

Michele Miragoli^{1,2}, Stefano Rossi^{1,2}, Monia Savi^{1,2}, Matteo Goldoni¹, Silvana Pinelli¹, Rossella Alinovi¹,
Maricla Galetti², Donatella Stilli, Emilio Macchi^{2,3}, Massimiliano Zaniboni^{2,3}, Antonio Mutti^{1,2}

Esposizione a nanoparticelle: studi in-vitro ed in-vivo per valutare i fattori di rischio cardiovascolari in cuori normali e patologici

¹ Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Parma, Parma

² CERT, Centro di Eccellenza per la Ricerca Tossicologica, INAIL ex ISPESEL, Parma

³ Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Parma, Parma

RIASSUNTO. La nanotossicità è associata alle malattie cardiovascolari. Sebbene confermato da studi epidemiologici, le cause e la possibilità di un'azione diretta delle nanoparticelle (NPs) non è mai stata valutata. Ratti normotensivi e ipertensivi (SHR) sono stati esposti a biossido di titanio (TiO₂) e particolato diesel (DEP) derivante da motore Euro3 ed Euro4. Abbiamo esplorato l'interazione delle NPs in-vitro e in-vivo nel tessuto cardiaco e studiato la performance elettromeccanica, alterazione genica, morfologica, tossicologica e funzionale. Abbiamo individuato una diretta contaminazione del tessuto cardiaco nei ratti instillati trachealmente con NPs, correlata al rimodellamento strutturale, stress ossidativo, danno del DNA, modulazione ECG e aritmie. Queste condizioni apparivano aggravate in animali esposti a Euro4-DEP e in SHR esposti a TiO₂-NPs. Le NPs producono nanopori transienti nella membrana cellulare (≤50 nm) causando squilibrio ionico, e riduzione del potenziale d'azione. L'approccio qui proposto, mostra un coinvolgimento diretto delle NPs nel tessuto cardiaco, suggerendone un nuovo meccanismo aritmico.

Parole chiave: particolato diesel, aritmia cardiaca, nanoparticelle di biossido di titanio, nanopori.

ABSTRACT. NANOPARTICLES EXPOSURE: IN-VITRO AND IN-VIVO INVESTIGATION TO EVALUATE CARDIOVASCULAR RISK FACTORS IN NORMAL AND FAILING CARDIAC TISSUE. Nanoparticles toxicity is associated with cardiovascular diseases (CDs). Although epidemiological studies confirmed such link, they did not prove a direct causation on cardiac tissue. Normotensive and hypertensive (SHR) rats were exposed to titanium dioxide (TiO₂) and diesel exhaust particles (DEP) from Euro3 and Euro4 derived-engines. We explored the interaction between NPs and in-vivo/in-vitro cardiac tissue and we determined the effect on electro-mechanical performance by evaluating genetic, morphological, functional and toxicological alterations. We observed a direct contamination of cardiac tissue by tracheally-instilled NPs, correlated with structural remodeling, ROS, DNA damaged, modulation of ECGs and arrhythmogenesis. Such conditions are further aggravated in normotensive animal acutely exposed to Euro4-DEP and in SHR repeatedly exposed to TiO₂-NPs. Such NPs produce transient nanopores (≤50 nm), which causes membrane leakage and action potential reduction. Our proposed approaches show a direct involvement of NPs linked to CDs, by establishing a novel arrhythmogenic mechanism.

Key words: diesel exhaust particles, cardiac arrhythmia, Titanium dioxide nanoparticles, nanopores.

Introduzione

Il particolato fine nell'inquinamento atmosferico è associato a diversi problemi di salute. La maggior parte deriva dai fumi di scarico di veicoli Diesel e dalla produzione di nanomateriali. La normativa europea prevede che le emissioni standard debbano rimanere sotto determinati limiti per i nuovi veicoli venduti negli stati membri dell'Unione Europea. I nuovi veicoli Diesel hanno bisogno di uno speciale filtro anti-particolato per rimuoverlo dai fumi e trattenerlo. Sebbene la riduzione di questo particolato sia apprezzabile, questi filtri possono fallire nel trattenere le nanoparticelle (3-100 nm). Infatti, il 90% di queste nanoparticelle possiede un diametro inferiore a 50 nm e possono tranquillamente passare attraverso le maglie del filtro, entrare nel sistema respiratorio, passare le barriere fisiologiche (mucosa, bronchi e alveoli polmonari) ed entrare nel sistema circolatorio. Una volta nel sangue le nanoparticelle possono influenzare una serie di eventi infiammatori con conseguenze patologiche per la funzione cardiaca. Al 2012, solo studi epidemiologici suggeriscono una connessione tra particolato ambientale e mortalità cardiaca ma purtroppo non possono indicarne il meccanismo. L'obiettivo principale dei nostri studi è stato di caratterizzare le condizioni e i meccanismi che permettono alle nanoparticelle di esercitare attività aritmica sia in condizioni normali sia in condizioni di patologie cardiache presenti.

Obiettivo 1: Esplorare l'interazione nanoparticella-tessuto cardiaco e l'effetto sulla performance cardiaca. L'approccio spazierà dalla singola cellula all'organo in-toto caratterizzando diversi tipi di nanoparticelle. Uno studio funzionale, biochimico e morfologico ha completato, in modelli animali, la plausibilità degli studi epidemiologici presenti in letteratura.

Obiettivo 2: Esplorare i processi aritmici e i meccanismi nel cuore iperteso susseguenti ad un'esposizione cronica di nanoparticelle. L'approccio è stato caratterizzato in i) animali sperimentali (ratti) normotesi e ipertesi e ii) in modelli in-vitro di cardiomiociti.

Metodica in-vitro

Culture cellulari di cardiomiociti primari neonatali e adulte e linee cellulari. La procedura d'isolamento è stata

eseguita in accordo con le linee guida del Ministero della Salute (Permit number: 41/2009-B). I preparati di cardiomiociti neonatali in cultura consistevano in cellule singole o monolayer lineari di cardiomiociti larghezza 80 μm x 1 cm di lunghezza. Cardiomiociti adulti singoli sono stati isolati con la metodica del cuore alla Langerdoff. Linee immortalizzate AT1 (epitelio alveolare) sono state disposte in coltura con medium DCMM-1 (Biological Industries Ltd., Israel) con aggiunta di penicillina/streptomina e L-Glutamina, G418 (Sigma) e 10% di NCS (Invitrogen, UK). Le cellule sono state incubate per 3 giorni e cresciute in monostrati su vetrini da 35 mm.

Nanoparticolato utilizzato. Nanoparticelle che potessero mimare una condizione di DEP-NPs sono commerciali, (carboxyl-modified e amino-modified polystyrene nanoparticles, Invitrogen, UK). Nanoparticelle di Titanio (TiO_2 -NPs) per misure in-vitro e in-vivo sono anch'esse commerciali (Sigma, UK). Il particolato diesel è stato estratto da scarichi di automobili Euro3 ed Euro4 (Volkswagen, Renault, BMW) dopo 5 minuti dall'accensione delle automobili.

Caratterizzazione. Microscopia AFM, TEM e Raman shift. Potenziale Z e diametro idrodinamico (Zetasizer-nano).

Misure fisiologiche in-vitro

Tecniche utilizzate: Patch-Clamp (current clamp e voltage clamp), Simulazione del potenziale d'azione tramite un modello computazionale (Pandit 2001) (1). Contrazione cardiomiocitaria eseguita tramite IonOptix (Milton). Per ulteriori dettagli vedere (2).

Dinamica d'internalizzazione delle nanoparticelle. L'internalizzazione del particolato è stata eseguita tramite microscopia a conduttanza ionica abbinata a microscopia confocale di superficie (3).

Tossicità in-vitro

Tecniche utilizzate: Comet assay, T-Bars, DCFDA.

Misure fisiologiche in-vivo

Instillazione Tracheale. Dopo anestesia, un catetere per piccoli roditori è stato inserito in trachea e connesso ad un ventilatore per piccoli animali (UB 7025, Ugo Basile, IT) per la respirazione artificiale; una singola dose di soluzione salina o 2 mg/Kg TiO_2 -NPs o DEP- Euro3/Euro4 è stata somministrata tramite catetere. L'animale è stato risvegliato tramite una singola iniezione di atipamezole idroclorinato (0.15 mg/Kg, Antisedan, Pfizer, IT) e lasciato cosciente per 4 ore.

Mappaggio epicardico dell'eccitabilità cardiaca. Quattro ore dopo l'instillazione, l'animale veniva ri-anestetizzato e ventilato artificialmente. Il cuore veniva esposto tramite sternotomia longitudinale mediale e rimosso nella culla pericardica. La temperatura è stata man-

tenuta costante tramite lampada infrarossa. Una griglia di 8x8 elettrodi d'argento è stata posizionata sulla superficie anteriore del cuore con una risoluzione spaziale di 1 mm. I seguenti parametri sono stati misurati: ECG, eccitabilità (reobase e cronassia), refrattarietà (periodo refrattario effettivo), velocità di conduzione lungo e contro le fibre cardiache.

Misure ECG durante somministrazioni ripetute. Negli animali ipertesi (ratti SHR) è stato impiantato nella cavità peritoneale un radiotelemetro ECG per la misura dei segnali cardiaci per la durata di 7 settimane (Datascience INT). Al ratto SHR è stata eseguita una somministrazione tracheale di TiO_2 all'inizio della settimana per sei settimane. L'ECG e i parametri R-R e il numero di aritmie sopraventricolari e ventricolari sono stati misurati per 30 min in condizioni normali e in presenza di stimolazione adrenergica (isoproterenolo). Al sacrificio sono state eseguite misure emodinamiche (pressione intracavitaria), distensione del ventricolo e misure di fibrosi.

Analisi statistica. Sono stati utilizzati diversi software (SPSS 17ma versione, Chicago USA), Prism (GraphPad). La distribuzione normale delle variabili è stata eseguita con il test Kolmogorov-Smirnov. La statistica delle variabili normalmente distribuite include la media \pm errore standard, e Test t-student. La significatività statistica è stata settata a $p < 0.05$.

Risultati

Caratteristiche fisico-chimiche delle nanoparticelle: un nuovo paradigma per le aritmie cardiache?

Il primo risultato di tipo meccanicistico per questo studio è stato quello di capire come le nanoparticelle di polistirene (carica positiva o carica negativa) vengano internalizzate. Abbiamo constatato che la carica elettrica superficiale delle nanoparticelle interagisce direttamente con la carica elettrica delle cellule cardiache (Figura 1) (4). Il passo successivo è stato quello di definire il meccanismo di internalizzazione per le nanoparticelle cariche negativamente. Questo è stato provato tramite lo sviluppo di una nuova tecnologia chiamata Fast Resolution Scanning Ion Conductance microscopy la quale riesce a scansionare una superficie cellulare (Figura 2) ad alta velocità durante l'internalizzazione delle nanoparticelle (3). Questo lavoro ha permesso di capire come l'internalizzazione sia dipendente al diametro e la carica della nanoparticella, stessa. Per particolato meno fine, con diametro di 200 nm la sola e classica endocitosi mediata da clatrina non è abbastanza per internalizzare la nanoparticella; si crea quindi un'interazione tra clatrina che attiva una serie di pinocitosi.

Nanoparticelle di biossido di titanio raggiungono direttamente il cuore dopo instillazione tracheale e ne aumentano la suscettibilità aritmica

Ci siamo focalizzati, una volta capito il meccanismo, su condizioni più simili alla realtà ovvero la presenza di nanoparticolato ambientale e industriale come il biossido di titanio.

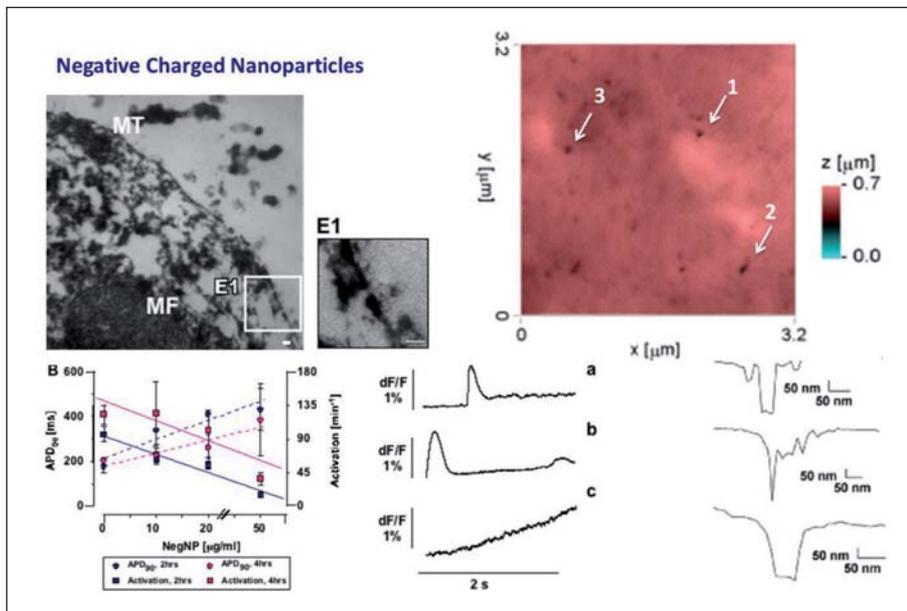


Figura 1. Nanoparticelle a carica negativa sono compatibili con la vita cellulare ma inducono aritmie ad alte dosi. Alto-Sx. Presenza di particelle a carica negativa sulla membrana E1-2. Alto-Dx. Misura topografica della membrana del cardiomiocita dopo esposizione a nanoparticelle a carica negativa. Sotto. Misura della durata del potenziale d'azione ottico in relazione con l'attivazione elettrica dei cardiomiociti e di calcio intracellulare. Il diametro dei nanopori rispecchia esattamente il diametro delle nanoparticelle (50 nm)

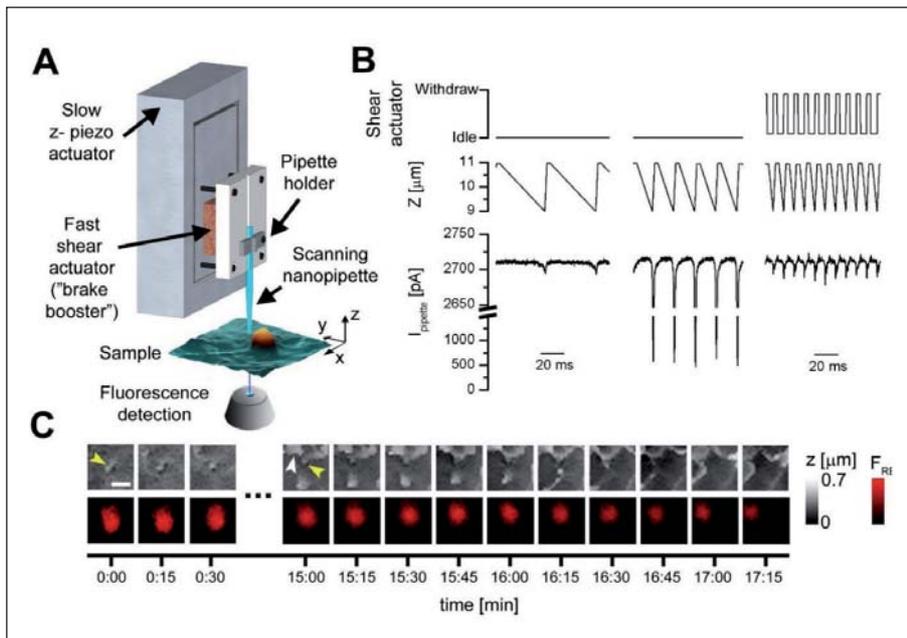


Figura 2. Sviluppo di fast hopping probe ion conductance microscopy (HPICM) per immagini dinamiche di interazione nanoparticelle membrane (cellule AT1) (A) Schema dell'assemblamento dei vari piezo in XYZ e interazione con misure confocali di superficie. (B) Misura del segnale di comando per il 'fast shear actuator (alto)', slow z-axis piezo (Z, in mezzo) e la corrente attraverso la scanning nanopipette (IPipette, in basso) con un raggio stimato in 20-50 nm. Il fast shear actuator (alto destra) aiuta a prevenire la collisione con un fall rate alto 500 nm/ms (IPipette traccia, pannello di destra). (C) Sequenza dell'internalizzazione di una nanoparticella di 50 nm colorata di rosso. La sequenza sopra (scala di grigio) rappresenta la topografia; la sequenza di immagini sottostante rappresenta il segnale fluorescente di una nanoparticella a carica negativa. Ogni frame copre un'area di $1.2 \times 1.2 \mu\text{m}$ ad una risoluzione di 20×20 pixels con un tempo di scansione di 6 secondi. Da notare la protrusione della membrana (freccia Bianca) che interagisce con la nanoparticella. Scala: 500 nm

In cardiomiociti adulti la presenza di TiO_2 provoca, tramite i nanopori precedentemente descritti, una riduzione della durata del potenziale d'azione con risultato di una contrattilità anomala (2). Il punto cruciale della nostra ricerca è stato quello di dimostrare che le nanoparticelle di TiO_2 possono raggiungere il cuore dopo instillazione tracheale, passando la barriera alveolo polmonare (2). Dopo quattro ore dalla somministrazione tracheale (2 mg/kg) l'animale veniva sacrificato e cuore e polmoni inclusi in soluzione fissativa per microscopia elettronica. Abbiamo notato la presenza di nanoparticelle di TiO_2 in entrambi i tessuti (Figura 3). Abbiamo inoltre notato come il numero di aritmie indotte (extrasistole e fibrillazioni ventricolari) fosse notevolmente aumentato negli animali trattati, così come il potenziale refrattario effettivo. Un ultimo dato importante riguarda la tossicità; essendo il TiO_2 un materiale ritenuto inerte con biodisponibilità elevata si è ritenuto opportuno valutare in polmoni, trachea e cuori la presenza di T-BARs, un indice di perossidasi lipidica dovuta a stress ossidativo. I dati confermano la presenza di T-BARs in cuori e polmoni solo per animali trattati con NPs mentre è minima negli animali di controllo. La presenza di T-BARs in trachea è probabilmente dovuta alle procedure meccaniche di instillazione tracheale.

Co-morbidity ipertensione-esposizione a NPs: ratti ipertesi e TiO_2 -NPs

Un ulteriore sviluppo dello studio è stato quello di dimostrare che l'iper-suscettibilità, ovvero una condizione di cardiomiopatia può accentuare la presenza di aritmie in presenza di nanoparticolato, soprattutto in una condizione di cronicità (dosi ripetute di TiO_2 -NPs ogni settimana per 6 settimane (manoscritto in preparazione) (5).

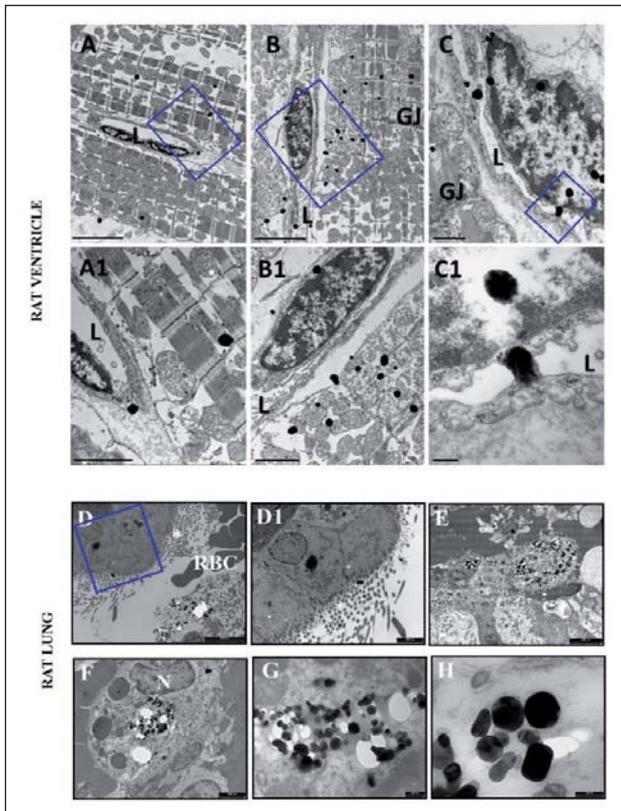


Figura 3. Presenza di TiO₂-NPs in miocardio ventricolare di ratto e polmone dopo instillazione tracheale: analisi TEM. A. Ventricolo SX. NPs sono presenti in prossimità dei capillari (*). B. Ingrandimento delle NPs vicino ai sarcomeri e alle linee Z (Myo: miofibrille) e mitocondri (Mt). C and C1. Ingrandimento delle NPs sulle miofibrille. Scala: A = 5 μm; B = 1 μm; C = 500 nm; C1 = 200 nm. D-G. Polmone. Sezione longitudinale del miocardio mostra la presenza di NPs nel citoplasma (N, nucleo, RBC, eritrociti). Scala: D = 5 μm; E = 1 μm; E1 = 200 nm. H. Agglomerati di NPs osservati nel parenchima polmonare e nei macrofagi. Scala: F = 2 μm; F1 = 1 μm; G = 1 μm; G1 = 500 nm; G2 = 200 nm.

Ad animali ipertesi radiotelemetrati è stato misurato l'ECG per 30 min., giornalmente. Mentre ci aspettavamo un aumento del numero delle aritmie (qui mostrate come blocchi atrio-ventricolari, Figura 4 frecce) durante e alla fine dell'esposizione, tutto ciò non avveniva; notiamo che gli eventi aritmici sono dipendenti dalla presenza di TiO₂ (Figura 4B), per poi terminare durante l'ultima settimana di recupero e tornare ai valori di controllo (7ma settimana, no instillazione).

Particolato Diesel: Euro3 vs. Euro4

Il meccanismo di internalizzazione del nanoparticolato e la possibilità di arrivare direttamente al cuore ha sollecitato diverse ipotesi atte a spiegare come mai lavoratori a costante contatto con gli scarichi Diesel possano avere una variabilità nei parametri ECG non compensata dalla normale bilancia simpato-vagale⁶. Inoltre un'ulteriore ipotesi da verificare è la presenza maggiore di nanoparticolato diesel nei fumi derivanti da scarichi Euro4 rispetto a scarichi Euro3 dove il particolato è più aggregato (sperimentazione in corso). Abbiamo quindi instillato ratti sperimentali normali con DEP-Euro3 e DEP-Euro4, 1-2 mg/kg e misurato a cuore aperto ECG, eccitabilità e refrattarietà. I risultati mostrano un'espressiva diminuzione dell'eccitabilità e della soglia correlata ad un aumentato velocità di conduzione (Figura 5) ed ad un'aumentata disomogeneità delle velocità nella superficie epicardica monitorata. Il risultato finale è un'elevata propensione aritmica di DEP-Euro4 vs. DEP-Euro3.

Conclusioni

L'uso di macchinari diesel negli ambienti di lavoro è purtroppo un settore in espansione anche se poco si sa della tossicologia delle DEPs. Inoltre la tossicologia DEPs e dei nanomateriali ingegnerizzati (TiO₂) dipende dalle proprietà fisico-chimiche e non è possibile generalizzarne il

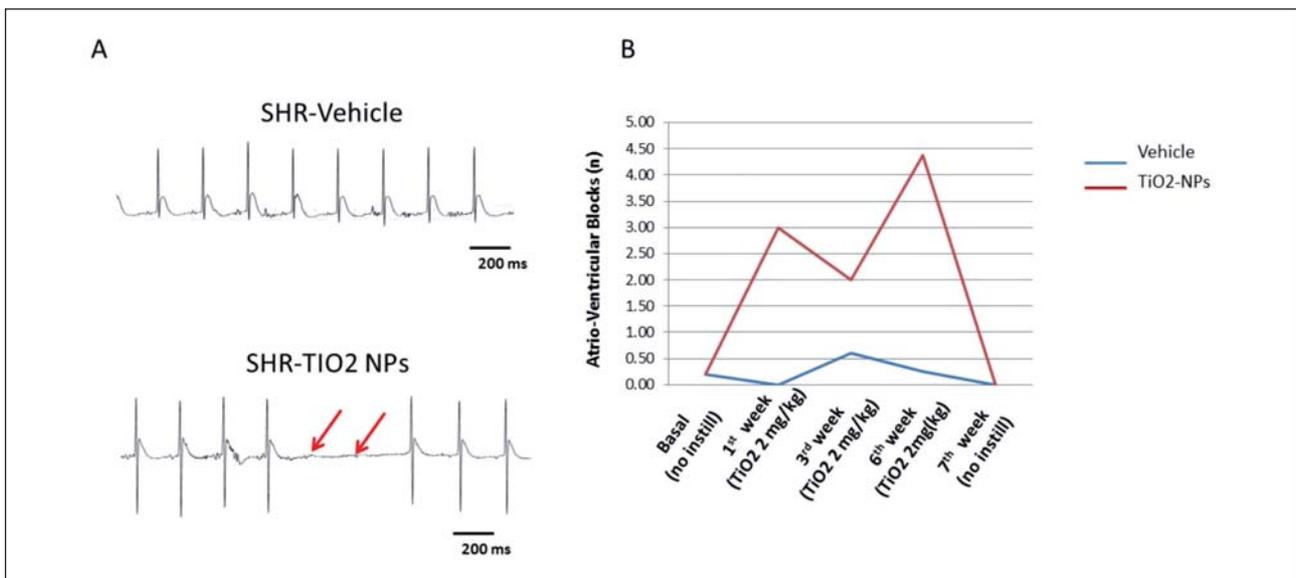


Figura 4. Presenza di blocchi atrioventricolari in ratti ipertesi trattati con TiO₂ NPs 2 mg/kg per 6 settimane (singolo dose a settimana). A, traccia in alto. ECG in ratti SHR non trattati. Traccia in basso. ECG in SHR trattati che mostrano la presenza consecutiva di 2 blocchi AV. B. Numero di blocchi atrioventricolari misurati in condizione di controllo (linea blue, no instillazione) e in presenza di TiO₂-NPs (linea rossa). Si noti come al termine dell'instillazione (7ma settimana) il numero di blocchi AV si riduce a 0

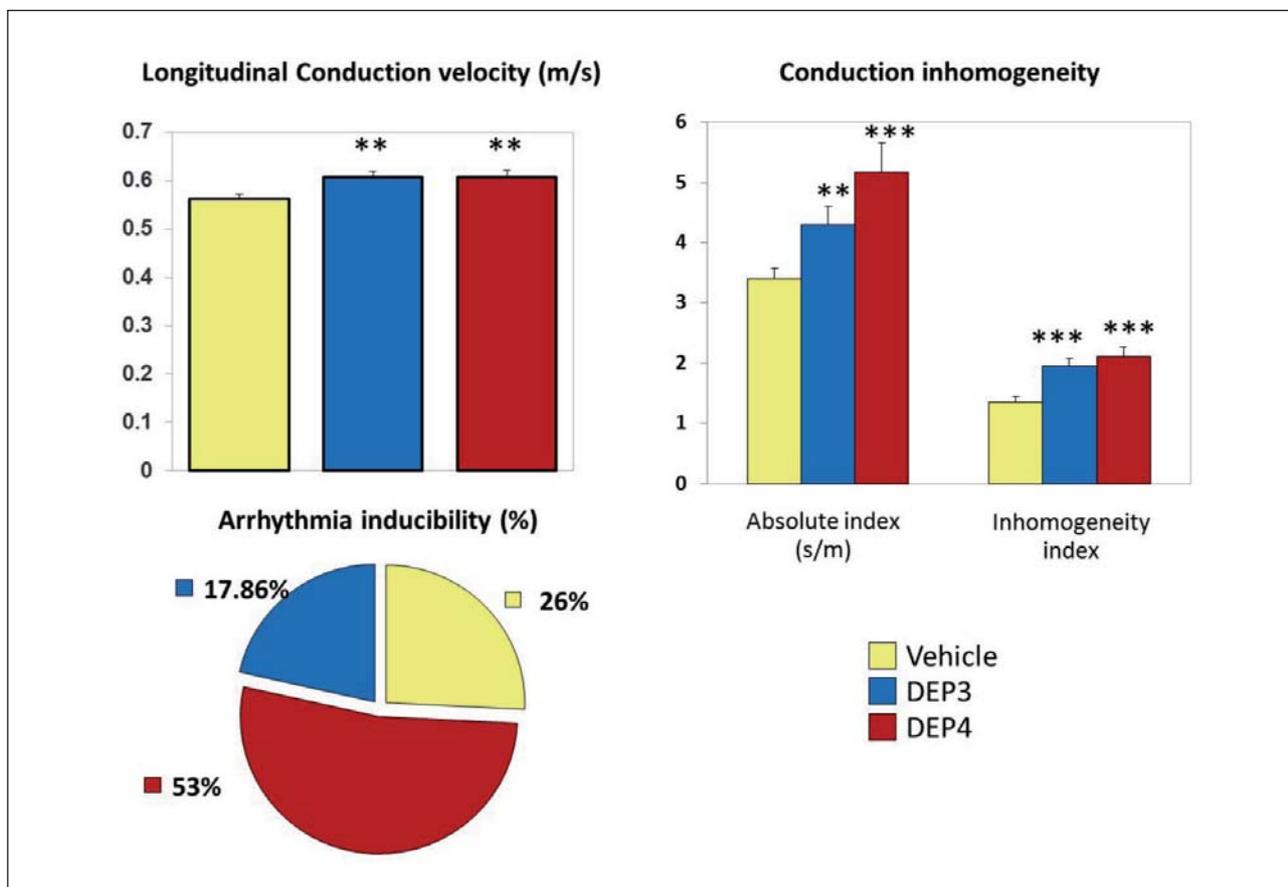


Figura 5. Parametri dinamici dell'eccitabilità cardiaca. Alto-Sx: Velocità di conduzione lungo le fibre. Alto-dx. Inomogeneità della velocità di conduzione. Basso. Percentuale di aritmie indotte in animali instillati con fisiologica (giallo), DEP3 (blu), DEP4 (Rosso)

meccanismo. Bisogna capire e prevedere quali possono essere gli organi bersaglio e gli effetti patologici. I risultati presenti in questo studio hanno aperto un nuovo campo di ricerca per studiare la co-morbidità NP- malattie cardiovascolari e per valutare il rischio dei lavoratori che già presentano un rischio cardiaco in atto. Lo studio ha inoltre stressato l'identificazione e l'applicazione di nuove e innovative metodologie per studiare e prevenire le patologie dovute all'esposizione di nanomateriali e trasferire queste conoscenze al sistema sanitario nazionale. Questi risultati aumenteranno le conoscenze nel campo delle nanoparticelle derivanti da scarichi Diesel, e da TiO_2 in linea con una delle richieste dell'OSH European Strategy 2007-2012, seguendone il piano Sanitario Nazionale recentemente approvato dal Piano Nazionale di Prevenzione.

Bibliografia

- Pandit SV, Clark RB, Giles WR, Demir SS. A mathematical model of action potential heterogeneity in adult rat left ventricular myocytes. *Biophysical journal* 2001; 81: 3029-3051.
- Savi M, Rossi S, Bocchi L, Gennaccaro L, Cacciani F, Perotti A, Amidani D, Alinovi R, Goldoni M, Aliatis I, Lottici PP, Bersani D, Campanini M, Pinelli S, Petyx M, Frati C, Gervasi A, Urbanek K, Quaini F, Buschini A, Stilli D, Rivetti C, Macchi E, Mutti A, Miragoli M, Zaniboni M. Titanium dioxide nanoparticles promote arrhythmias via a direct interaction with rat cardiac tissue. *Particle and fibre toxicology* 2014; 11: 63.
- Novak P, Shevchuk A, Ruenraroengsak P, Miragoli M, Thorley AJ, Klenerman D, Lab MJ, Tetley TD, Gorelik J, Korchev YE. Imaging single nanoparticle interactions with human lung cells using fast ion conductance microscopy. *Nano letters* 2014; 14: 1202-1207.
- Miragoli M, Novak P, Ruenraroengsak P, Shevchuk AI, Korchev YE, Lab MJ, Tetley TD, Gorelik J. Functional interaction between charged nanoparticles and cardiac tissue: A new paradigm for cardiac arrhythmia? *Nanomedicine* 2013; 8: 725-737.
- Rossi S, Mazzola M, Savi M, Gennaccaro L, Garcia OL, Frati C, Quaini F, Stilli D, Macchi E, Mutti A, Zaniboni M, Miragoli M. Long term exposure to titanium dioxide nanoparticles directly affects cardiac structure and performance in spontaneously hypertensive rats. *Vasc Pharmacol* 2015; 75: 67-68.
- Peretz A, Kaufman JD, Trenga CA, Allen J, Carlsten C, Aulet MR, Adar SD, Sullivan JH. Effects of diesel exhaust inhalation on heart rate variability in human volunteers. *Environmental research* 2008; 107: 178-184.

Corrispondenza: Michele Miragoli, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Via Gramsci 14, 43124 Parma, Italy, Tel. 0521903256, E-mail: michele.miragoli@unipr.it