchel, 2007; Mishra & Mishra, 2012; Sun et al., 2009; Takeuchi et al., 2005).

3.1.5 Determinazione della Drug Loading e dell'Efficienza d'Intrappolamento

Per determinare la quantità di FP intrappolata all'interno dei sistemi microparticellari sono state effettuate analisi HPLC, così come descritto nella sezione di Materiali e Metodi (vedi capitolo 5.2.13). I dati di Drug Loading (DL%) ed *Efficienza d'Intrappolamento (EE%)* sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Drug Loading (DL%) ed *Efficienza d'Intrappolamento (EE%)* di SLM-CHIT FP, SLM ALG FP.

SISTEMI	DL %	EE%
SLM CHIT FP	7.47	52.31
SLM ALG FP	11.58	57.13

Come si evince dalla tabella sopra riportata, il sistema microparticellare con alginato mostra delle capacità di intrappolamento superiori rispetto a quello preparato con chitosano,

probabilmente in seguito ad una migliore solubilità del farmaco nella matrice utilizzata per la preparazione delle microparticelle.

3.1.6 Valutazione del diametro aerodinamico delle SLM caricate con FP

Per poter valutare il diametro aerodinamico e la deposizione *in vitro* del FP di entrambi i sistemi, le SLM preparate sono state ridisperse in soluzione acquosa e nebulizzate con il nebulizzatore aereo PariSX® collegato al New Generation Impactor (NGI). Il MMAD (Diametro Aerodinamico Mediano di Massa) \pm GSD (deviazione standard geometrica) delle SLM con alginato è risultato pari a $3.5 \pm 1.3 \mu\text{m}$, mentre quello delle SLM con chitosano è risultato pari a $4.0 \pm 1.2 \mu\text{m}$.

In letteratura è ampiamente riportato che i dispositivi per l'erogazione di farmaci per via polmonare possono generare particelle diverse con differente diametro aerodinamico: le particelle con MMAD compreso tra 3 e 10 μm possono raggiungere la regione tracheobronchiale e sono generalmente utilizzate per trattare patologie a carico delle vie aeree, mentre quelle con MMAD compreso tra 1 e 3

μm possono raggiungere la regione alveolare e quindi essere assorbite per via sistemica.

Generalmente si ritiene che le particelle con diametro aerodinamico superiore a $5 \mu\text{m}$ possono depositarsi a livello delle vie aeree superiori (bocca, trachea e bronchi principali) per impatto inerziale, mentre le particelle nel range compreso tra $1-5 \mu\text{m}$ possono depositarsi per sedimentazione gravitazionale nella zona centrale e nel tratto distale (Amore et al., 2017; Liang, Ni, Zhou, & Mao, 2015; Nafee et al., 2014).

Il processo di nebulizzazione comporta ripetuti cicli di aerosolizzazione durante i quali vengono applicate forze di taglio alle formulazioni testate e per questo motivo le caratteristiche del supporto e la sua stabilità giocano un ruolo chiave per il suo utilizzo come sistema per la somministrazione polmonare (Amore et al., 2017; Melis et al., 2016).

La quantità di campione caricata nel nebulizzatore, per entrambi i sistemi testati, non è stata completamente aerosolizzata. Infatti, la massa totale in uscita è risultata del 44% per le SLM con alginato e del 16% per le SLM con chitosano; ciò probabilmente in seguito alla formazione di aggregati microparticellari durante il processo di

nebulizzazione. Tuttavia, è stato trovato che per le SLM con alginato, la frazione di particelle fini (FPF%) era abbastanza elevata, circa il 90% e la dose di particelle fini (FPD) era 1.13 mg. Tali valori sono predittivi di una efficace deposizione del farmaco negli stadi più lontani dell'impattore, i quali mimano le parti più profonde dell'albero respiratorio. Anche le SLM con chitosano hanno mostrato un'elevata percentuale di FPF (86%) ma, considerando che questa formulazione è stata scarsamente aerosolizzata (16%), la quantità effettiva di FP depositato è stata significativamente inferiore (0.36 mg). Dai dati ottenuti da questo studio è possibile affermare che le SLM con alginato rappresentano un sistema idoneo per il rilascio del FP nelle vie aeree profonde (per esempio i bronchi secondari).

3.1.7 Studi di rilascio del FP in PBS a pH 7.4 contenente SDS 0.1% (p/v)

Successivamente sono state analizzate le cinetiche di rilascio del FP da entrambi i sistemi microparticellari preparati utilizzando come mezzo di dissoluzione una soluzione tampone di PBS a pH 7.4 contenente sodio dodecilsolfato (SDS) allo 0.1% (p/v), come descritto nella sezione Materiali e Metodi (vedi capitolo 5.2.15). Ad intervalli

di tempo prestabiliti è stata prelevata un'aliquota da ogni campione che è stata sottoposta ad analisi HPLC. Di seguito sono riportati i profili di rilascio del FP dai sistemi microparticellari preparati (fig. 31). Le cinetiche di rilascio sono state studiate fino a 48 ore.

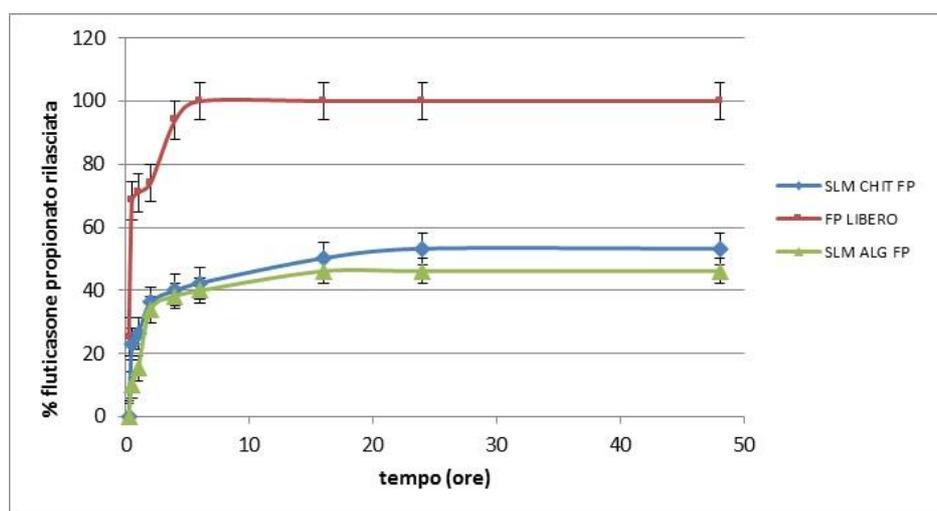


Fig. 31. Profili di dissoluzione del FP libero e di rilascio dai sistemi SLM ALGINATO FP ed SLM CHITOSANO FP.

Come si evince dal grafico, la dissoluzione del farmaco libero aumenta nel tempo raggiungendo il suo valore massimo a 6 ore e rimanendo poi costante fino a 48 ore. I sistemi preparati hanno mostrato un profilo di rilascio del FP simile, con un *burst release* iniziale del 40% e una percentuale di p.a. rilasciata dopo 48 ore pari solo al 60%. Dai dati mostrati è quindi possibile affermare che il profilo di rilascio del FP dalle SLM non è influenzato dal polimero di rivestimento e la quantità di farmaco non ancora rilasciata è stata

trovata all'interno delle microparticelle e potrebbe essere disponibile nelle vie aeree dopo questo tempo.

3.1.8 Studi di vitalità cellulare (saggio MTS) delle SLM e delle cSLN caricate con FP

Tutti i sistemi preparati, sia vuoti che caricati con FP, sono stati sottoposti a saggi di vitalità cellulare utilizzando la linea cellulare epiteliale bronchiale 16-HBE.

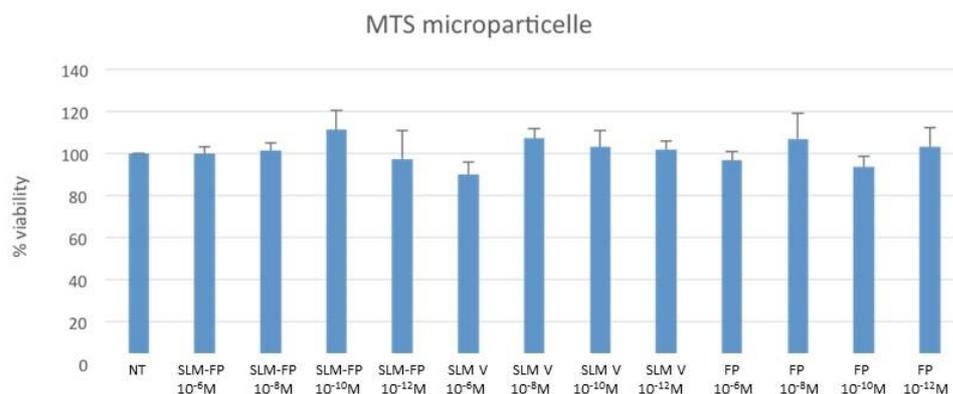


Fig. 32. Saggio di vitalità cellulare delle cellule 16-HBE trattate con FP libero e veicolato dalle SLM preparate con chitosano.

I dati sopra riportati (fig. 32) mostrano il comportamento delle cellule incubate con FP libero, SLM con chitosano vuote (SLM V) ed SLM caricate con FP (SLM FP) ad una concentrazione di farmaco

compresa tra 10^{-6} M e 10^{-12} M. Tutti i sistemi considerati, sia vuoti che carichi di farmaco, hanno mostrato una buona vitalità cellulare.

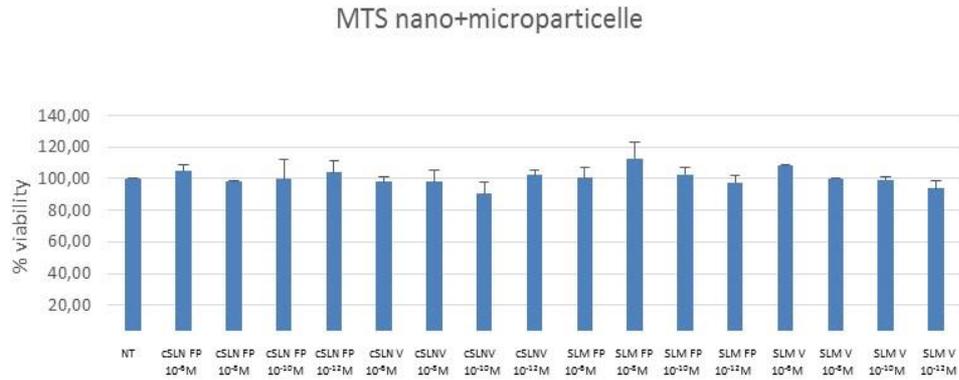


Fig. 33. Saggio di vitalità cellulare delle cellule 16-HBE trattate con cSLN ed SLM con alginato vuote e cariche di farmaco.

Nel caso delle microparticelle preparate per rivestimento delle cSLN con sodio alginato abbiamo voluto preliminarmente valutare la tossicità di queste ultime ancor prima di essere rivestite, considerato che in letteratura è ampiamente riportata la citotossicità delle particelle preparate utilizzando lipidi cationici (Tabatt, Sameti, Olbrich, Müller, & Lehr, 2004). I dati sopra riportati mostrano il comportamento dose-risposta delle cellule 16-HBE incubate con SLM alginato vuote (SLM V), cSLN vuote (cSLN V), SLM con alginato ed cSLN caricate con FP (rispettivamente SLM FP ed cSLN FP) in un range di concentrazione compreso tra 10^{-6} M e 10^{-12} M. Anche in questo caso, i sistemi hanno mostrato una buona vitalità cellulare.

Considerando che da un punto di vista tecnologico-farmaceutico e anche chimico-fisico le microparticelle con alginato mostravano migliori caratteristiche di quelle preparate con chitosano, per gli studi biologici successivi sono stati scelti i sistemi con alginato. In particolare, il comportamento biologico di questi ultimi è stato paragonato con quello ottenuto dalle cSLN da cui sono stati preparati.

3.1.9 Effetti delle cSLN e delle SLM caricate con FP sull'espressione del rapporto ERK1/2 sulle cellule 16-HBE

Come descritto in letteratura, i glucocorticoidi esercitano un effetto inibitorio sulla cascata delle MAPK (ERK) (Greenberg et al., 2002), una famiglia di proteine coinvolte in importanti processi cellulari, quali l'espressione genica e il differenziamento cellulare (Vincentini & Cattaneo, 2012). Questo sistema di trasduzione risulta attivato, oltre che da fattori di crescita, anche da stimoli esterni, come ad esempio lo stress ossidativo causato dall'esposizione al fumo di sigaretta. Infatti, le cellule trattate con CSE hanno evidenziato un aumento dell'espressione dei TLR4 (toll-like receptor) responsabili dell'attivazione della via di trasduzione mediata da ERK che, tramite processi di fosforilazione/defosforilazione dei substrati, ha portato

all'aumento dell'espressione di IL-8. Questa, insieme ad IL-4, IL-1 e LTB₄, provoca il reclutamento di neutrofili, macrofagi e cellule dendritiche contribuendo allo sviluppo e alla progressione della BPCO (Greenberg et al., 2002). Ricordando che lo stress ossidativo è uno dei principali fattori che inducono resistenza ai corticosteroidi per uso inalatorio, si è voluto verificare se il fluticasone propionato veicolato dalle SLM fosse più efficace rispetto al farmaco libero nel revertire alcuni meccanismi indotti dallo stress ossidativo. A questo proposito, è stata valutata proprio l'espressione di ERK (sia nella forma fosforilata che totale) nelle cellule 16-HBE bronchiali trattate con CSE, successivamente all'aggiunta di fluticasone propionato.

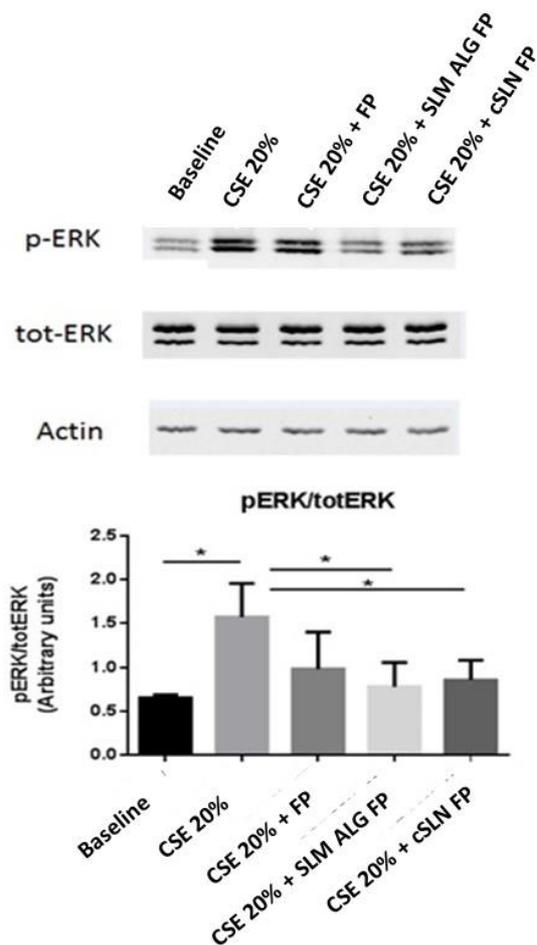


Fig. 34. Espressione di p-ERK, dopo trattamento con FP libero e veicolato dai micro- (SLM ALG FP) e nanosistemi (cSLN FP), nelle cellule 16-HBE trattate con CSE al 20% (Cigarette Smoke Extract).

Dal grafico sopra riportato (fig. 34) si nota come in presenza di CSE, il rapporto p-ERK/totERK aumenti notevolmente a causa dello stress ossidativo. L'aggiunta di FP veicolato sia dai sistemi micro- che nanoparticellari ha prodotto una significativa riduzione dell'espressione di p-ERK che è risultata maggiore rispetto a quella

ottenuta dall'aggiunta di FP libero. Il saggio ha quindi mostrato una maggiore efficacia del sistema veicolato rispetto al farmaco libero.

3.1.10 Valutazione dell'espressione di survivina

A causa dello stress ossidativo la cellula attiva diversi meccanismi di tipo anti-apoptotico che portano all'aumento dell'espressione di alcune proteine pro-survival. Una di queste è la survivina (Chiappara et al., 2013), una proteina anti-apoptotica in grado di regolare negativamente le caspasi, ovvero endopeptidasi in grado di attivare reazioni di proteolisi coinvolte nella morte cellulare programmata (Lisa & Melloni, 2012). Le cellule dell'epitelio bronchiale trattate con CSE hanno mostrato un'elevata espressione di survivina in accordo con i dati riportati in letteratura (Chiappara et al., 2013).

Tramite il seguente saggio si è voluto valutare la capacità da parte del FP (in forma veicolata e non) di inibire il meccanismo antiapoptotico indotto dallo stress ossidativo, andando a determinare l'espressione della survivina nelle cellule dell'epitelio bronchiale 16-HBE trattate con CSE.

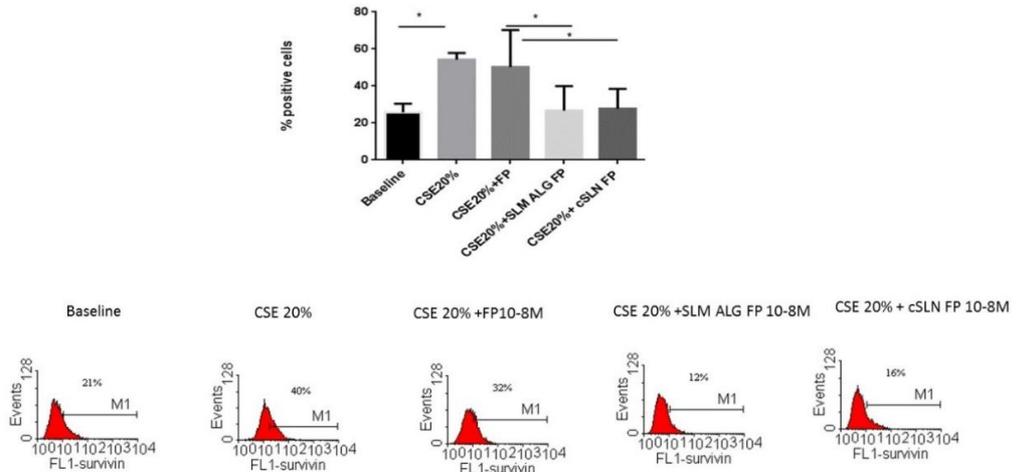


Fig. 35. Espressione della survivina, dopo trattamento con FP libero e veicolato dai micro- (SLM ALG FP) e nanosistemi (cSLN FP), nelle cellule 16-HBE trattate con CSE al 20% (Cigarette Smoke Extract).

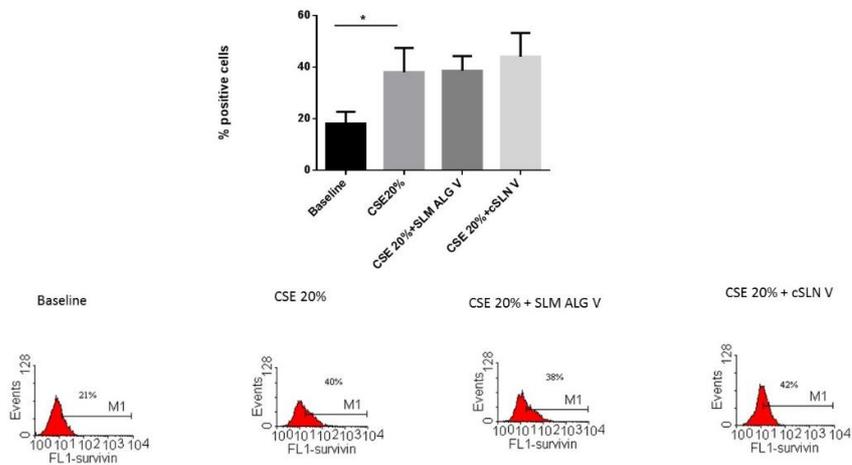


Fig. 36. Espressione della survivina, dopo trattamento con le microparticelle vuote (SLM ALG V) e le nanoparticelle vuote (cSLN V), nelle cellule 16-HBE trattate con CSE al 20% (Cigarette Smoke Extract).

Le cellule 16-HBE, in seguito all'esposizione al fumo di sigaretta, hanno mostrato un aumento dell'espressione della survivina. Questa si è sensibilmente ridotta nelle cellule trattate con FP veicolato da nano- e microparticelle, mostrando una maggiore efficacia del farmaco veicolato rispetto al farmaco libero (fig. 35). Le SLM e le cSLN vuote, invece, non hanno mostrato alcun effetto sull'incremento dell'espressione della survivina (fig. 36).

3.2 Microparticelle solide lipidiche (SLM) contenenti salmeterolo xinafoato (SX)

Il trattamento farmacologico di prima scelta per la terapia della BPCO è rappresentato dall'utilizzo di broncodilatatori (β -2 agonisti) a lunga durata d'azione, che determinano il rilassamento della muscolatura liscia dei bronchi migliorando la respirazione. Secondo le linee guida emesse dall'Iniziativa Globale su malattie ostruttive polmonari (GOLD guidelines, 2009) e dall'Istituto Nazionale di Salute e di Eccellenza Clinica (NICE) (National Clinical Guideline Centre, 2010), i pazienti, in seguito a diagnosi, dovrebbero essere trattati con β -2 agonisti a lunga durata e con corticosteroidi negli stadi successivi (Cave & Hurst, 2011).

Nel presente lavoro sono state realizzate Microparticelle Solide Lipidiche (SLM) contenenti salmeterolo xinafoato (β -2 agonista a lunga durata) per il trattamento della BPCO. Il sistema microparticellare finale è stato ottenuto tramite rivestimento di nanoparticelle cationiche lipidiche (cSLN) con una soluzione acquosa di sodio alginato all'1% (p/v), considerando un rapporto in peso cSLN: sodio alginato di 1:8 (p/p).

Tutti i sistemi, vuoti e caricati con SX, sono stati ampiamente caratterizzati da un punto di vista chimico-fisico e tecnologico-farmaceutico ed inoltre, sono stati effettuati studi biologici in vitro per la valutazione dell'cAMP.

3.2.1 Caratterizzazione delle cSLN e delle SLM preparate con sodio alginato all'1% (p/v) contenenti SX

I sistemi preparati, sia nano che microparticellari, sono stati dispersi in soluzione acquosa e caratterizzati in termini di size, indice di polidispersità e potenziale zeta. I dati ottenuti sono riportati in tabella 2.

Tabella 2. Size, PDI, potenziale zeta, delle cSLN e delle SLM preparate.

Sistemi	Z-average (nm)	PDI	ζ-potential (mV)
cSLN vuote	133.1	0.285	+41.6 ± 3.90
cSLN-SX	277.7	0.202	+33.6 ± 9.28
SLM vuote	3360.2	0.589	-22.4 ± 4.32
SLM-SX	3374.4	0.378	-19.9 ± 5.26

Come si può notare dalla tabella 2, la presenza del SX all'interno dei sistemi nanoparticellari ha causato un notevole incremento delle dimensioni (da 133.1 nm a 277.7 nm) e una significativa riduzione della carica superficiale (da +41 mV a +33 mV), probabilmente a causa della presenza del farmaco sulla superficie delle particelle (vedi paragrafo 3.2.3 per la spettroscopia fotoelettronica a raggi X). Successivamente, entrambi i sistemi nanoparticellari sono stati rivestiti con una soluzione acquosa di alginato di sodio all'1% (p/v), come riportato nella sezione 5.2.3 di Materiali e metodi. I sistemi microparticellari ottenuti hanno mostrato dimensioni simili (circa 3300 nm) e carica superficiale paragonabile (circa -20 mV).

Inoltre, sono state effettuate misure delle SLM, vuote e caricate con SX, in due diversi mezzi acquosi (NaCl 0.9% p/v e PBS a pH 7.4) e sono state paragonate con le misure ottenute in acqua bidistillata. I dati sono riportati in fig. 37.

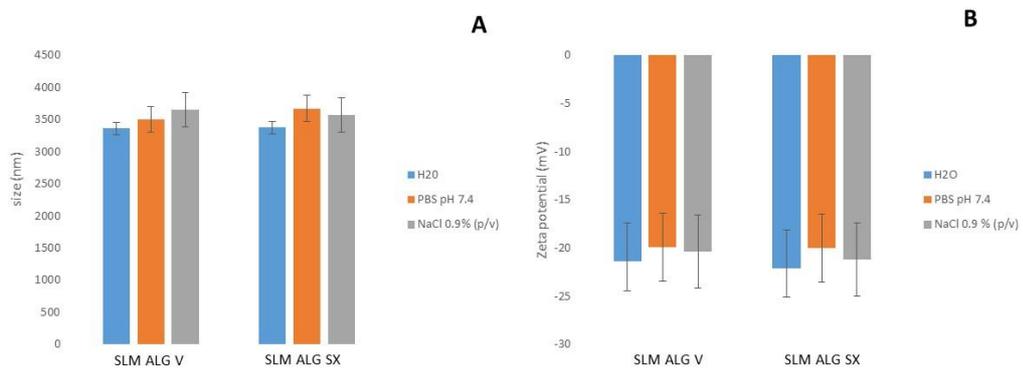


Fig. 37. Size e potenziale zeta in H₂O, NaCl 0.9% (p/v) e PBS a pH 7.4 delle SLM con alginato vuote e cariche di SX.

I dati sopra riportati mostrano che le SLM con sodio alginato presentano, sia in PBS a pH 7.4 che in NaCl 0.9% (p/v), valori di size e carica superficiale paragonabili, per cui possiamo affermare che tali sistemi risultano stabili nei mezzi salini analizzati.

3.2.2 Saggio turbidimetrico

La mucoadesione del sistema microparticellare preparato è stata valutata tramite saggio turbidimetrico. L'analisi è stata effettuata incubando diverse sospensioni acquose di SLM con alginato (da 0.25

mg/ml fino ad 1 mg/ml) con una soluzione acquosa di mucina allo 0.1% (p/v) fino ad un tempo di 6 ore (Takeuchi et al., 2005).

Le interazioni mucoadesive tra le particelle e la mucina si traducono in un assorbimento della mucina intorno alla superficie delle particelle e conseguentemente in una leggera aggregazione che può essere rilevata come un incremento dell'assorbimento all'UV (Bonferoni et al., 2010).

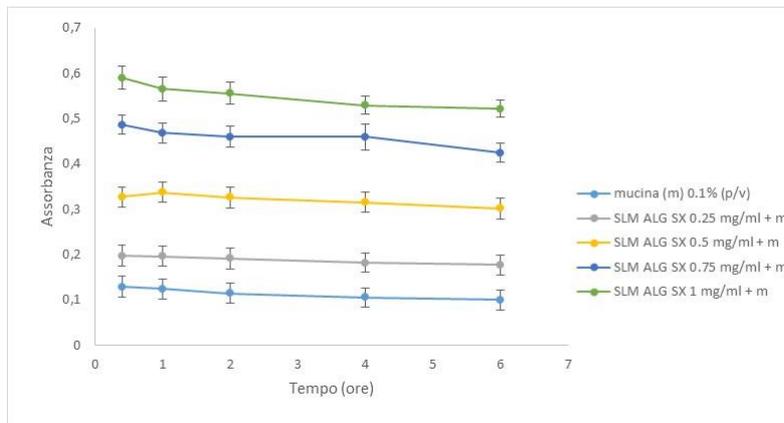


Fig. 38. Valutazione dell'interazione tra differenti sospensioni acquose di SLM con alginato contenenti SX e la mucina tramite saggio turbidimetrico.

Analizzando i dati mostrati in fig. 38 è possibile affermare che la capacità mucoadesiva del sistema microparticellare preparato aumenta all'aumentare della concentrazione analizzata e inoltre, rimane invariata nel tempo, dimostrando quindi una buona stabilità del sistema.

3.2.3 Spettroscopia fotoelettronica a raggi X dei sistemi caricati con SX

Le analisi di spettroscopia fotoelettronica a raggi X sono state eseguite sui sistemi nano e microparticellari caricati con salmeterolo xinafoato, per confermare la presenza del farmaco sulla superficie delle particelle, dal momento che, analizzando le cinetiche di rilascio, tali sistemi non avevano mostrato un *controlled release* del farmaco.

Gli spettri ottenuti mostrano in tutti i casi la presenza di picchi relativi al carbonio e all'ossigeno. I risultati delle analisi delle regioni ad alta risoluzione relative all'emissione del C1s e O1s sono riportati in tabella 3 in termini di energia di legame del C1s e rapporto atomico O/C e gli spettri relativi al C1s sono mostrati in fig. 39. Il campione nanoparticellare vuoto (cSLN V) presenta due componenti, a 285.0 eV (relativo al carbonio alifatico) ed a 286.4 eV (relativo alla presenza dei legami C-O-C e C-OH). Queste componenti diminuiscono nel campione nanoparticellare contenente SX (cSLN SX), in cui la componente principale a 283.6 eV è dovuta alla presenza del carbonio aromatico presente nella struttura del salmeterolo xinafoato (Kundu, Wang, Xia, & Muhler, 2008). Inoltre, in quest'ultimo campione il rapporto atomico O/C aumenta notevolmente. Questi risultati

confermano la presenza del farmaco sulla superficie delle nanoparticelle. L'XPS, infatti, è una tecnica che consente un'analisi della superficie fino ad una profondità di circa 5-10 nm; ciò significa che tutte le specie presenti nella superficie sono enfatizzate rispetto alle specie più in profondità. Il fatto che le cSLN SX mostrano una componente aromatica considerevole e un elevato rapporto atomico O/C è chiaramente dovuto alla presenza del farmaco sulla superficie nanoparticellare. Analizzando i picchi relativi all'analisi dei campioni microparticellari osserviamo ancora un aumento dei componenti dovuti al carbonio alifatico e all'ossigeno legato al carbonio con un aumento relativo di quest'ultimo, che indica una copertura completa della nanoparticella con l'alginato.

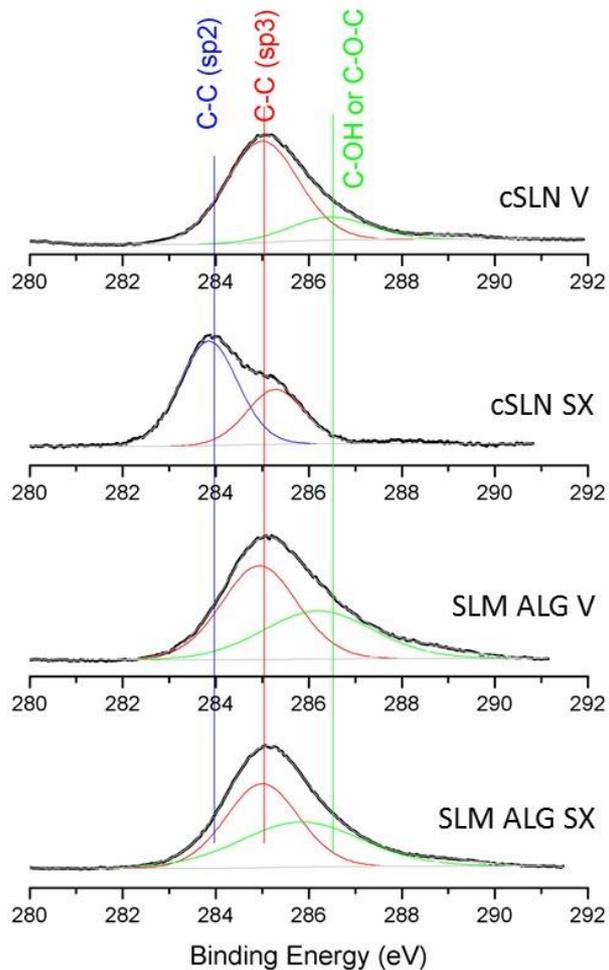


Fig. 39. XPS ad alta risoluzione della regione del C1s delle cSLN e delle SLM vuote e caricate con SX.

Tabella 3. Energia (eV) di legame del C1s e rapporto atomico O/C.

	C1s	O/C
cSLN vuote	285.0 (81%) 286.4 (19%)	0.01
cSLN SX	283.6 (63%) 285.0 (35%)	0.15
SLM ALG vuote	285.0 (63%) 286.5 (34%)	0.03
SLM ALG SX	285.1 (77%) 286.4 (31%)	0.02

3.2.4 Determinazione della Drug Loading e dell'Efficienza d'Intrappolamento

Per valutare la quantità di salmeterolo xinafoato intrappolata all'interno delle microparticelle, è stata eseguita un'analisi HPLC, come riportato nella sezione 5.2.11 di Materiali e Metodi.

Il valore di Drug Loading, espresso come rapporto percentuale in peso tra la quantità di SX presente e il peso totale del campione secco (DL% w/w) e l'*Efficienza di Intrappolamento* (EE%), espressa come rapporto percentuale in peso tra la quantità di SX intrappolata nelle SLM e la quantità totale di SX utilizzata per preparare le particelle, sono risultati rispettivamente l'1.17% e il 4.26%.

Nonostante il valore di Drug Loading ottenuto, questi sistemi microparticellari potrebbero comunque essere proposti in terapia dal momento che nelle formulazioni già presenti in commercio la quantità di broncodilatatore è generalmente molto inferiore rispetto a quella del corticosteroide (fino ad un decimo rispetto a quella del corticosteroide) (Cave & Hurst, 2011).

3.2.5 Valutazione del diametro aerodinamico delle SLM caricate con SX

Per poter valutare il diametro aerodinamico e la deposizione *in vitro* del SX, le SLM preparate sono state ridisperse in soluzione acquosa e nebulizzate con il nebulizzatore aereo PariSX® collegato al New Generation Impactor (NGI), come precedentemente descritto per le microparticelle contenenti FP. Il MMAD (Diametro Aerodinamico Mediano di Massa) \pm GSD (deviazione standard geometrica) delle SLM con alginato contenenti SX è risultato pari a $3.65 \pm 1.29 \mu\text{m}$.

La quantità di campione caricata nel nebulizzatore, anche in questo caso, non è stata completamente aerosolizzata. Infatti, la massa totale in uscita è risultata del 47%, probabilmente in seguito alla formazione di aggregati microparticellari durante il processo di nebulizzazione. Inoltre, la frazione di particelle fini (FPF%) è risultata pari al 75% e la dose di particelle fini (FPD) è risultata pari a 0.17 mg. Tali valori sono predittivi di una efficace deposizione del farmaco negli stadi più lontani dell'impattore, i quali mimano le parti profonde dell'albero respiratorio.

Come riportato in precedenza per le microparticelle contenenti FP, anche in questo caso è possibile affermare che le microparticelle

contenenti SX rappresentano un sistema idoneo per il rilascio del farmaco nelle vie aeree profonde (per esempio i bronchi secondari).

3.2.6 Studi di vitalità cellulare (saggio MTS) delle SLM caricate con SX

Tutti i sistemi preparati, sia vuoti che caricati con SX, sono stati sottoposti a saggi di vitalità cellulare, utilizzando la linea cellulare epiteliale bronchiale 16-HBE. I dati riportati in fig. 40 mostrano il comportamento delle cellule incubate con SX libero, SLM con alginato vuote (SLM ALG V) ed SLM caricate con SX (SLM ALG SX) ad una concentrazione di farmaco compresa tra 10^{-6} M e 10^{-12} M.

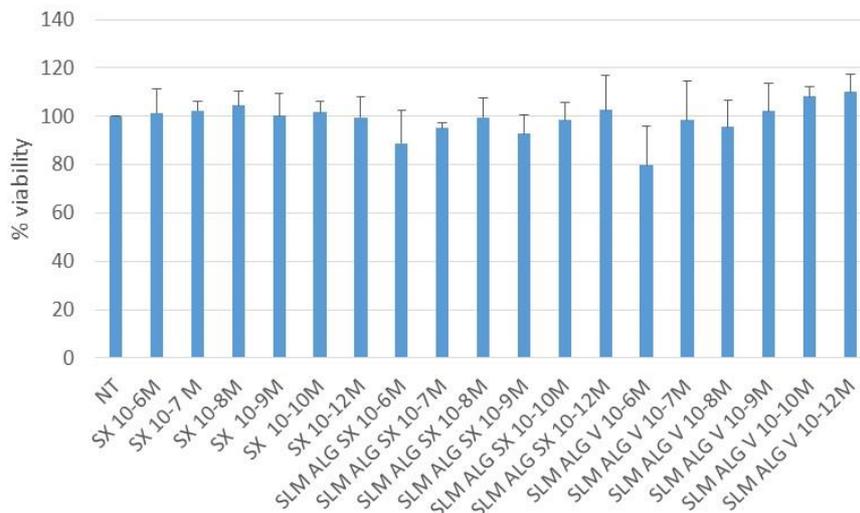


Fig. 40. Saggio di vitalità cellulare delle cellule 16-HBE trattate con SX libero, SLM con alginato vuote ed SLM caricate con SX.

Come si evince dal grafico, le SLM vuote e caricate con SX sono state ben tollerate a tutte le concentrazioni utilizzate, ad eccezione della concentrazione di 10^{-6}M che determina una riduzione della vitalità cellulare di circa il 20%. Per tale motivo, negli esperimenti successivi le SLM-SX sono state utilizzate alle concentrazioni di 10^{-7}M e 10^{-8}M .

3.2.7 Valutazione dell'espressione di cAMP dopo trattamento con SX libero e veicolato

I β -2 agonisti a lunga durata d'azione (LABAs) sono considerati i farmaci di prima scelta nel trattamento di malattie come l'asma e la BPCO. Il salmeterolo xinafoato esplica la sua azione legandosi al sito attivo del recettore β -2 adrenergico. Tale legame determina l'attivazione dell'adenilato ciclasi (AC) e la generazione di cAMP intracellulare, che a sua volta può attivare molecole effettrici come la protein chinasi A cAMP-dipendente (PKA) (Mario Cazzola et al., 2013). La produzione di cAMP intracellulare è quindi un segnale importante dell'attivazione del recettore β -2 adrenergico. In questo studio abbiamo voluto valutare l'effetto del SX libero e veicolato dalle SLM con alginato, alle concentrazioni di 10^{-7}M e 10^{-8}M , sull'aumento

dell'espressione dell'cAMP intracellulare nelle cellule epiteliali bronchiali 16-HBE.

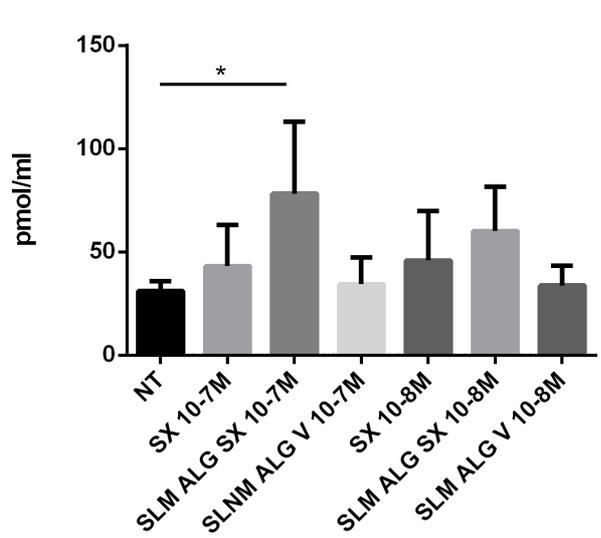


Fig. 41. Espressione dell'cAMP nelle cellule 16-HBE, dopo trattamento con SX libero, SLM vuote ed SLM caricate con SX.

Come si può notare dalla fig. 41, il SX libero, alla concentrazione di $10^{-7}M$, determina un aumento dell'espressione dell'cAMP. Tale fenomeno è ancor più evidente quando il SX è veicolato dalle SLM con alginato. Alla concentrazione di $10^{-8}M$, il farmaco veicolato risulta sempre più efficace rispetto al farmaco libero, ma l'incremento di cAMP è minore.

I sistemi vuoti, invece, non hanno influenzato l'espressione dell'cAMP a nessuna delle concentrazioni testate.

Analizzando i dati soprariportati, è possibile affermare che il farmaco veicolato è risultato più efficace rispetto al farmaco libero, probabilmente poiché il sistema microparticellare, grazie alle sue caratteristiche mucoadesive, permane per un tempo maggiore a contatto con l'epitelio bronchiale, determinando una maggiore attivazione recettoriale e quindi un maggiore rilascio di cAMP.

3.3 Microparticelle solide lipidiche (SLM) contenenti l'acido docosaesaenoico (DHA)

Lo stress ossidativo rappresenta uno dei principali fattori di rischio nello sviluppo della BPCO. Diversi studi clinici dimostrano che agenti antiossidanti e/o antiinfiammatori rappresentano potenziali farmaci per il trattamento di questa patologia. Tali antiossidanti, infatti, sono in grado di ridurre i componenti cellulari ossidati e di aumentare l'efficacia dei glucocorticoidi, inibendo l'attivazione del fattore NF- κ B, l'acetilazione degli istoni e il rilascio di citochine infiammatorie tramite un meccanismo che prevede l'up-regulation dell'enzima HDAC2, che ha la funzione di bloccare l'espressione di proteine pro-infiammatorie (Rahman, 2006).

Nel presente lavoro sono state realizzate Microparticelle Solide Lipidiche (SLM) contenenti l'acido docosaesaenoico (ω -3) per il co-trattamento della BPCO. La tecnica utilizzata è stata quella della precipitazione etanolica. Tutti i sistemi, vuoti e carichi con DHA, sono stati ampiamente caratterizzati da un punto di vista chimico-fisico e tecnologico-farmaceutico ed inoltre, sono stati effettuati studi biologici di citotossicità in vitro utilizzando la linea cellulare epiteliale bronchiale 16-HBE.

3.3.1 SLM preparate in presenza di chitosano (a basso P.M.) contenenti DHA

I sistemi microparticellari, vuoti e caricati con DHA, sono stati ottenuti utilizzando un chitosano a basso P.M., così come descritto nella parte sperimentale (vedi sezione 5.2.4 di Materiali e Metodi).

Successivamente, tali sistemi sono stati dispersi in soluzione acquosa e caratterizzati in termini di size, indice di polidispersità e potenziale zeta. I dati ottenuti sono riportati in tabella 4.

Tabella 4. Size, PDI, potenziale zeta, delle SLM preparate.

Sistemi	Z-average (nm)	PDI	ζ-potential (mV)
SLM vuote	1928	0.213	+23.8 ±2.96
SLM-DHA	2378	0.262	+20.1±3.87

Analizzando i dati in tabella è possibile affermare che la presenza del DHA all'interno del sistema microparticellare comporta un lieve incremento delle dimensioni e dell'indice di polidispersità, mentre la carica superficiale rimane paragonabile.

3.3.2 Saggio turbidimetrico

La mucoadesione del sistema microparticellare preparato è stata valutata anche in questo caso tramite saggio turbidimetrico. L'analisi è stata effettuata incubando diverse sospensioni acquose di SLM con chitosano contenenti DHA (da 0.25 mg/ml fino ad 1 mg/ml) con una soluzione acquosa di mucina allo 0.1% (p/v) fino ad un tempo di 6 ore (Takeuchi et al., 2005). Inoltre, al fine di verificare che il sistema mantenesse le sue proprietà mucoadesive anche in mezzo salino, l'esperimento è stato ripetuto incubando diverse sospensioni di SLM contenenti DHA in PBS a pH 7.4 (da 0.25 mg/ml fino ad 1 mg/ml) con una soluzione di mucina allo 0.1% (p/v) nello stesso mezzo.

Le interazioni mucoadesive tra le particelle e la mucina si traducono in un assorbimento della mucina intorno alla superficie delle particelle e conseguentemente in una leggera aggregazione che può essere rilevata come un incremento dell'assorbimento all'UV (Bonferoni et al., 2010).

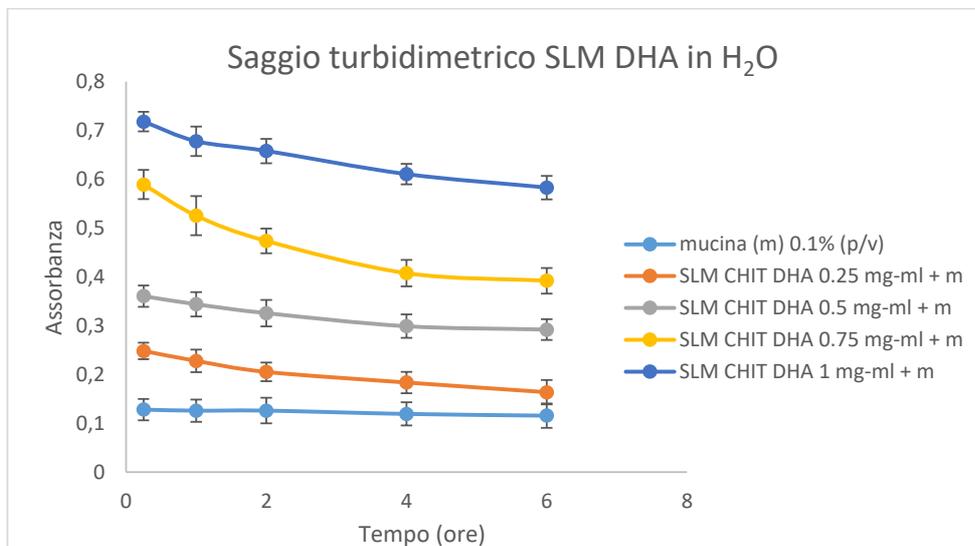


Fig. 42. Valutazione dell'interazione tra differenti sospensioni acquose di SLM con chitosano contenenti DHA e la mucina tramite saggio turbidimetrico.

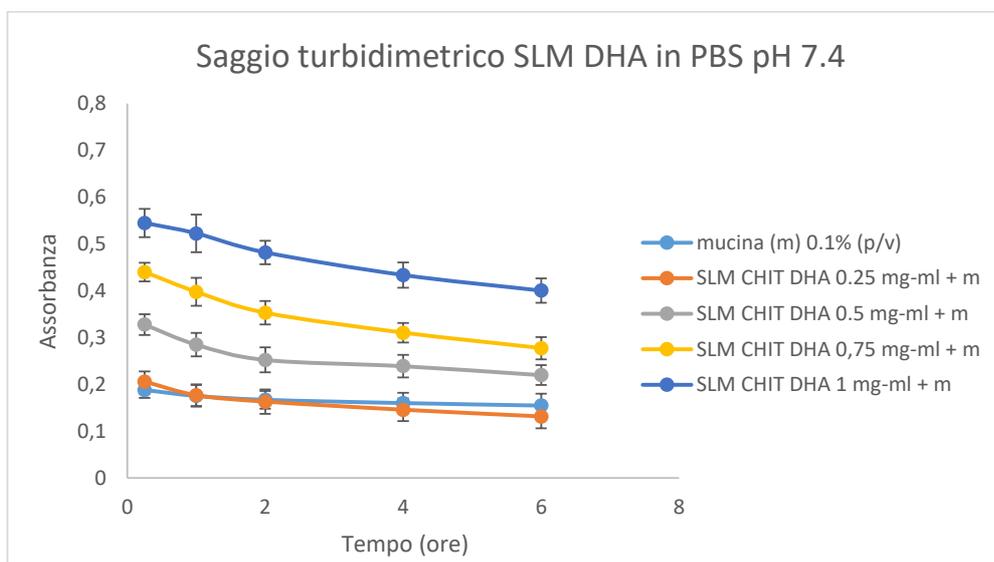


Fig. 42. Valutazione dell'interazione tra differenti sospensioni in PBS a pH 7.4 di SLM con chitosano contenenti DHA e la mucina tramite saggio turbidimetrico.

Confrontando i valori di assorbanza presenti nelle figg. 42-43, è possibile affermare che, a parità di concentrazione analizzata, il

sistema microparticellare presenta un valore di assorbanza maggiore e quindi una maggiore affinità con la mucina quando viene disperso in soluzione acquosa. I valori di assorbanza misurati in mezzo salino sono comunque tali da poter assicurare una buona capacità mucoadesiva del sistema anche quando questo è disperso in soluzione salina.

3.3.3 Determinazione della Drug Loading e dell'Efficienza d'Intrappolamento

Per valutare la quantità di acido docosaesaenoico intrappolata all'interno delle microparticelle è stata eseguita un'analisi HPLC, come riportato nella sezione 5.2.12 di Materiali e Metodi.

Il valore di Drug Loading, espresso come rapporto percentuale in peso tra la quantità di DHA presente e il peso totale del campione secco (DL% w/w) e l'*Efficienza di Intrappolamento* (EE%), espressa come rapporto percentuale in peso tra la quantità di DHA intrappolata nelle SLM e la quantità totale di DHA utilizzata per preparare le particelle, sono risultati rispettivamente il 6.00% e l'81.22%.

Un valore di efficienza così elevato è probabilmente dovuto ad una buona solubilità del farmaco nella matrice utilizzata per la preparazione delle microparticelle.

3.3.4 Valutazione del diametro aerodinamico delle SLM caricate con DHA

Anche in questo caso, per poter valutare il diametro aerodinamico e la deposizione in vitro delle SLM caricate con DHA, queste ultime sono state ridisperse in soluzione acquosa e nebulizzate con il nebulizzatore aereo PariSX® collegato al New Generation Impactor (NGI), come precedentemente descritto. La stabilità delle microparticelle, che svolgono un ruolo fondamentale per la somministrazione polmonare, è stata valutata anche durante la fase di nebulizzazione. Quest'ultima, infatti, implica ripetuti cicli di formazione di aerosol, durante i quali vengono applicati forze di taglio alle formulazioni testate che possono distruggerne la struttura (Melis et al., 2016).

La dispersione microparticellare, anche in questo caso, non è stata completamente nebulizzata. Infatti, la produzione totale di massa (TMO) è risultata pari al 54,5%, probabilmente a causa delle forze di

taglio sopra indicate, che favorivano l'aggregazione delle particelle, riducendo così l'efficacia dell'aerosolizzazione. Tuttavia, l'importo e la percentuale di farmaco nebulizzati, depositati nelle fasi più lontane dell'impattore, sono stati elevati, essendo rispettivamente l'87% la FPF% e 2.9 mg la FPD.

L'MMDA \pm GSD delle SLM caricate con DHA (3.87 ± 1.27 μm) è risultato appropriato per la somministrazione polmonare, dal momento che in letteratura è noto che particelle aventi diametro aerodinamico nel range di 1-5 μm si depositano mediante deposizione gravitazionale nel tratto centrale e distale delle vie aeree (Amore et al., 2017)

3.3.5 Studi di rilascio del DHA in PBS/EtOH 80:20

Successivamente sono state analizzate le cinetiche di rilascio del DHA dal sistema microparticellare preparato, utilizzando come mezzo di dissoluzione una soluzione contenente PBS a pH 7.4/EtOH in rapporto 80/20 (v/v), come descritto nella sezione sperimentale (vedi capitolo 5.2.17 di Materiali e Metodi). Ad intervalli di tempo prestabiliti è stata prelevata un'aliquota dal compartimento donatore ed è stata sottoposta ad analisi HPLC.

Di seguito viene riportato il profilo di rilascio del DHA dal sistema microparticellare preparato (fig. 43). Le cinetiche di rilascio sono state studiate fino a 72 ore.

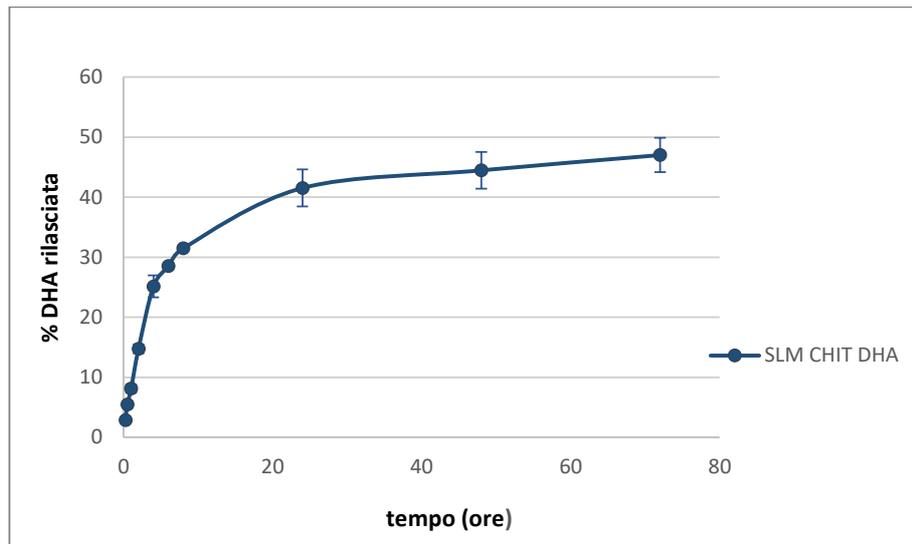


Fig. 43. Profilo di rilascio del DHA dalle SLM preparate.

Come si evince dal grafico sopra riportato, il sistema microparticellare preparato presenta un *burst release* iniziale di circa il 30% e successivamente un rilascio prolungato fino a 72 ore, con solo il 50% di farmaco rilasciato dopo questo tempo. Inoltre, la percentuale di farmaco non ancora rilasciata è stata ritrovata tutta all'interno delle microparticelle, per cui tale quota potrebbe essere disponibile nelle vie aeree dopo questo tempo.

3.3.6 Studi di vitalità cellulare (saggio MTS) delle SLM caricate con DHA

Tutti i sistemi preparati, sia vuoti che caricati con DHA, sono stati sottoposti a saggi di vitalità cellulare, utilizzando la linea cellulare epiteliale bronchiale 16-HBE. I dati riportati in fig. 44 mostrano il comportamento delle cellule incubate con DHA libero, SLM con chitosano vuote (SLM CHIT VUOTE) ed SLM caricate con DHA (SLM CHIT DHA) ad una concentrazione di farmaco compresa tra 2 μ M e 50 μ M.

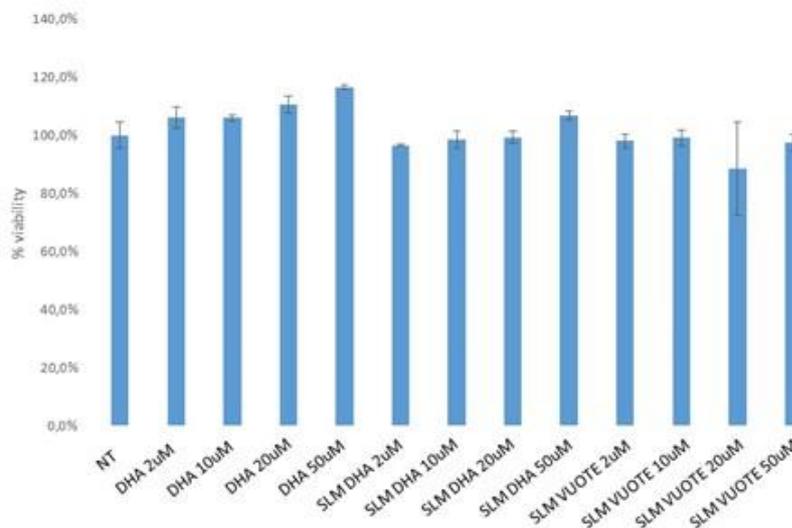


Fig. 44. Saggio di vitalità cellulare delle cellule 16-HBE trattate con DHA libero, SLM con chitosano vuote ed SLM con chitosano caricate con DHA.

Come si evince dal grafico, le SLM vuote e caricate con DHA sono state ben tollerate a tutte le concentrazioni utilizzate.

4. CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di dottorato è stata descritta la preparazione e la caratterizzazione di sistemi microparticellari lipidici per il rilascio controllato di corticosteroidi, broncodilatatori e antiossidanti utili nel trattamento della BPCO.

Le tecniche utilizzate hanno permesso di ottenere microparticelle con dimensioni utili (MMAD=3.5-4 μm) per il rilascio topico dei farmaci ai bronchi secondari, evitando in questo modo gli effetti collaterali dovuti ad un assorbimento di tipo sistemico nei capillari alveolari. Inoltre, al fine di aumentare il tempo di residenza del farmaco nell'epitelio respiratorio, i sistemi realizzati sono stati resi mucoadesivi grazie all'utilizzo di polimeri biocompatibili quali sodio alginato e chitosano (oligosaccaridi lattato del chitosano e chitosano a basso P.M.).

Per quanto riguarda le microparticelle contenenti fluticasone propionato, sono stati realizzati due sistemi: il primo utilizzando oligosaccaridi lattato del chitosano e il secondo utilizzando il sodio alginato. In particolare, il rivestimento con sodio alginato ha permesso la formazione di un sistema con migliori caratteristiche mucoadesive dovute ad un numero maggiore di interazioni con i componenti della

mucina. L'analisi morfologica al SEM ha confermato la dimensione micrometrica delle SLM e la loro la forma sferica.

Tutti i sistemi carichi di FP preparati hanno mostrato buone capacità di intrappolamento, con valori di LC% ed *EE%* abbastanza elevati.

I dati sperimentali ottenuti dallo studio delle cinetiche di rilascio del FP dai carriers microparticellari hanno mostrato un rilascio prolungato del farmaco se paragonato allo stesso in forma libera.

Inoltre, sia i sistemi vuoti che carichi di FP, non hanno mostrato effetti citotossici sulla linea cellulare epiteliale bronchiale 16-HBE dell'epitelio polmonare.

Infine, il FP veicolato tramite il sistema microparticellare con alginato ha mostrato un'efficacia maggiore rispetto al farmaco libero nell'inibire processi cellulari indotti dallo stress ossidativo, riducendo l'espressione di p-ERK e survivina nelle cellule 16-HBE trattate con CSE.

Questi dati suggeriscono che i sistemi descritti nel presente lavoro di dottorato potrebbero essere proposti come carriers per la veicolazione di fluticasone propionato nel trattamento della BPCO. Sicuramente tali studi andrebbero supportati da prove *in vivo*, al fine

di valutare l'attività farmacodinamica del FP nella sua forma libera e veicolata.

Considerando che la terapia attuale per il trattamento della BPCO prevede l'associazione di un broncodilatatore al corticosteroide, lo stesso sistema microparticellare preparato con sodio alginato contenete FP è stato successivamente utilizzato per la veicolazione del SX. Anche in questo caso, sono state ottenute microparticelle solide lipidiche aventi diametro aerodinamico, carica superficiale e capacità mucoadesive utili per il rilascio del farmaco a livello dei bronchi secondari.

Successivamente sono stati condotti studi di spettroscopia fotoelettronica a raggi X sui sistemi caricati con SX, per confermare la presenza del farmaco sulla superficie delle particelle, dal momento che, analizzando le cinetiche di rilascio, tali sistemi non avevano mostrato un *controlled release* del farmaco. Tali studi hanno infatti confermato la presenza del SX sulla superficie nanoparticellare e la presenza del polimero di rivestimento, il sodio alginato, sulla superficie delle microparticelle.

Inoltre, le SLM vuote e caricate con SX sono state ben tollerate a tutte le concentrazioni utilizzate, ad eccezione della concentrazione

di 10^{-6} M che ha comportato una riduzione della vitalità cellulare di circa il 20%. Per tale motivo, negli esperimenti successivi le SLM-SX sono state utilizzate alle concentrazioni di 10^{-7} M e 10^{-8} M.

Infine, il SX veicolato tramite il sistema microparticellare con alginato ha mostrato un'efficacia maggiore rispetto al SX libero nell'incremento dell'espressione dell'cAMP a tutte le concentrazioni considerate. Tale fenomeno è probabilmente dovuto alle caratteristiche mucoadesive del sistema, che permanendo per un tempo maggiore a contatto con l'epitelio bronchiale, determinerebbe una maggiore attivazione recettoriale e quindi un maggiore rilascio di cAMP.

L'ultima parte del lavoro di dottorato ha previsto la realizzazione di SLM per la veicolazione dell'acido docosaesaenoico, un antiossidante in grado di aumentare l'efficacia dei glucocorticoidi, inibendo l'attivazione del fattore NF- κ B, l'acetilazione degli istoni e il rilascio di citochine infiammatorie. Anche in questo caso, sono state ottenute microparticelle solide lipidiche aventi diametro aerodinamico, carica superficiale e capacità mucoadesive utili per il rilascio del farmaco a livello dei bronchi secondari. In particolar modo, le microparticelle sono state rese mucoadesive grazie

all'utilizzo di un chitosano a basso P.M., così come riportato in diversi studi in letteratura. Inoltre è stato effettuato un confronto tra la capacità mucoadesiva ottenuta disperdendo i sistemi in acqua e in PBS a pH 7.4. I dati ottenuti confermano che il sistema microparticellare presenta un valore di assorbanza maggiore e quindi una maggiore affinità con la mucina quando viene disperso in soluzione acquosa. I valori di assorbanza misurati in mezzo salino sono comunque tali da poter assicurare una buona capacità mucoadesiva del sistema anche quando questo è disperso in soluzione salina.

Le SLM contenenti DHA hanno mostrato buone capacità di intrappolamento, con valori di LC% ed *EE%* abbastanza elevati.

I dati sperimentali ottenuti dallo studio delle cinetiche di rilascio del DHA dai carriers microparticellari hanno mostrato un *burst release* iniziale di circa il 30% e successivamente un rilascio prolungato fino a 72h, con solo il 50% di farmaco rilasciato dopo questo tempo. Inoltre, la percentuale di farmaco non ancora rilasciata è stata ritrovata tutta all'interno delle microparticelle, per cui tale quota potrebbe essere disponibile nelle vie aeree dopo questo tempo.

Successivamente sono stati condotti studi di biocompatibilità sulla linea cellulare epiteliale bronchiale 16-HBE dell'epitelio

polmonare e sia i sistemi vuoti che carichi di DHA non hanno mostrato effetti citotossici. Infine, sono attualmente in corso saggi biologici al fine di valutare un possibile incremento dell'efficacia di tale molecola veicolata rispetto alla sua forma libera.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Materiali

Il Fluticasone Propionato (FP) ed il Salmeterolo Xinafoato (SX) sono stati acquistati da Molekula (Rimini, Italia). L'acido docosaesaenoico (DHA) è stato acquistato da Cayman chemical (Amburgo, Germania). Gli oligosaccaridi lattato del chitosano (Mw: 5000 Da), il chitosano a basso peso molecolare (Mw: 50,000-190,000 Da con grado di deacetilazione di circa il 75%) il Pluronic F-68 (copolimero in blocco di poliossietilene-poliossipropilene), il DDAB (dimetildioctadecil-ammonio bromuro), il sodio alginato, la mucina di derivazione suina (tipo III), il sodio dodecil solfato (SDS), il Tween 80 (polietilensorbitano monolaurato) e l'acetonitrile di grado HPLC sono stati acquistati alla Sigma Aldrich (Milano, Italia.).

Il metanolo di grado HPLC, il diclorometano, l'etanolo e l'acido acetico glaciale di grado HPLC sono stati acquistati alla VWR (Milano, Italia).

La tripalmitina è stata acquistata alla Alfa Aesar GmbH & Co KG (Karlsruhe, Germany). Il Miglyol 812 (trigliceridi dell'acido caproico/caprilico/caprico 50/45/5% w/w) è stato gentilmente fornito da Sasol GmbH (Hamburg, Germany). Il Precirol ATO 5 (gliceril-

distearato) e il Biogapress Vegetal BM 297 ATO (gliceril palmitostearato) sono stati gentilmente forniti da Gattefossè (Francia).

L'Epikuron 200 (lecitina di soia) è stato fornito da Lucas Meyer Company (Germania).

Il calcio cloruro (granulato) è stato acquistato alla Carlo Erba Reagenti Srl (Cornaredo (Mi), Italia).

Il terreno di coltura MEM (Minimum Essential Medium), FCS (siero fetale bovino), la gentamicina, la glutammina, l'Hepes ed il tampone fosfato (PBS; senza calcio e magnesio) a pH 7.4 (1X) sono stati acquistati alla Gibco by Life Technologies (Thermofisher, Italia).

5.2 Metodi

5.2.1 Preparazione di Microparticelle Solide Lipidiche (SLM) in presenza di oligosaccaridi del chitosano contenenti FP

Tutti i campioni sono stati ottenuti con la tecnica della precipitazione etanolica. La fase lipidica è stata preparata riscaldando la tripalmitina (180 g) a circa 10-15°C sopra il suo punto di fusione. Per la preparazione delle particelle cariche di farmaco, in questa fase è stato aggiunto il FP (30 mg) al lipide fuso, mantenendo il sistema sotto agitazione. Successivamente alla fase lipidica è stata aggiunta

una soluzione etanolica (2 ml) di Epikuron 200 (50 mg). La soluzione organica ottenuta è stata precipitata in 50 ml di acqua bidistillata a 80 ± 1 °C, contenente oligosaccaridi del chitosano lattato 0.1% (p/v) e omogeneizzata tramite l'impiego di un Ultraturrax T125 (IKA Labortechnik, Germania) a 21,500 rpm per 2 minuti. La dispersione acquosa risultante è stata poi sottoposta ad una successiva omogeneizzazione ad alta pressione utilizzando un High Pressure Lab Homogenizer (LM10 Microfluidizer®, Microfluidics, USA) per 2 minuti a 10,000 psi. L'emulsione così ottenuta è stata raffreddata rapidamente in bagno di ghiaccio per 30 minuti.

Infine, le microparticelle sono state purificate tramite esaustiva dialisi mediante impiego di tubi da dialisi aventi un cut-off di peso molecolare 12,000/14,000 Da (Spectra/Por® USA) e successivamente liofilizzate per gli studi successivi. I sistemi ottenuti sono stati conservati a temperatura ambiente.

5.2.2 Preparazione di Microparticelle Solide Lipidiche (SLM) in presenza di sodio alginato contenenti FP

Tutti i campioni sono stati ottenuti con la tecnica della precipitazione etanolica. Per la preparazione delle SLM con sodio

alginate è stata dapprima preparata una dispersione di nanoparticelle solide lipidiche cationiche (cSLN), che è stata successivamente rivestita con una soluzione di sodio alginato, allo scopo di ottenere microparticelle solide lipidiche (SLM).

Inizialmente il Precirol ATO 5 (118 mg) è stato riscaldato a 5-10°C sopra il suo punto di fusione. Per la preparazione delle particelle cariche di farmaco, in questa fase è stato aggiunto il FP (30 mg) al lipide fuso, mantenendo il sistema sotto agitazione. Successivamente, alla fase lipidica è stata aggiunta la soluzione etanolica (2 ml) contenente i tensioattivi Pluronic F68 (200 mg) e DDAB (30 mg). La soluzione organica è stata precipitata in 100 ml di acqua bidistillata a 80 ± 1 °C e omogeneizzata tramite l'impiego di un UltraTurrax T25 a 17,500 rpm per 10 minuti. La dispersione colloidale ottenuta è stata purificata tramite dialisi, come descritto precedentemente.

Dopo purificazione le cSLN sono state rivestite con una soluzione di sodio alginato all'1% (p/v), utilizzando un rapporto cSLN:sodio alginato 1:8 (p/p). La sospensione microparticellare ottenuta è stata mantenuta sotto agitazione meccanica per circa 30 minuti e successivamente è stata centrifugata a 40,000 rpm a 4 ± 1 °C, per 50 minuti. Infine, il surnatante è stato scartato, mentre il pellet,

contenente le microparticelle precipitate, è stato risospeso in un ugual volume di una soluzione acquosa di CaCl_2 0.5 mM e mantenuto sotto agitazione per circa 15 minuti, al fine di consentire la formazione dei legami tra l'alginato e la superficie particellare (fig. 45). Anche in questo caso, il sistema è stato liofilizzato e le microparticelle ottenute sono state conservate a temperatura ambiente.

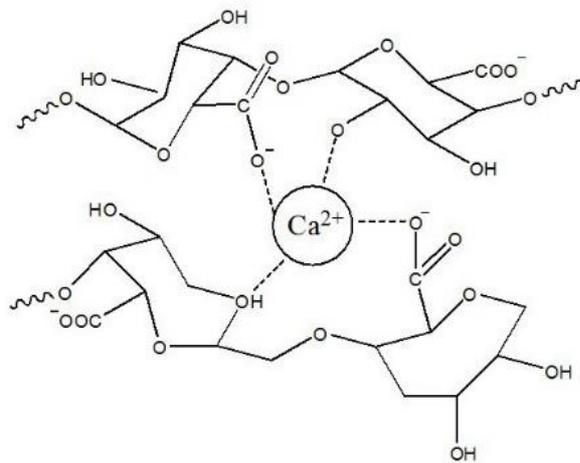


Fig. 45. Cross-linking formatosi per aggiunta di CaCl_2 al sistema microparticellare costituito da Na alginato.

5.2.3 Preparazione di Microparticelle Solide Lipidiche (SLM) in presenza di sodio alginato contenenti SX

Le SLM con sodio alginato, vuote e caricate con SX, sono state preparate utilizzando la stessa tecnica descritta in precedenza, con una piccola variante nell'omogeneizzazione del sistema nanoparticellare. Come soprariportato, infatti, il Precirol ATO 5 (118 mg) è stato

inizialmente riscaldato a 5-10°C sopra il suo punto di fusione. Per la preparazione delle particelle cariche di farmaco, in questa fase è stato aggiunto il SX (50 mg) al lipide fuso, mantenendo il sistema sotto agitazione. Successivamente alla fase lipidica è stata aggiunta la soluzione etanolica (2 ml) contenente i tensioattivi Pluronic F68 (200 mg) e DDAB (30 mg). La soluzione organica è stata precipitata in 100 ml di acqua bidistillata a 80°C e omogeneizzata dapprima tramite l'impiego di un UltraTurrax T25 a 17,500 rpm per 10 minuti e successivamente mediante un omogeneizzatore ad alta pressione (LM10 Microfluidizer®, Microfluidics, USA) per 2 minuti a 10,000 psi.

Dopo purificazione le cSLN sono state rivestite utilizzando lo stesso procedimento descritto in precedenza e conservate a temperatura ambiente per la successiva caratterizzazione.

5.2.4 Preparazione di Microparticelle Solide Lipidiche (SLM) in presenza di chitosano contenenti DHA

Tutti i campioni sono stati ottenuti, anche in questo caso, utilizzando la tecnica della precipitazione etanolica. La fase lipidica, costituita da Biogapress Vegetal BM 287 ATO (200 mg), è stata

preparata riscaldando a circa $65\pm 1^{\circ}\text{C}$. Per la preparazione delle particelle cariche di farmaco, in questa fase è stato aggiunto il DHA (25 mg) al lipide fuso, mantenendo il sistema sotto agitazione. Successivamente alla fase lipidica è stata aggiunta la soluzione etanolica (2 ml) contenente i tensioattivi Miglyol 812 (95.0 μl) e Tween 80 (56.0 μl). La soluzione organica così ottenuta è stata precipitata in 50 ml di acqua bidistillata a $80\pm 1^{\circ}\text{C}$, contenente il chitosano (a basso P.M.) allo 0.05% (p/v) e acido acetico allo 0.1% (v/v) per favorire la solubilizzazione del polimero in acqua. Il sistema risultante è stato quindi omogeneizzato dapprima tramite l'impiego di un UltraTurrax T25 a 13,500 rpm per 2 minuti e successivamente mediante un omogeneizzatore ad alta pressione (LM10 Microfluidizer®, Microfluidics, USA) per 4 minuti a 10,000 psi.

L'emulsione ottenuta è stata raffreddata rapidamente in bagno di ghiaccio per 30 minuti.

Infine, le microparticelle sono state purificate tramite esaustiva dialisi come sopra descritto e liofilizzate per gli studi successivi. I sistemi ottenuti sono stati conservati in freezer ($-20\pm 1^{\circ}\text{C}$) e al buio, al fine di preservare il DHA da eventuali processi ossidativi.

5.2.5 Determinazione delle dimensioni dei sistemi preparati

Il diametro medio (size) e l'indice di polidispersità o PDI (misura della distribuzione delle nano o microparticelle) dei sistemi sono stati determinati mediante l'utilizzo del Nano ZS (Malvern Instrument Ltd, UK), sfruttando la tecnica PCS (Photon Correlation Spectroscopy). Le misure sono state effettuate ad un angolo di 173° rispetto al raggio incidente e ad una temperatura di $25 \pm 1^\circ\text{C}$. I campioni ottenuti dopo liofilizzazione sono stati ulteriormente dispersi in diversi mezzi acquosi, sonicati per 5 minuti e sottoposti ad analisi dimensionale. In particolare sono stati utilizzati tre mezzi disperdenti: acqua bidistillata, soluzione acquosa di NaCl 0.9% (p/v) e tampone fosfato (PBS) a pH 7.4.

L'utilizzo di mezzi salini come NaCl 0.9% e di PBS pH 7.4 ha comportato una variazione nel settaggio dello strumento: $\mu = 0.902$; RI = 1.331 per NaCl; $\mu = 0.980$, RI = 1.334 per PBS. Per l'analisi sono stati utilizzati tre diversi lotti ed è stata valutata la media dei risultati. Lo studio è stato effettuato in triplicato.

5.2.6 Misure di potenziale zeta (ζ - potential)

La carica superficiale dei sistemi preparati (potenziale zeta) è stata determinata tramite uno Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Malvern, UK) che sfrutta la tecnica della microelettroforesi. L'analisi è stata effettuata alla temperatura di $25\pm 1^\circ\text{C}$ utilizzando il campione diluito negli stessi mezzi usati per effettuare le misure di size. Anche il settaggio dello strumento è lo stesso descritto in precedenza; lo studio è stato effettuato in triplicato e i risultati sono stati ottenuti considerando una media di tre differenti lotti.

5.2.7 Analisi SEM

Per effettuare l'analisi morfologica dei sistemi microparticellari preparati è stato utilizzato il microscopio a scansione elettronica ESEM FEI Quanta 200F.

I campioni sono stati dispersi in acqua e depositati direttamente su stub di alluminio. L'acqua è stata allontanata per evaporazione a temperatura ambiente per 24h e successivamente tutti i campioni sono stati resi elettricamente conduttivi tramite rivestimento sotto vuoto con una fine polvere di oro, utilizzando uno Scacoat six Pirani S01 (Edwards Milano).

5.2.8 Saggio turbidimetrico

In questo studio le proprietà mucoadesive delle microparticelle preparate sono state valutate confrontando l'assorbanza a 500 nm di una dispersione acquosa di SLM ottenuta dopo incubazione per 6 ore con mucina e una soluzione costituita dalla stessa mucina. L'analisi è stata effettuata a $37\pm 1^\circ\text{C}$ usando uno spettrofotometro a doppio raggio UV-1800 Shimadzu. Per effettuare l'analisi, diverse sospensioni acquose di SLM (range 0.25 mg/ml-1 mg/ml) sono state incubate con una soluzione di mucina allo 0.1% (p/v) mantenendo un rapporto SLM:mucina 1:1 (v/v). L'incremento di turbidità della dispersione di SLM+mucina indica che il sistema microparticellare è dotato di proprietà mucoadesive.

5.2.9 Spettroscopia fotoelettronica a raggi X dei sistemi caricati con SX

Le analisi di spettroscopia fotoelettronica a raggi X sono state eseguite sui sistemi nano e microparticellari caricati con salmeterolo xinafoato, per confermare la presenza del farmaco sulla superficie delle particelle. A tale scopo è stato utilizzato un VGAMicrotech ESCA 3000Multilab, dotato di un doppio anodo Mg/Al. Gli atomi

sono stati ionizzati da una fonte non monocromatica Al-K α (1486.6 eV) impostata a 14 kV e 10 mA e successivamente, sono stati registrati impostando l'analizzatore ad una *pass energy* pari a 50eV per gli spettri relativi all'intero range e a 20eV per l'analisi ad alta risoluzione delle singole regioni. Durante la raccolta dei dati, la pressione nella camera di analisi era nel range di 10⁻⁸ Torr. Il caricamento dei campioni è stato rimosso riferendo tutte le energie al C1s impostato a 285.1 eV. L'assenza di carica differenziale è stata garantita dalla forma inalterata del picco all'inizio e alla fine dell'analisi. Le analisi dei picchi sono state eseguite con il software CASAXPS. Le concentrazioni atomiche sono state calcolate dall'intensità del picco utilizzando i fattori di sensibilità forniti con il software. L'energia di legame è stata valutata con una precisione di \pm 0.15 eV e la percentuale atomica con una precisione di \pm 10%.

5.2.10 Analisi cromatografica del Fluticasone Propionato (FP)

La capacità di carico (Loading Capacity %) e le cinetiche di rilascio del fluticasone propionato dalle SLM preparate sono state determinate tramite un adeguato metodo HPLC. L'analisi è stata effettuata a temperatura ambiente utilizzando un HPLC UFLC-

Prominence system della Shimadzu Instrument, Giappone. Lo strumento è equipaggiato con due pompe LC-20 AD, un detector UV-Vis SPD-20 AV, un autocampionatore SIL-20 HT ed una colonna Gemini® C18 Phenomenex (250 mm, dimensione particellare di 5 µm e porosità di 110 Å). È stata utilizzata una fase mobile costituita da una miscela di CH₃CN/H₂O 65:35 (v/v) con un flusso di 1.2 ml/min. L'eluizione è stata effettuata in condizioni isocratiche e l'analisi qualitativa è stata effettuata alla lunghezza d'onda (λ) di 238 nm. L'integrazione automatica dei picchi del fluticasone propionato è stata effettuata servendosi di una retta di taratura ottenuta iniettando all'HPLC soluzioni organiche costituite da CH₂Cl₂/CH₃CN 3:2 (v/v) a concentrazioni note di farmaco; il tempo di ritenzione ottenuto è stato di 7.0 minuti. La linearità del metodo è stata studiata utilizzando concentrazioni di FP comprese tra 10 e 100 µg/ml e l'equazione ottenuta è stata: $y = 50142x + 239223$ con un coefficiente di correlazione lineare pari a $r^2 = 0.9967$.

Al fine di valutare eventuali interazioni tra il FP e i filtri in PTFE, sono state analizzate all'HPLC diverse soluzioni organiche di FP, a concentrazione nota, prima e dopo filtrazione. Non sono state osservate interazioni tra le molecole di farmaco e i filtri a membrana.

5.2.11 Analisi cromatografica del Salmeterolo Xinafoato (SX)

Per quantificare la capacità di carico (Loading Capacity %) delle SLM caricate con SX e studiarne le cinetiche di rilascio è stato sviluppato un adeguato metodo HPLC. L'analisi è stata effettuata a temperatura ambiente utilizzando lo strumento precedentemente descritto equipaggiato con una colonna Varian C18 (150 mm x 4.60 mm, dimensione particellare di 5 µm e porosità di 90 Å). È stata utilizzata una fase mobile costituita da una miscela di CH₃CN/H₂O a pH 2.5 30:70 (v/v) con un flusso di 0.8 ml/min. L'eluizione è stata effettuata in condizioni isocratiche e l'analisi quali-quantitativa è stata effettuata alla lunghezza d'onda (λ) di 250 nm. L'integrazione automatica dei picchi del SX è stata effettuata servendosi di una retta di taratura ottenuta iniettando all'HPLC soluzioni a concentrazioni note di farmaco in una miscela organica costituita da CH₂Cl₂/CH₃CN 3:2 (v/v); il tempo di ritenzione all'HPLC è stato di 11.0 minuti. La linearità del metodo è stata studiata utilizzando concentrazioni di SX comprese tra 1 e 50 µg/ml e l'equazione ottenuta è stata: $y = 168137x + 139238$ con un coefficiente di correlazione lineare pari a $r^2 = 0.9992$.

Al fine di valutare eventuali interazioni tra il SX e i filtri in PTFE, sono state analizzate all'HPLC diverse soluzioni organiche di

SX, a concentrazione nota, prima e dopo filtrazione. Non sono state osservate interazioni tra le molecole di farmaco e i filtri a membrana.

5.2.12 Analisi cromatografica dell'acido docosaesaenoico (DHA)

La capacità di carico (Loading Capacity %) e le cinetiche di rilascio dell'acido docosaesaenoico (DHA) dalle SLM preparate sono state determinate tramite un adeguato metodo HPLC. L'analisi è stata effettuata a temperatura ambiente utilizzando lo strumento precedentemente descritto equipaggiato con una colonna Gemini® C18 Phenomenex (250 mm, dimensione particellare di 5 µm e porosità di 110 Å). È stata utilizzata una fase mobile costituita da una miscela di CH₃OH/H₂O 93:7 (v/v) a pH 2.66 con un flusso di 1.0 ml/min. L'eluizione è stata effettuata in condizioni isocratiche e l'analisi quali-quantitativa è stata effettuata alla lunghezza d'onda (λ) di 208 nm. L'integrazione automatica dei picchi del DHA è stata effettuata servendosi di una retta di taratura ottenuta iniettando all'HPLC soluzioni a concentrazioni note di farmaco in una miscela organica costituita da etanolo; il tempo di ritenzione all'HPLC è stato di 9.0 minuti. La linearità del metodo è stata studiata utilizzando concentrazioni di DHA comprese tra 5 e 50 µg/ml e l'equazione

ottenuta è stata: $y = 147333x + 52785$ con un coefficiente di correlazione lineare pari a $r^2 = 0.9998$. Al fine di valutare eventuali interazioni tra il DHA e i filtri in PTFE, sono state analizzate all'HPLC diverse soluzioni organiche di DHA, a concentrazione nota, prima e dopo filtrazione. Non sono state osservate interazioni tra le molecole di farmaco e i filtri a membrana.

5.2.13 Determinazione della Drug Loading (FP, SX, DHA) e dell'Efficienza di Intrappolamento delle SLM preparate

Le quantità di fluticasone propionato, salmeterolo xinafoato e acido docosaesaenoico incorporate nelle microparticelle lipidiche (Drug Loading % o DL%), espresse come percentuali di farmaco contenute in 100 mg di materiale secco (matrice lipidica + farmaco) sono state calcolate nel seguente modo:

- 3 mg di SLM caricate con FP sono stati solubilizzati in 12 ml di una miscela di solventi organici $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$ 3:2 (v/v);
- 3 mg di SLM caricate con SX sono stati solubilizzati in 6 ml della stessa miscela precedentemente descritta;
- 3 mg di SLM caricate con DHA sono stati solubilizzati in 6 ml di etanolo.

Le soluzioni organiche risultanti sono state successivamente filtrate con filtri PTFE 0.45 μm (Puradisc Whatman) e quindi analizzate all'HPLC usando i metodi descritti precedentemente. La DL% è stata calcolata utilizzando l'equazione:

$$DL (\%) = \frac{W_{drug}}{W_{Ps}} \times 100$$

dove W_{drug} corrisponde alla quantità di farmaco (mg) realmente intrappolato e W_{Ps} corrisponde alla quantità (mg) di campione utilizzato. Il risultato, espresso come percentuale di farmaco contenuto in 100 mg di materiale liofilizzato, è stato ottenuto in triplicato. Inoltre è stata calcolata anche l'Efficienza d'Intrappolamento (EE %) secondo l'equazione:

$$EE (\%) = \frac{W_f}{W_i} \times 100$$

Dove W_f rappresenta la quantità di farmaco (mg) realmente intrappolata, mentre W_i rappresenta la quantità (mg) di farmaco utilizzato per preparare le particelle caricate di p.a.

5.2.14 Valutazione del diametro aerodinamico delle SLM caricate con FP, SX e DHA

La deposizione in vitro delle SLM preparate è stata valutata utilizzando l'impattore di nuova generazione (Eur. pH 7.2, Copley Scientific Ltd., Nottingham,UK) e il nebulizzatore aereo PariSX® collegato ad un compressore ParyBoySX®. Le SLM sono state disperse in acqua e successivamente un'aliquota per ogni campione (2 ml) è stata posta all'interno del nebulizzatore e aerosolizzata per circa 15 minuti direttamente nella gola del New Generation Impactor (NGI). Alla fine dell'esperimento, la quantità di farmaco depositata in ogni fase dell'impattore e il residuo, sono stati raccolti in tubi di vetro, utilizzando per ogni sistema microparticellare le miscele organiche precedentemente descritte per il calcolo della Drug Loading e le soluzioni risultanti sono state analizzate tramite HPLC. Il Diametro Aerodinamico Mediano di Massa (MMAD) e la deviazione standard geometrica (GSD) sono stati calcolati senza tenere conto della massa depositata nella camera di induzione. La quantità di particelle con diametro inferiore alla dimensione dichiarata per ciascuna fase è stata considerata come percentuale di farmaco recuperata rispetto al

diametro di taglio e il MMAD delle particelle è stato estrapolato dal grafico secondo la farmacopea europea (Manconi et al., 2017).

Inoltre è stata valutata anche la quantità totale di particelle in uscita, ovvero la percentuale di farmaco recuperata dal NGI rispetto alla quantità di farmaco posta inizialmente nel nebulizzatore, la dose di particelle fini (FPD), che rappresenta la quantità di farmaco contenuta in gocce di dimensioni inferiore a 5 μm e la frazione di particelle fini (FPF), che rappresenta la percentuale di gocce di dimensioni inferiori a 5 μm .

5.2.15 Studi di dissoluzione del FP in PBS a pH 7.4 contenente SDS 0.1 % (p/v)

La dissoluzione del FP nella miscela PBS a pH 7.4 contenente SDS allo 0.1% (p/v) è stata valutata disperdendo 2 mg di FP in 70 ml della miscela descritta precedentemente e ponendo tale sospensione in un bagnetto termostato (Benchtop 80 °C Orbital Shaker, modello 420) alla temperatura di 37 ± 0.1 °C, sotto agitazione costante. Ad intervalli di tempo prefissati è stata prelevata un'aliquota del campione, che è stata filtrata utilizzando filtri in acetato di cellulosa (0.45 μm ; VWR, Milano, Italia) ed infine analizzata a $\lambda=237$ nm tramite uno

spettrofotometro UV-1800 a doppio raggio (Shimadzu). Uno stesso volume (2 ml) di mezzo di rilascio è stato aggiunto dopo ogni prelievo di campione da analizzare.

I picchi ottenuti sono stati paragonati a quelli relativi a soluzioni a concentrazioni note di FP. L'equazione della retta di taratura ottenuta è stata: $y = 0.033x + 0.0078$ con un coefficiente di correlazione lineare $r^2 = 0.9927$. La linearità del metodo è stata studiata utilizzando un range di concentrazioni compreso tra 2 e 10 $\mu\text{g/ml}$.

5.2.16 Studi di rilascio del FP in PBS a pH 7.4 contenente SDS 0.1% (p/v)

Le cinetiche di rilascio del FP dalle SLM preparate sono state studiate ad otto intervalli di tempo prefissati. A tale scopo, sono state preparate dispersioni microparticellari (una dispersione per ogni intervallo di tempo analizzato) in PBS a pH 7.4 contenente SDS 0.1% (p/v), mantenendo le 'condizioni sink'. Queste condizioni prevedono di utilizzare una quantità di mezzo di dissoluzione pari ad almeno tre volte il volume necessario per solubilizzare completamente il farmaco. Considerando che la solubilità del FP nello stesso mezzo, calcolata

sperimentalmente tramite analisi UV, era 30 µg/ml, le concentrazioni utilizzate per gli studi di rilascio sono state 110 µg/ml per le SLM con chitosano e 69 µg/ml per le SLM con alginato.

L'analisi è stata effettuata alla temperatura di 37 ± 0.1 °C, sotto agitazione meccanica costante, utilizzando l'incubatore Benchtop 80 Orbital Shaker modello 420. Ad intervalli di tempo prefissati è stata prelevata un'aliquota dal campione (2 ml), che è stata filtrata con filtri in acetato di cellulosa (0.45 µm; VWR, Milano, Italia) ed analizzata con il metodo descritto in precedenza.

5.2.17 Studi di rilascio del DHA in PBS a pH 7.4/EtOH 80/20 (v/v)

Le cinetiche di rilascio del DHA dalle SLM preparate sono state studiate a dieci intervalli di tempo prefissati. A tale scopo, 10 mg di SLM caricate con DHA sono stati dispersi in 5 ml di una soluzione a pH 7.4 di PBS/EtOH in rapporto 80/20 (v/v) e posti all'interno di una membrana da dialisi avente un cut-off di peso molecolare 12,000/14,000 Da (Spectra/Por® USA). Successivamente, la membrana contenente le SLM disperse nel mezzo (compartimento donatore) è stata posta all'interno di una beuta contenente 10 ml del mezzo di dissoluzione (compartimento accettore). L'analisi è stata

effettuata alla temperatura di $37^{\circ}\text{C}\pm 0.1$ sotto agitazione meccanica costante, utilizzando l'incubatore Benchtop 80°C Orbital Shaker modello 420. Ad intervalli di tempo prestabiliti è stata prelevata un'aliquota (1.5 ml) dal compartimento accettore ed è stata rimpiazzata con un ugual volume (1.5 ml) del mezzo di rilascio. I campioni prelevati sono stati analizzati tramite HPLC come precedentemente descritto. I picchi ottenuti sono stati paragonati a quelli relativi a soluzioni a concentrazioni note di DHA nel mezzo di dissoluzione. L'equazione della retta di taratura ottenuta è stata:

$$y = 150911x - 55516$$

con un coefficiente di correlazione lineare $r^2=0.9999$. La linearità del metodo è stata studiata utilizzando un range di concentrazioni compreso tra 1–50 $\mu\text{g/ml}$.

E' stata inoltre determinata anche la quantità di DHA residua all'interno delle SLM dopo 72 h, per verificare che il DHA non ancora rilasciato fosse tutto all'interno delle microparticelle. A tal proposito, dopo 72 ore è stato recuperato il contenuto all'interno della membrana da dialisi (compartimento donatore) e l'etanolo presente è stato allontanato tramite evaporazione. Successivamente il campione è stato liofilizzato e addizionato di una soluzione etanolica (20 ml). La dispersione etanolica risultante, contenete i sali derivanti dal tampone

PBS e le microparticelle, è stata sonicata a lungo, filtrata con filtri in PTFE 0.45 μ m (Millipore, Milan) e analizzata all'HPLC utilizzando la metodica precedentemente descritta.

5.2.18 Saggi di vitalità cellulare (saggio MTS) delle SLM caricate con FP

Le cellule 16-HBE (Human Bronchial Epithelial Cell Line) sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (1×10^4 cellule/pozzetto da 100 μ l) e mantenute in Minimum Essential Medium (MEM) addizionato con il 10% di siero fetale di vitello (FCS), 0.5 % di gentamicina, 1% di glutammina, 2.5% di HEPES e aminoacidi non essenziali (Pace et al., 2008). Le colture cellulari sono state mantenute in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ e alla temperatura di 37 \pm 1 °C. Il trattamento delle cellule è stato fatto in MEM all'1% di FCS e successivamente queste sono state stimulate con FP libero e veicolato dai sistemi micro e nanoparticellari (range 10⁻⁶ M - 10⁻¹² M). Il farmaco libero è stato solubilizzato in dimetilacetammide alla concentrazione di 10⁻² M e successivamente diluito con MEM all'1% di FCS fino alle concentrazioni opportune. Cellule non trattate sono state utilizzate come controllo.

L'incubazione è stata effettuata per 24 ore e successivamente è stata valutata la vitalità cellulare utilizzando il "CellTiter 96 Aqueous. Infine sono stati aggiunti 20 µl/pozzetto di una soluzione contenente il sale giallo di tetrazolio (MTS) e fenazina etosulfonato (PES). Le deidrogenasi delle cellule vive sarebbero in grado di ridurre l'MTS a formazano, producendo una colorazione porpora del tutto solubile nel mezzo. Per favorire il metabolismo, la piastra viene incubata a 37±1 °C in presenza di CO₂ (5%) e successivamente la quantità di formazano viene rilevata a λ=490 nm. La quantità ricavata è proporzionale al numero di cellule vitali presenti nel pozzetto. Per una maggiore accuratezza, l'MTS è stato aggiunto anche ai pozzetti della piastra privi di cellule. Il valore di questa lettura viene sottratto a quella dei campioni (trattati e di controllo), per limitare il rumore di fondo. Ogni trattamento è eseguito in triplicato.

5.2.19 Saggi di vitalità cellulare (saggio MTS) delle SLM caricate con SX

La vitalità cellulare è stata valutata mediante un test di proliferazione cellulare CellTiter 96 (PROMEGA, Madison WI USA) secondo le istruzioni del produttore. Le cellule 16-HBE (Human

Bronchial Epithelial Cell Line) sono state seminate in piastre da 96 pozzetti e trattate come precedentemente descritto. L'incubazione è stata effettuata per 24 ore con SX libero e veicolato dalle SLM (range 10^{-6} - 10^{-12} M). Il farmaco libero è stato solubilizzato in metanolo alla concentrazione di 10^{-2} M e successivamente diluito con MEM all'1% di FCS fino alle concentrazioni opportune. Cellule non trattate sono state utilizzate come controllo. Dopo il trattamento farmacologico, sono stati aggiunti 20 μ l/pozzetto di una soluzione contenente il sale giallo di tetrazolio (MTS) per 20 minuti a 37 ± 1 °C in presenza di CO₂ (5%). L'assorbanza è stata letta a 490 nm sul Microplate reader wallacVictor2 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer). Per una maggiore accuratezza, l'MTS è stato aggiunto anche ai pozzetti della piastra privi di cellule. Il valore di questa lettura viene sottratto a quella dei campioni (trattati e di controllo), per limitare il rumore di fondo. Ogni trattamento è eseguito in triplicato.

5.2.20 Saggi di vitalità cellulare (saggio MTS) delle SLM caricate con DHA

La vitalità cellulare è stata valutata utilizzando il test di proliferazione cellulare CellTiter 96 (PROMEGA, Madison WI USA)

riportato sopra. Le cellule 16-HBE (Human Bronchial Epithelial Cell Line) sono state seminate in piastre da 96 pozzetti e trattate come precedentemente descritto. L'incubazione è stata effettuata per 24 ore con DHA libero e veicolato dalle SLM (range 2-50 μ M). Il farmaco libero è stato acquistato come standard in etanolo alla concentrazione di 250 mg/ml e successivamente diluito con MEM all'1% di FCS fino alle concentrazioni opportune. Cellule non trattate sono state utilizzate come controllo. Dopo il trattamento farmacologico, sono stati aggiunti 20 μ l/pozzetto di una soluzione contenente il sale giallo di tetrazolio (MTS) per 20 minuti a 37 ± 1 °C in presenza di CO₂ (5%). L'assorbanza è stata letta a 490 nm sul Microplate reader wallacVictor2 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer). Per una maggiore accuratezza, l'MTS è stato aggiunto anche ai pozzetti della piastra privi di cellule. Il valore di questa lettura viene sottratto a quella dei campioni (trattati e di controllo), per limitare il rumore di fondo. Ogni trattamento è eseguito in triplicato.

5.2.21 Preparazione dell'estratto di fumo di sigaretta (CSE)

Per i saggi biologici *in vitro* sono state utilizzate sigarette (Marlboro). L'estratto di fumo di sigaretta è stato preparato mediante

estrazione sottovuoto di fumo di sigaretta utilizzando una beuta codata contenente 20 ml di PBS allo 0.5% (p/v). La soluzione ottenuta è stata filtrata utilizzando un filtro di 0.2 μm di polyethersulfone ((PES) Sarstedt filter membrane) e successivamente diluita per essere utilizzata in ciascun esperimento. La concentrazione di cigarettes smoke extract (CSE) è stata determinata allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 320 nm. Dal momento che la media delle densità ottiche osservate per l'estratto preparato da una sigaretta era di 1.37 ± 0.16 , le variazioni di concentrazione sono state considerate trascurabili. La concentrazione di CSE utilizzata nei diversi esperimenti era pari al 20% del volume finale di medium utilizzato per ogni saggio.

5.2.22 Preparazione delle colture epiteliali bronchiali 16-HBE per la valutazione di survivina e p-erk

Per tale saggio le cellule 16-HBE sono state mantenute in MEM come precedentemente descritto e successivamente sono state stimulate con estratto acquoso in PBS di fumo di sigaretta (CSE 20%), FP libero e intrappolato nei sistemi micro e nanoparticellari alla dose terapeutica di 10^{-8} M. Inizialmente è stata effettuata una pre-

stimolazione con FP libero e intrappolato della durata di 1 ora, quindi, si è proceduto con la stimolazione col CSE al 20%, 18 ore per la valutazione della Survivina e 20 min per la valutazione di ERK1/2 (Bondi et al., 2014). Al termine del trattamento si è proceduto alla marcatura per l'analisi citofluorimetrica o alla lisi delle cellule e l'estratto è stato sottoposto a saggio Western-blot.

5.2.23 Valutazione dell'espressione della survivina tramite analisi citofluorimetrica dopo trattamento con FP libero e veicolato

Per le analisi citofluorimetriche è stato utilizzato il citofluorimetro Becton Dickinson FACSCalibur. Sono stati acquisiti 10,000 eventi per campione e l'analisi è stata fatta utilizzando il programma cellQuest (Becton Dickinson BD). Per la valutazione della survivina (poiché intracellulare) le cellule sono state permeabilizzate. Si è proceduto con la fissazione con PBS 1X contenente paraformaldeide al 4% per 20 min a temperatura ambiente. Al termine sono stati effettuati 2 lavaggi con soluzione permeabilizzante (PBS contenente 1% di FCS, 0.3% di saponine, e 0.1% di NaN₃) e successivamente le cellule sono state incubate prima con un anticorpo primario policlonale rabbit anti-survivin (1:1000) (Novus Biologicals)

e poi con un anticorpo secondario fluorescente anti-rabbit IgG FITC (1:350) (Antibodies online). Per il controllo negativo sono state utilizzate immunoglobuline di rabbit (BD PharMingen). Al termine i campioni sono stati acquisiti al citofluorimetro. I risultati sono stati espressi come percentuale di cellule positive.

5.2.24 Valutazione dell'espressione di p-ERK1/2 tramite western blot dopo trattamento con FP libero e veicolato

La valutazione dell'espressione di p-ERK1/2, t-ERK1/2 è stata effettuata tramite saggio Western Blot. A tal proposito è stato utilizzato un gel di poliacrilammide al 10% e sono stati caricati 40 µg di proteine totali. Dopo la corsa elettroforetica si è seguito il trasferimento su membrana, il blocking con Odyssey Blocking e l'incubazione con gli specifici anticorpi primari: anticorpo policlonale di rabbit anti-p-ERK 1/2 (1:500) (Cell Signaling Technology Inc), anticorpo policlonale di rabbit anti-t-ERK1/2 (1:500) (Cell Signaling Technology Inc), anticorpo policlonale mouse anti-b-actina (1:20000) (Santa Cruz Biotechnology). Al termine le membrane sono state incubate con l'anticorpo secondario anti-rabbit IRDye 680RD (1:15000) (LI-COR), o anti-mouse IRDye 800CW (1:5000) (LI-COR).

L'analisi è stata effettuata mediante un sistema di fluorescenza al vicino infrarosso (Odyssey® CLx Imaging System - LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)). Le immagini relative sono state successivamente quantizzate utilizzando il programma Image J che consente di paragonare la densità delle bande dopo migrazione su gel di agarosio. I dati sono stati espressi come rapporto dell'intensità della banda della proteina fosforilata o totale contro la corrispondente β -actina, utilizzata come proteina housekeeping.

5.2.25 Preparazione delle colture epiteliali bronchiali 16-HBE per la valutazione dell'cAMP

Le cellule sono state coltivate in piastre da 6 pozzetti (BD Falcon, Franklin Lakes, New Jersey) per 3 giorni fino al raggiungimento dell'80-90% di confluenza. Successivamente, le cellule 16-HBE sono state addizionate con FBS 1% e trattate con SX (libero e veicolato) e con le SLM vuote nel range di concentrazione 10^{-7}M - 10^{-8}M . Il tempo di incubazione del farmaco è stato di 10 minuti. Al termine della stimolazione, le cellule sono state raccolte per valutare l'espressione cAMP. Ogni trattamento è stato eseguito in triplicato.

5.2.26 Valutazione dell'espressione di cAMP dopo trattamento con SX libero e veicolato

L'espressione di cAMP è stata valutata utilizzando il kit commerciale Cyclic AMP EIA Kit della Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI-USA), secondo le istruzioni del produttore.

Questo saggio è basato sulla competizione tra l'cAMP libero (presente nel nostro caso nel lisato cellulare) e l'cAMP coniugato all'acetilcolinesterasi (AChE) indicato come cAMP Tracer, ai siti di legame dell'anticorpo prodotto in rabbit, specifico per cAMP. Il complesso anticorpo (prodotto in rabbit)-cAMP (libero o tracer), una volta formato, è capace di legare a sua volta l'anticorpo monoclonale (prodotto in mouse) anti-rabbit IgG, preventivamente legato al pozzetto.

Dal momento che la concentrazione di cAMP Tracer viene mantenuta costante, mentre quella di cAMP libero è variabile, la quantità di cAMP Tracer che è capace di legare gli anticorpi presenti nel pozzetto sarà inversamente proporzionale alla concentrazione di cAMP libero.

Schematicamente il kit prevede le seguenti fasi:

- 1) Preparazione dei lisati cellulari: dopo stimolazione con SX libero e veicolato per 10 minuti le cellule sono lisate con HCl 0.1M;
- 2) Preparazione della piastra: prevede l'aggiunta ai singoli pozzetti degli Standard, dei lisati cellulari, del cAMP tracer e cAMP antiserum e incubazione per tutta la notte a 4°C
- 3) Sviluppo della piastra: ai singoli pozzetti viene aggiunto il reattivo di Ellmans, che contiene il substrato per l'AChE. Il prodotto di questa reazione enzimatica ha un caratteristico colore giallo e ha un picco di assorbanza tra 405 e 412 nm.
- 4) Lettura della piastra: l'assorbanza, letta sul microplate reader wallacVictor2 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer), è direttamente proporzionale alla quantità di cAMP Tracer legato al pozzetto e quindi inversamente proporzionale alla quantità di cAMP libero presente nei nostri lisati cellulari durante l'incubazione. I risultati sono espressi come pmol/ml di cAMP.

5.3 Analisi statistica

I dati sperimentali sulla valutazione dell'espressione della survivina, del rapporto pERK/tERK, dell' cAMP e della proteina

HO1/actina sulla linea cellulare 16-HBE, sono stati espressi come valore medio \pm deviazione standard e sono stati analizzati in diverse condizioni sperimentali da parte di ANOVA con correzione Bonferroni. $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alfageme, I., Vazquez, R., Reyes, N., Muñoz, J., Fernández, A., Hernandez, M., ... Lima, J. (2006). Clinical efficacy of anti-pneumococcal vaccination in patients with COPD. *Thorax*, *61*(3), 189–195. <https://doi.org/10.1136/thx.2005.043323>
- Amore, E., Ferraro, M., Manca, M. L., Gjomarkaj, M., Giammona, G., Pace, E., & Bondi, M. L. (2017). Mucoadhesive solid lipid microparticles for controlled release of a corticosteroid in the chronic obstructive pulmonary disease treatment. *Nanomedicine*, *12*(19), 2287–2302. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0072>
- Barnes, P. J. (2000). Mechanisms in COPD. *Chest*, *117*(2), 10S–14S. https://doi.org/10.1378/chest.117.2_suppl.10S
- Barnes, P. J. (2006). Corticosteroid effects on cell signalling. *The European Respiratory Journal*, *27*(2), 413–26. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00125404>
- Berger, W. (2009). Aerosol devices and asthma therapy. *Current Drug Delivery*, *6*(1), 38–49.
- Bondi, M. L., Botto, C., Amore, E., Emma, M. R., Augello, G., Craparo, E. F., & Cervello, M. (2015). Lipid nanocarriers

containing sorafenib inhibit colonies formation in human hepatocarcinoma cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 493(1–2), 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.07.055>

Bondi, M. L., Ferraro, M., Di Vincenzo, S., Gerbino, S., Cavallaro, G., Giammona, G., ... Pace, E. (2014). Effects in cigarette smoke stimulated bronchial epithelial cells of a corticosteroid entrapped into nanostructured lipid carriers. *Journal of Nanobiotechnology*, 12, 46. <https://doi.org/10.1186/s12951-014-0046-4>

Bonferoni, M. C., Sandri, G., Ferrari, F., Rossi, S., Larghi, V., Zambito, Y., & Caramella, C. (2010). Comparison of different in vitro and ex vivo methods to evaluate mucoadhesion of glycol-palmitoyl chitosan micelles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 20(6), 419–424. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(10\)50073-X](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(10)50073-X)

Bravo-Osuna, I., Vauthier, C., Farabollini, A., Palmieri, G. F., & Ponchel, G. (2007). Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. *Biomaterials*, 28(13), 2233–2243. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.01.005>

- Cave, A. C., & Hurst, M. M. (2011). The use of long acting β 2 - agonists, alone or in combination with inhaled corticosteroids, in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) A risk–benefit analysis. *Pharmacology and Therapeutics*, *130*, 114–143. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.12.008>
- Cazzola, M., & Donner, C. F. (2000). Long-acting beta2 agonists in the management of stable chronic obstructive pulmonary disease. *Drugs*, *60*(2), 307–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10983735>
- Cazzola, M., & Matera, M. G. (2014). Bronchodilators: Current and future. *Clinics in Chest Medicine*, *35*(1), 191–201. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2013.10.005>
- Cazzola, M., Rogliani, P., Novelli, L., & Matera, M. G. (2013). Inhaled corticosteroids for chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *14*(18), 2489–2499. <https://doi.org/10.1517/14656566.2013.848856>
- Chiappara, G., Gjomarkaj, M., Virzì, A., Sciarrino, S., Ferraro, M., Bruno, A., ... Pace, E. (2013). The role of p21 Waf1/Cip1 in large airway epithelium in smokers with and without COPD.

Biochimica et Biophysica Acta, 1832(10), 1473–81.

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.04.022>

Christofidou-Solomidou, M., & Muzykantov, V. R. (2006).

Antioxidant strategies in respiratory medicine. *Treatments in Respiratory Medicine*, 5(1), 47–78. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16409015>

Das, S., & Chaudhury, A. (2011). Recent Advances in Lipid

Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech*, 12(1), 62–76. <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9563-0>

Day, M. B., Brodie, J., & Corris, P. A. (2000). Patient acceptability of hydrofluoroalkane (CFC-Free) inhalers, 55(SUPPL. 3).

De Batlle, J., Sauleda, J., Balcells, E., Gómez, F. P., Méndez, M., Rodriguez, E., ... Garcia-Aymerich, J. (2012). Association between $\Omega 3$ and $\Omega 6$ fatty acid intakes and serum inflammatory markers in COPD☆. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23, 817–821. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.04.005>

De Jong, W. H., & Borm, P. J. A. (2008). Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *International Journal of*

Nanomedicine, 3(2), 133–49. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18686775>

De Kruijf, W., & Ehrhardt, C. (2017). Inhalation delivery of complex drugs — the next steps. *Current Opinion in Pharmacology*, 36, 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.07.015>

Decramer, M., Janssens, W., & Miravittles, M. (2012). Chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet*, 379(9823), 1341–1351. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60968-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60968-9)

Derendorf, H., Hochhaus, G., Meibohm, B., Möllmann, H., & Barth, J. (1998). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 101(4), S440–S446. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(98\)70156-3](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(98)70156-3)

Duane D. Miller, Robert W. Brueggemeier, J. T. D. (2009). Corticosteroidi. In D. A. W. Thomas L. Lemke (Ed.), *Foyes's principi di chimica farmaceutica* (5th ed., p. 983,986). Piccin.

Durham, A. L., Caramori, G., Chung, K. F., & Adcock, I. M. (2016). Targeted anti-inflammatory therapeutics in asthma and chronic obstructive lung disease. *Translational Research*, 167(1), 192–

203. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.08.004>

Garud, A., Singh, D., & Garud, N. (2012). Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Method, Characterization and Applications. *International Current Pharmaceutical Journal*, 1(11), 384–393. Retrieved from <http://www.icpjonline.com/documents/Vol1Issue11/08.pdf>

Geszke-Moritz, M., & Moritz, M. (2016). Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: Composition, properties and therapeutic strategies. *Materials Science and Engineering: C*, 68, 982–994. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.119>

Ghadiri, M., Mamlouk, M., Spicer, P., Jarolimek, W., Grau, G. E. R., Young, P. M., & Traini, D. (2016a). Effect of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on airway epithelial cells' tight junction. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2016.07.004>

Ghadiri, M., Mamlouk, M., Spicer, P., Jarolimek, W., Grau, G. E., Young, P. M., & Traini, D. (2016b). Effect of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on airway epithelial cells' tight junction. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 40, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2016.07.004>

Giudetti, A. M., & Cagnazzo, R. (2012). Beneficial effects of n-3

PUFA on chronic airway inflammatory diseases. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 99, 57–67.
<https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2012.09.006>

Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease POCKET GUIDE TO COPD DIAGNOSIS, MANAGEMENT, AND PREVENTION A Guide for Health Care Professionals. (2017). Retrieved from <http://goldcopd.org/wp-content/uploads/2016/12/wms-GOLD-2017-Pocket-Guide.pdf>

Greenberg, A. K., Hu, J., Basu, S., Hay, J., Reibman, J., Yie, T.-A., ... Lee, T. C. (2002). Glucocorticoids inhibit lung cancer cell growth through both the extracellular signal-related kinase pathway and cell cycle regulators. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 27(3), 320–8.
<https://doi.org/10.1165/rcmb.4710>

Hess, D. R. (2012). Aerosol Delivery Devices in the Treatment of Asthma. *Respiratory Care*, 53(6). Retrieved from <http://rc.rcjournal.com/content/53/6/699.short>

Hochhaus, G. (2007). Pharmacokinetic and pharmacodynamic

properties important for inhaled corticosteroids. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 98(2), S7–S15.
[https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60703-X](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60703-X)

Huang, Z., Li, X., Zhang, T., Song, Y., She, Z., Li, J., & Deng, Y. (2014). Progress involving new techniques for liposome preparation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(4), 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.06.001>

HUO, J., & Zhou, S. (2007). New research on development of solid lipid nanoparticles. *Journal of Medical Colleges of PLA*, 22(6), 385–390. [https://doi.org/10.1016/S1000-1948\(08\)60023-4](https://doi.org/10.1016/S1000-1948(08)60023-4)

Ibrahim, M., & Garcia-Contreras, L. (2013). Mechanisms of absorption and elimination of drugs administered by inhalation. *Therapeutic Delivery*, 4(8), 1027–1045.
<https://doi.org/10.4155/tde.13.67>

Inhaled corticosteroid/long-acting bronchodilator treatment mitigates STEMI clinical presentation in COPD patients. (2017). *European Journal of Internal Medicine*.
<https://doi.org/10.1016/J.EJIM.2017.08.016>

Jaspart, S., Bertholet, P., Piel, G., Dogné, J.-M., Delattre, L., &

- Evrard, B. (2007). Solid lipid microparticles as a sustained release system for pulmonary drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65(1), 47–56.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.07.006>
- Jaspart, S., Piel, G., Delattre, L., & Evrard, B. (2005). Solid lipid microparticles: Formulation, preparation, characterisation, drug release and applications. <https://doi.org/10.1517/17425247.2.1.75>
- Jetzer, M. W., Morrical, B. D., Fergenson, D. P., & Imanidis, G. (2017). Particle interactions of fluticasone propionate and salmeterol xinafoate detected with single particle aerosol mass spectrometry (SPAMS).
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.113>
- Johnson. (2001). Beta 2 -adrenoceptors: mechanisms of action of beta 2 -agonists. *Paediatric Respiratory Review*, 2(1), 57-62.
<https://doi.org/10.1053/prrv.2000.0102>
- Khale, A. (2011). Composition and characterization of Metered Dose Inhalers.
- Khassawneh, B. Y., Al-Ali, M. K., Alzoubi, K. H., Batarseh, M. Z., Al-Safi, S. A., Sharara, A. M., & Alnasr, H. M. (2008). Handling

- of inhaler devices in actual pulmonary practice: metered-dose inhaler versus dry powder inhalers. *Respiratory Care*, 53(3), 324–8.
- Kundu, S., Wang, Y., Xia, W., & Muhler, M. (n.d.). Thermal Stability and Reducibility of Oxygen-Containing Functional Groups on Multiwalled Carbon Nanotube Surfaces: A Quantitative High-Resolution XPS and TPD/TPR Study. <https://doi.org/10.1021/jp804413a>
- Labiris, N. R., & Dolovich, M. B. (2003). Pulmonary drug delivery. Part I: physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 56(6), 588–99. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2003.01892.x>
- Langer, R. (1998). Drug delivery and targeting. *Nature*, 392(6679 Suppl), 5–10.
- Liang, Z., Ni, R., Zhou, J., & Mao, S. (2015). Recent advances in controlled pulmonary drug delivery. *Drug Discovery Today*, 20(3), 380–389. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.09.020>
- Lisa, F. Di, & Melloni, E. (2012). Le proteolisi intracellulare. In F.

Clementi & G. Fumagalli (Eds.), *Farmacologia generale e molecolare* (quarta, p. 321).

Loira-Pastoriza, C., & Todoroff, J. (2014). Delivery strategies for sustained drug release in the lungs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 75, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.05.017>

Lozano, R., Naghavi, M., Lim, S. S., Ahn MPH, S. Y., Alvarado, M. B., Andrews MPH, K. G., ... L Murray Summary, C. J. (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380, 2095–2128. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61728-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61728-0)

Luo, Y., Teng, Z., Li, Y., & Wang, Q. (2015). Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery: Chitosan coating improves stability, controlled delivery, mucoadhesion and cellular uptake. *Carbohydrate Polymers*, 122, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.084>

Manconi, M., Manca, M. L., Valenti, D., Escribano, E., Hillaireau, H., Fadda, A. M., & Fattal, E. (2017). Chitosan and hyaluronan coated liposomes for pulmonary administration of curcumin.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.044>

Mansuri, S., Kesharwani, P., Jain, K., Tekade, R. K., & Jain, N. K. (2016). Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. *Reactive and Functional Polymers*, *100*, 151–172.

<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.01.011>

Marco, F. Di, Santus, P., Scichilone, N., Solidoro, P., Contoli, M., Braido, F., & Corsico, A. G. (2017). Symptom variability and control in COPD: Advantages of dual bronchodilation therapy.

<https://doi.org/10.1016/j.rmed.2017.03.001>

Mehnert, W. (2001). Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *47*(2–3), 165–196. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00105-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00105-3)

Mehnert, W., & Mäder, K. (2012). Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*, 83–101.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.021>

Melis, V., Letizia Manca, M., Bullita, E., Tamburini, E., Castangia, I., Cardia, M. C., ... Manconi, M. (2016). Inhalable polymer-

- glycosomes as safe and effective carriers for rifampicin delivery to the lungs. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 143, 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.03.044>
- Mishra, M., & Mishra, B. (2012). Mucoadhesive microparticles as potential carriers in inhalation delivery of doxycycline hyclate: a comparative study. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(5), 518–526. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2012.05.001>
- Montuschi, P. (2016). Farmaci Antiasmatici. In L. Annunziato & G. F. Di Renzo (Eds.), *Trattato di Farmacologia* (se, pp. 1047–1052). Edelson-Gnocchi.
- Müller, R. H., Mäder, K., & Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), 161–177. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(00\)00087-4](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00087-4)
- Nafee, N., Husari, A., Maurer, C. K., Lu, C., De Rossi, C., Steinbach, A., ... Schneider, M. (2014). Antibiotic-free nanotherapeutics: Ultra-small, mucus-penetrating solid lipid nanoparticles enhance the pulmonary delivery and anti-virulence efficacy of novel

- quorum sensing inhibitors. *Journal of Controlled Release*, 192, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.055>
- National Clinical Guideline Centre Chronic obstructive pulmonary disease: Management of chronic obstructive pulmonary disease in adults in primary and secondary care Update guideline. (n.d.).
- Oehme, S., Mittag, A., Schr, W., Odl, €, Tarnok, A., Nieber, K., & Abraham, G. (2015). Agonist-induced β 2-adrenoceptor desensitization and downregulation enhance pro-inflammatory cytokine release in human bronchial epithelial cells. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 30, 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2014.05.007>
- Olsson, B., Bondesson, E., Borgström, L., Edsbäcker, S., Eirefelt, S., Ekelund, K., ... Hegelund-Myrbäck, T. (2011). Pulmonary Drug Metabolism, Clearance, and Absorption. In *Controlled Pulmonary Drug Delivery* (pp. 21–50). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9745-6_2
- Pace, E., Ferraro, M., Siena, L., Melis, M., Montalbano, A. M., Johnson, M., ... Gjomarkaj, M. (2008). Cigarette smoke increases Toll-like receptor 4 and modifies lipopolysaccharide-mediated

- responses in airway epithelial cells. *Immunology*, 124(3), 401–11.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02788.x>
- Pace, E., Gagliardo, R., Melis, M., Grutta, S. La, Ferraro, M., Siena, L., ... Vignola, A. M. (2004). Synergistic effects of fluticasone propionate and salmeterol on in vitro T-cell activation and apoptosis in asthma. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.07.052>
- Pardeshi, C., Rajput, P., Belgamwar, V., Tekade, A., Patil, G., Chaudhary, K., & Sonje, A. (2012). Solid lipid based nanocarriers: An overview. <https://doi.org/10.2478/v10007-012-0040-z>
- Parente, L. (2016). Glucocorticoidi e Mineralcorticoidi. In L. Annunziato & G. F. Di Renzo (Eds.), *Trattato di Farmacologia* (Seconda, pp. 810–814). Edelson-Gnocchi.
- Patil, J. S., & Sarasija, S. (2012). Pulmonary drug delivery strategies: A concise, systematic review. *Lung India: Official Organ of Indian Chest Society*, 29(1), 44–9. <https://doi.org/10.4103/0970-2113.92361>
- Patlolla, R. R., Chougule, M., Patel, A. R., Jackson, T., Tata, P. N. V., & Singh, M. (2010). Formulation, characterization and pulmonary

- deposition of nebulized celecoxib encapsulated nanostructured lipid carriers. *Journal of Controlled Release*, 144(2), 233–241.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.02.006>
- Popov, A., Schopf, L., Bourassa, J., & Chen, H. (2016). Enhanced pulmonary delivery of fluticasone propionate in rodents by mucus-penetrating nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 502(1), 188–197.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.02.031>
- Rahman, I. (2006). Antioxidant therapies in COPD. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 1(1), 15–29.
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18046899>
- Reimer, L., & Kohl, H. (2008). *Transmission Electron Microscopy Physics of Image Formation*. Springer Verlag.
- Rhen, T., & Cidlowski, J. A. (2005). Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. *New England Journal of Medicine*, 353(16), 1711–1723.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra050541>
- Ricciardolo, F. L. M., Blasi, F., Centanni, S., & Rogliani, P. (2015). Therapeutic novelties of inhaled corticosteroids and

bronchodilators in asthma. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 33, 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.pupt.2015.05.006>

Sakagami, M. (2006). In vivo, in vitro and ex vivo models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(9), 1030–1060. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.07.012>

Santus, P., Radovanovic, D., Paggiaro, P., Papi, A., Sanduzzi, A., Scichilone, N., & Braido, F. (2015). Why use long acting bronchodilators in chronic obstructive lung diseases? An extensive review on formoterol and salmeterol. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2015.05.001>

Scalia, S., Young, P. M., & Traini, D. (2015). Solid lipid microparticles as an approach to drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 12(4), 583–599.
<https://doi.org/10.1517/17425247.2015.980812>

Spray drying method. (2001).

Steckel, H., & Eskandar, F. (2003). Factors affecting aerosol performance during nebulization with jet and ultrasonic

nebulizers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 19(5), 443–55.

Sun, Y., Cui, F., Shi, K., Wang, J., Niu, M., & Ma, R. (2009). The Effect of Chitosan Molecular Weight on the Characteristics of Spray-Dried Methotrexate-Loaded Chitosan Microspheres for Nasal Administration. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 35(3), 379–386.
<https://doi.org/10.1080/03639040802395185>

Tabatt, K., Sameti, M., Olbrich, C., Müller, R. H., & Lehr, C.-M. (2004). Effect of cationic lipid and matrix lipid composition on solid lipid nanoparticle-mediated gene transfer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 57(2), 155–62. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2003.10.015>

Takeuchi, H., Thongborisute, J., Matsui, Y., Sugihara, H., Yamamoto, H., & Kawashima, Y. (2005). Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(11), 1583–1594.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.008>

Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J., & Nasirpour, A. (2013). Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *19*, 29–43. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.03.002>

Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., & Bannerjee, S. K. (2012). Drug delivery systems: An updated review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, *2*(1), 2–11. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.96920>

Tomczyk, S., Bennett, N. M., Stoecker, C., Gierke, R., Moore, M. R., Whitney, C. G., ... Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2014). Use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine among adults aged ≥ 65 years: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *63*(37), 822–5.

Umerska, A., Mouzouvi, C. R. A., Bigot, A., & Saulnier, P. (2015). Formulation and nebulization of fluticasone propionate-loaded

- lipid nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 493(1), 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.07.008>
- Vincentini, L., & Cattaneo, M. G. (2012). Farmacologia delle MAP chinasi. In F. Clementi & G. Fumagalli (Eds.), *Farmacologia generale e molecolare* (Quarta, pp. 103–104).
- Weber, S., Zimmer, A., & Pardeike, J. (2014). Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: A review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 86(1), 7–22. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.08.013>
- Williams, E. J., Baines, K. J., Smart, J. M., Gibson, P. G., & Wood, L. G. (2016). Rosuvastatin, lycopene and omega-3 fatty acids: A potential treatment for systemic inflammation in COPD; a pilot study. <https://doi.org/10.1016/j.jnim.2016.04.006>
- Wittaya-Areekul, S., Kruenate, J., & Prahsarn, C. (2006). Preparation and in vitro evaluation of mucoadhesive properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone. *International Journal of Pharmaceutics*, 312, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.01.003>

Ringrazio il gruppo di lavoro della Dott.ssa Elisabetta Pace, in particolare la Dott.ssa Maria Ferraro, la Dott.ssa Serena Di Vincenzo e la Dott.ssa Chiara Cipollina dell'Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare (IBIM) "A. Monroy" del CNR di Palermo per aver supportato il lavoro di tesi con gli studi biologici.

Ringrazio la Dott.ssa Maria Letizia Manca del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente dell'Università degli Studi di Cagliari per gli studi di deposizione in vitro e la valutazione del diametro aerodinamico dei sistemi preparati.

Infine, ringrazio la Dott.ssa Valeria La Parola dell'Istituto per lo Studio dei Materiali Nanostrutturati (ISMN) del CNR di Palermo per gli studi di spettroscopia elettronica a raggi x.

Un ringraziamento speciale va alla Dott.ssa Maria Luisa Bondì, dell'Istituto per lo Studio dei Materiali Nanostrutturati (ISMN) del CNR di Palermo, per aver seguito e supportato le mie ricerche durante tutto il mio progetto di Dottorato.