

Deep In



UROLOGIA



Gold nanoparticles approach to detect chondroitin sulphate and hyaluronic acid urothelial coating

Uso delle nanoparticelle d'oro per localizzare il condroitin solfato e l'acido ialuronico nel *coating* uroteliale

Gli autori

G. Guelfi, V. Stefanetti, D. Zampini, O. P. Oommen, G. Brecchia, C. Dall'Aglio, R. Arcelli, G. Cochetti, A. Boni, E. Mearini

Publicato online in *Sci Rep.* 2017 Sep 4;7(1):10355.

Background 1/2

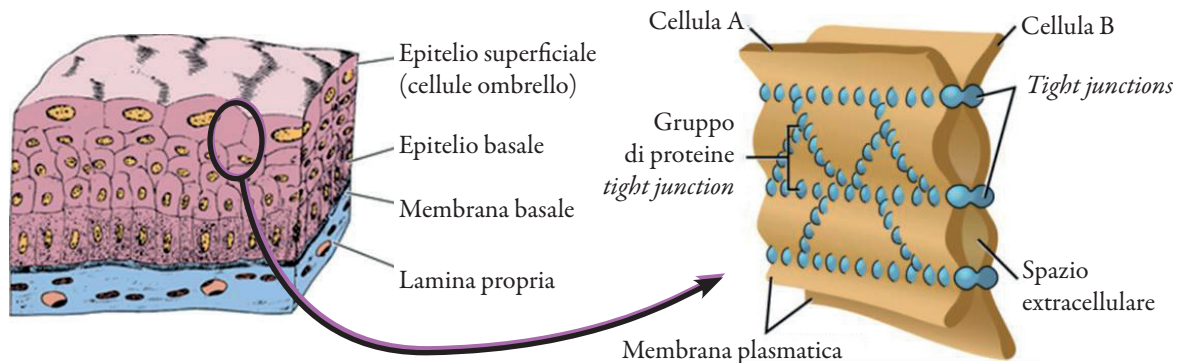


L'epitelio vescicale (definito anche urotelio o epitelio di transizione) è un tessuto altamente specializzato che gioca un ruolo chiave nella difesa della vescica da diverse tipologie di tossine.

L'urotelio è costituito da tre strati di cellule epiteliali:

- ▶ una fila di **cellule basali**, piccole, irregolarmente sferoidali o poliedriche;
- ▶ più file di **cellule intermedie**, piriformi o clavate, con l'estremità rigonfia rivolta verso la superficie e l'estremità sottile insinuata fra le cellule basali;
- ▶ una fila di **cellule superficiali** apicali a forma di ombrello.

L'urotelio è rivestito, inoltre, da un sottile strato di glicosaminoglicani (GAG), *coating*, che funge da barriera protettiva nei confronti di agenti infettivi e sostanze tossiche contenute nelle urine. Tra i GAG, il condroitin solfato (CS) e l'acido ialuronico (HA) sono i più abbondantemente presenti sull'urotelio vescicale.



Background 2/2



Le caratteristiche principali che l'urotelio conferisce alla mucosa che riveste l'intero apparato urinario sono l'**impermeabilità** e la **distensibilità**.

L'impermeabilità è selettiva grazie alla presenza di tre diversi tipi di barriera:

- ▶ la **barriera apicale**, che impedisce il passaggio di piccole molecole ed è formata dal *coating* uroteliale;
- ▶ le **barriere laterali**, che impediscono il passaggio intercellulare dell'urina grazie a specifiche giunzioni (desmosomi e *tight junctions*);
- ▶ le **barriere basali**, che ancorano l'urotelio alla membrana basale.

La somministrazione esogena di HA è ampiamente accettata come terapia per alcuni disordini vescicali e l'instillazione intravescicale di HA e CS, che agisce promuovendo la rigenerazione dello strato di GAG dell'urotelio, costituisce una strategia terapeutica efficace. Ciononostante, **non sono presenti in letteratura dati che confermino la localizzazione di HA e CS all'interno dell'urotelio e l'effetto della loro integrazione all'interno dei tessuti.**



Obiettivo dello studio

Verificare la localizzazione vescicale di HA e CS, utilizzando una tecnica di incubazione *ex vivo* di vescica di coniglio con nanoparticelle d'oro (AuNP, chiamate anche oro colloidale) legate all'HA e al CS, e determinare se i benefici della terapia con HA e CS sono dovuti alla ricostituzione della barriera di protezione vescicale con i GAG.



Materiali e metodi

Sono state sintetizzate nanoparticelle legate all'HA (HA-AuNP) e nanoparticelle legate al CS (CS-AuNP) utilizzando HA di 1.500 kDa e CS di 38 kDa forniti da IBSA Farmaceutici Italia. Questo particolare peso molecolare è stato scelto per riprodurre le condizioni *in vivo*. Come controllo sono state prodotte nanoparticelle legate alla BSA (siero fetale bovino; BSA-AuNP).

Per la caratterizzazione delle HA-AuNP e delle CS-AuNP sono state utilizzate tecniche di microscopia elettronica a scansione (SEM) e a trasmissione elettronica (TEM), mentre per la misura della dimensione e la valutazione dello stato di aggregazione è stata utilizzata la diffusione dinamica della luce (DLS).

Nello studio sono stati utilizzati 18 conigli, dai quali sono state recuperate e messe in coltura le vesciche (modello *ex vivo*): 12 sono state incubate con le HA-AuNP e le CS-AuNP; 6 con le nanoparticelle di controllo (BSA).

Successivamente, sono stati ottenuti dei campioni di vescica per la microscopia ottica, per la microscopia elettronica a scansione (SEM) e per quella a trasmissione elettronica (TEM).

Risultati 1/3



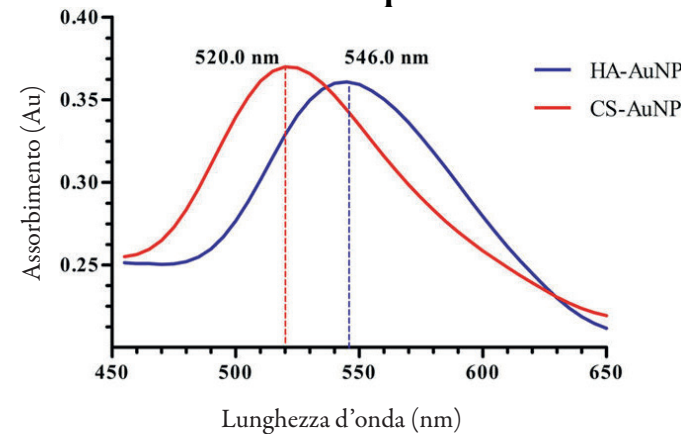
Lo spettro di assorbimento delle nanoparticelle legate ai GAG mostra un **picco nello spettro UV-visibile** a una lunghezza d'onda di 546 nm per HA-AuNP e a 520 nm per CS-AuNP, compatibile con una formazione di morfologia sferica.

L'**analisi DLS** indica che l'89% delle HA-AuNP ha una dimensione di 98 ± 18 nm e il 99,4% delle CS-AuNP una dimensione di 58 ± 12 nm.

L'**analisi TEM** indica, invece, rispettivamente $40 \pm 1,5$ nm per le HA-AuNP e $19 \pm 0,6$ nm per le CS-AuNP.

La maggiore dimensione della DLS è dovuta all'idratazione dello strato dei GAG che viene rilevata con questa tecnica ma non con la microscopia TEM.

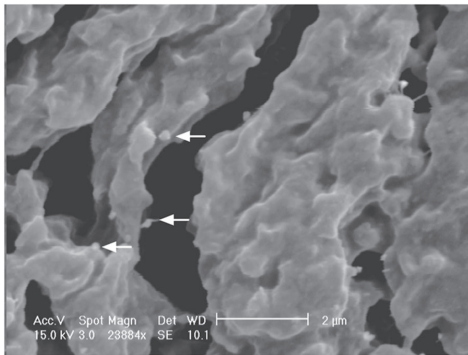
Spettro di assorbimento delle nanoparticelle



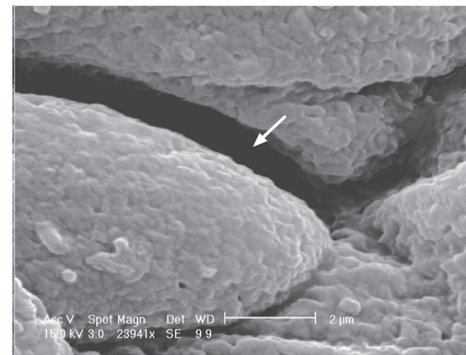
Risultati 2/3



Dopo l'incubazione *ex vivo*, la **microscopia SEM** ha evidenziato che una **grossa parte delle cellule epiteliali apicali a superficie convessa** (cellule a ombrello) rivolte verso il lume della vescica è **ricoperta da uno strato di nanoparticelle d'oro legate all'HA e al CS (GAG-AuNP)**; questo stesso aspetto non viene invece evidenziato nelle vesciche incubate con le nanoparticelle legate alla BSA utilizzate come controllo.



**Immagine con microscopia SEM:
presenza di GAG-AuNP**

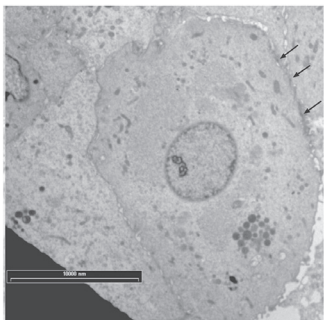


**Immagine con microscopia SEM:
assenza di GAG-AuNP**

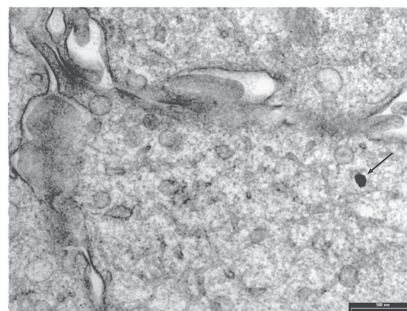
Risultati 3/3



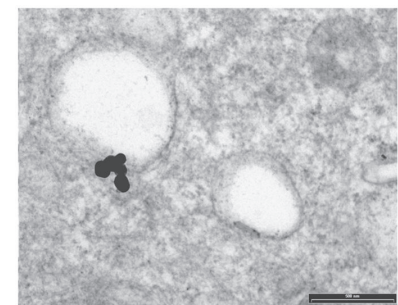
L'analisi TEM ha mostrato, inoltre, alcune **nanoparticelle legate ai GAG (GAG-AuNP) sotto la superficie della membrana plasmatica delle cellule apicali (*tight junction*)**; in particolare, alcune **nanoparticelle GAG-AuNP risultano evidenti nel citoplasma** dimostrando che queste possono entrare all'interno delle cellule, superare la membrana plasmatica e localizzarsi sulle membrane degli organelli citoplasmatici.



Analisi TEM: presenza di GAG-AuNP sulla membrana plasmatica delle cellule apicali



Analisi TEM: presenza di GAG-AuNP nel citoplasma



Analisi TEM: presenza di GAG-AuNP sulle membrane degli organelli citoplasmatici

Discussione



Lo studio dimostra con chiara evidenza la **presenza di GAG esogeni nelle cellule a ombrello** dopo incubazione con nanoparticelle d'oro contenenti HA e CS. Inoltre, la **presenza dei GAG è stata documentata anche all'interno delle *tight junctions* e nel citoplasma delle cellule a ombrello.**

Ciò è particolarmente importante se si considera il pathway rigenerativo dell'urotelio: dopo pochi giorni da un danno uroteliale, infatti, le ***tight junctions* cominciano a svilupparsi** tra le cellule intermedie incrementandone la funzione sigillante e unendo le due cellule adiacenti senza lasciare interstizi in modo da **impedire il passaggio di fluidi.**

La **somministrazione profilattica di GAG esogeni potrebbe, quindi, giocare un ruolo importante nel rapido ripristino dell'impermeabilità uroteliale.** In particolare, le *tight junctions* ricoprono un ruolo centrale nel ristabilire la resistenza transepiteliale, bloccando l'ingresso di ioni all'interno dell'epitelio.

Limite di questo studio è che la microscopia utilizzata per le analisi ha un valore puramente qualitativo e che non si hanno informazioni sul meccanismo di ancoraggio/legame dei GAG-AuNP.

Conclusioni



Lo studio dimostra la presenza di GAG esogeni non solo sulla superficie vescicale, ma anche nelle *tight junctions* tra le cellule a ombrello, presupposto particolarmente rilevante nel pathway rigenerativo dell'urotelio.

In futuro sarà necessario validare questi risultati *in vivo* e valutare la somministrazione dei GAG in un modello sperimentale di cistite per poter caratterizzare i processi molecolari legati ai GAG.

