

CARATTERIZZAZIONE ACUSTICA DI NANOBOLLE LIPIDICHE

Angelo Biagioni (1), Andrea Bettucci (1), Adriano Alippi (1), Carlotta Marianecchi (2), Federica Rinaldi (2), Maria Carafa (2)

1) Dipartimento di Scienze di Base e Applicate per l'Ingegneria, Sapienza Università di Roma, Via A. Scarpa 16, 00161 Roma, Italia

2) Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Sapienza Università di Roma, Piazzale Aldo Moro 5, 00185 Roma, Italia

1. Introduzione

Gli agenti di contrasto usati in ecografia medica sono soluzioni liquide disperse di microgusci lipidici (microbolle), aventi un diametro medio compreso tra 2 e 5 μm , che racchiudono un gas inerte. Iniettati nel circuito venoso, hanno lo scopo di incrementare l'ecogenicità e, conseguentemente, la visibilità nelle immagini ecografiche, dei vasi venosi di ridotto diametro, grazie all'aumento del disadattamento di impedenza acustica tra il vaso sanguigno e il tessuto circostante generato dal gas incapsulato all'interno delle microbolle. Detto in altre parole: le microbolle hanno la capacità di diffondere l'onda elastica incidente proveniente dall'ecografo, in maniera molto maggiore rispetto ai globuli rossi presenti nel sangue [1,2].

Nel caso dei sistemi microvascolari, quando cioè il diametro del vaso sanguigno scende al di sotto del micron, gli agenti di contrasto attualmente disponibili, date le dimensioni esterne dei gusci lipidici, sono inutilizzabili; è stato recentemente dimostrato, tuttavia, che nanobolle aventi un diametro di 200-300 nm possono avere proprietà di scattering tali da divenire delle potenziali candidate all'uso come mezzo di contrasto acustico [3].

Pertanto, l'efficienza di scattering degli ultrasuoni da parte di nanobolle lipidiche è un parametro importante per valutare un loro utilizzo quali mezzi di contrasto in ecografia medica per la visualizzazione di vasi sanguigni di piccolo diametro. Ma vi è un ulteriore interesse nelle soluzioni disperse di nanobolle: esse sono potenzialmente impiegabili come mezzi di trasporto di farmaci e/o geni in siti specifici del corpo umano. È noto, infatti, che le nanobolle, per valori sufficientemente elevati dell'intensità dell'onda acustica incidente, possono divenire nuclei di cavitazione; se questo fenomeno si verifica in prossimità di membrane cellulari, esso provoca in quest'ultime l'apertura di nanopori del diametro di circa 300-700 nm aventi una vita media di 20-50 ms [4]. Questo fe-

nomeno, che va sotto il nome di *sonoporazione*, aumenta la permeabilità cellulare favorendo la possibilità di ingresso all'interno della cellula di medicinali o geni, eventualmente contenuti all'interno della stessa nanobolla [5,6].

In questo articolo vengono riportati alcuni risultati preliminari sulle caratteristiche elastiche e sull'efficienza di scattering di nanobolle formate da gusci lipidici del diametro di poche decine di nanometri: le misure sono state effettuate con un sistema pulse-echo ad alta frequenza e con tecniche fotoacustiche. I risultati ottenuti sono stati paragonati a quelli ricavabili dall'utilizzo di un agente di contrasto acustico commercialmente disponibile, il SonoVue[®] prodotto dalla Bracco Imaging, che è costituito da una sospensione liquida di microbolle lipidiche.

2. Materiali e metodi

Nanobolle aventi un guscio lipidico di raggio medio pari a 150-200 nm contenenti tetradecafluoroetano, sono state prodotte presso il Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco della Sapienza Università di Roma.

La valutazione dell'effettiva presenza di gas all'interno delle nanobolle è stata controllata con una tecnica fotoacustica: viene misurata la diminuzione di ampiezza dei picchi di risonanza corrispondenti alle frequenze proprie di un risonatore acustico, utilizzato come cella fotoacustica, al variare della concentrazione di nanobolle all'interno della cella.

La cella fotoacustica, in ottone, è una struttura acusticamente risonante di forma cilindrica e avente un volume interno di $V = 7.68 \text{ cm}^3$ al cui interno si trova la soluzione liquida che si vuole caratterizzare fotoacusticamente; un laser a ioni di argon (lunghezza d'onda 4880 Å), periodicamente modulato in ampiezza a una frequenza variabile tra 50 e 2000 Hz, incide sul liquido attraverso una finestra trasparente della cella.

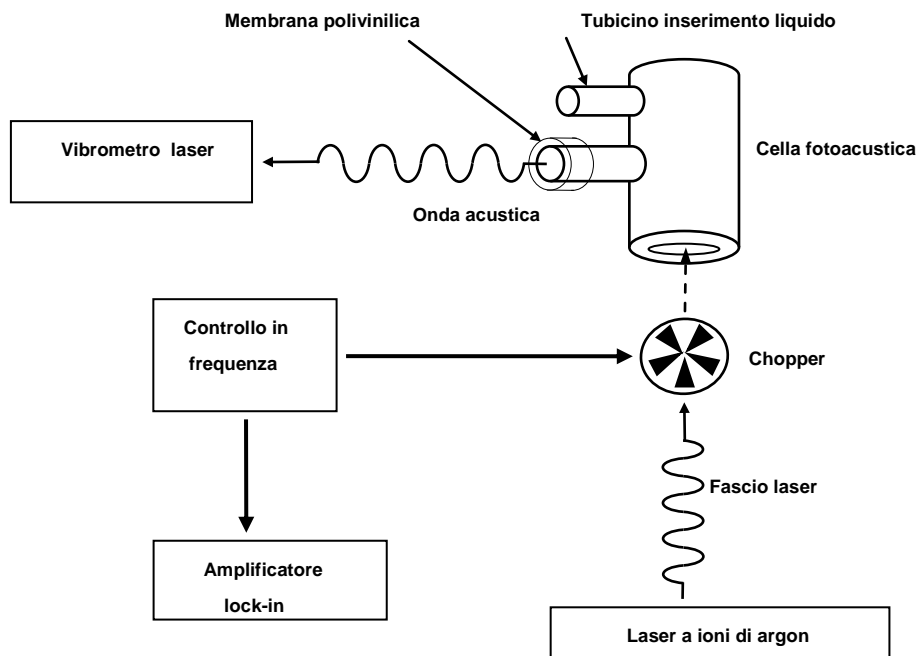


Figura 1 – Schema della disposizione sperimentale per le misure fotoacustiche

Il periodico riscaldamento del liquido provoca variazioni periodiche del suo volume che si riflettono in spostamenti di una piccola membrana polivinilica a contatto con il liquido; tali spostamenti vengono misurati con un vibrometro laser. Maggiore è la presenza di gas all'interno delle micro/nanobolle disperse nel liquido, più grande è la diminuzione dell'ampiezza di oscillazione della membrana polivinilica, alle frequenze di risonanza della cella fotoacustica [7]. L'insieme del dispositivo sperimentale è mostrato in Fig. 1.

La Fig. 2 riporta gli spettri di risonanza della cella fotoacustica per una sospensione di SonoVue[®] diluito secondo le prescrizioni del produttore, e per una sospensione di nanobolle; il confronto nel caso del SonoVue[®] è fatto con l'acqua distillata mentre nel caso delle nanobolle, il liquido di riferimento è l'hepes. I due picchi negli spettri di risonanza corrispondono alle due frequenze proprie della cella fotoacustica [7].

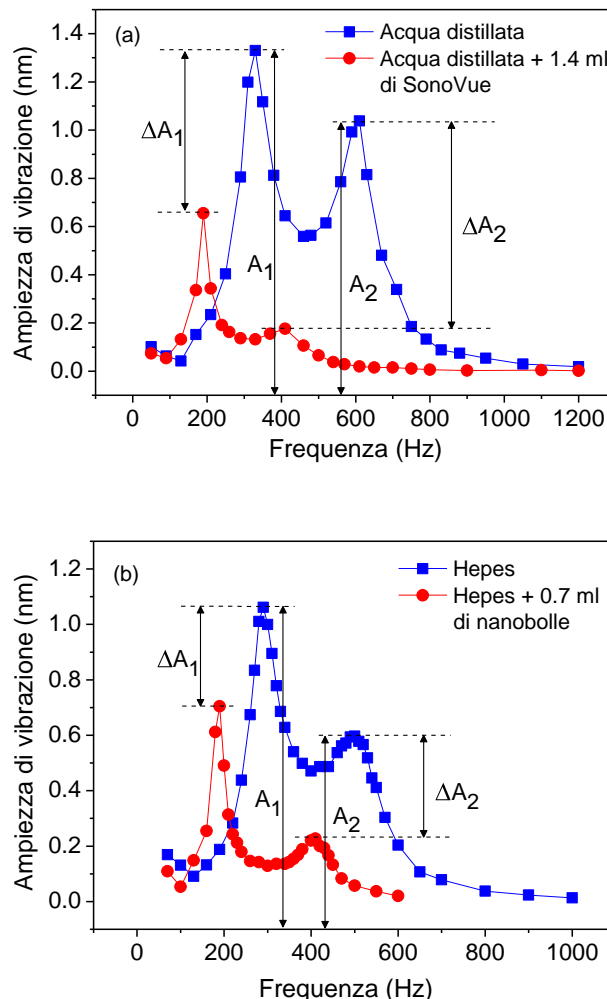


Figura 2 – Risposta in frequenza della cella fotoacustica corrispondente a due diverse soluzioni in essa contenute: (a) sospensione dispersa di SonoVue[®], (b) soluzione dispersa di nanobolle

Nelle misure effettuate, 1.4 ml di soluzione di SonoVue® sono stati diluiti in 7.68 ml di acqua distillata provocando delle variazioni relative di ampiezza di vibrazione per la prima e la seconda frequenza di risonanza pari rispettivamente a: $(\Delta A_1 / A_1)_{SV} \approx 0.51$ e $(\Delta A_2 / A_2)_{SV} \approx 0.82$. Per quanto riguarda le nanobolle, 0.7 ml di soluzione di nanobolle in 7.68 ml di hepes generano una variazione relativa delle ampiezze di vibrazione alle due frequenze di risonanza di $(\Delta A_1 / A_1)_{NB} \approx 0.36$ e di $(\Delta A_2 / A_2)_{NB} \approx 0.61$. Questi valori sono inferiori di circa il 30% rispetto a quelli ottenuti con il SonoVue®; tuttavia si deve tener presente che nel caso delle nanobolle, essi sono stati ottenuti con una soluzione dispersa di 0.7 ml di nanobolle contro 1.7 ml di SonoVue® nella stessa quantità, 0.7 ml, di solvente (acqua per il SonoVue® ed hepes per le nanobolle). Se si ipotizzasse, allora, di introdurre nella cella una quantità di nanobolle, ovvero una quantità di gas in esse contenuto pari a quella del SonoVue®, i rapporti di $(\Delta A_1 / A_1)_{NB}$ e $(\Delta A_2 / A_2)_{NB}$ raddoppierebbero: ciò conferma che i gusci lipidici delle nanobolle riescono a intrappolare efficacemente il tetradecafluoroesano.

L'efficienza di diffusione degli ultrasuoni da parte delle nanobolle al variare della loro concentrazione, è stata misurata con un classico sistema pulse-echo (Fig. 3); tale sistema è stato anche utilizzato per controllare la loro stabilità temporale effettuando misure di attenuazione delle onde elastiche sul medesimo campione di nanobolle, conservato a 4 C°, a distanza di 30 giorni.

La Fig. 4 riporta il valore dell'attenuazione del segnale ricevuto dal trasduttore (generato dall'onda acustica riflessa dalla base riflettente del contenitore in perspex in cui si trova la soluzione di nanobolle), misurato alla frequenza di 14 MHz, per diverse concentrazioni di nanobolle in hepes: si noti come l'efficienza di scattering dopo 30 giorni rimanga costante. I valori di attenuazione riportati hanno come attenuazione di riferimento, una soluzione di hepes priva di nanobolle.

Al crescere della concentrazione di nanobolle in hepes, cresce l'attenuazione del segnale riflesso, ovvero aumenta l'efficienza di scattering della soluzione, poiché aumenta la quantità di gas presente nel liquido; i valori che si ottengono con una concentrazione del 35% di nanobolle in hepes, sono confrontabili con quelli che si ottengono con il SonoVue® diluito secondo le prescrizioni del produttore: questi valori testimoniano un'efficienza di diffusione degli ultrasuoni molto elevata.

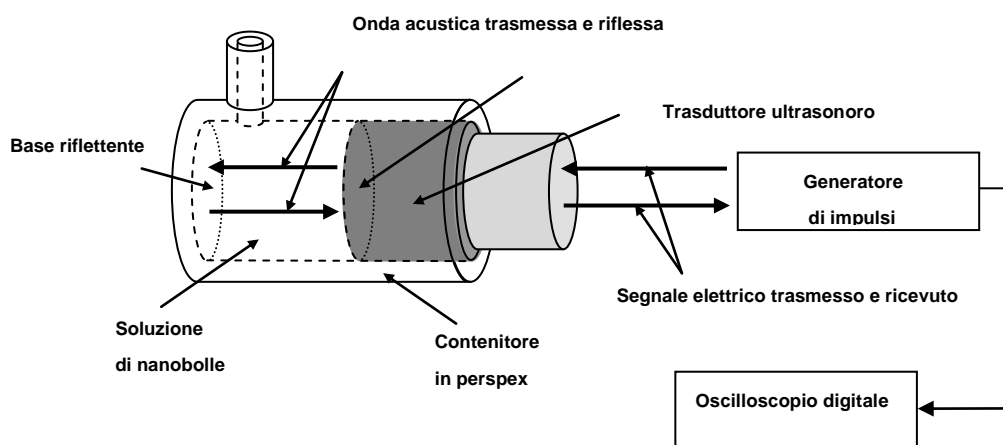


Figura 3 – Schema della disposizione sperimentale per le misure di tipo pulse-echo

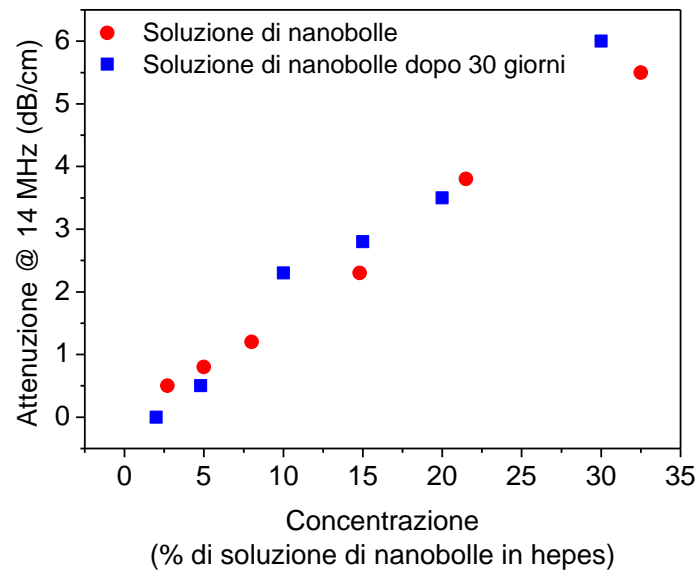


Figura 4 – Valori dell’attenuazione degli ultrasuoni, misurata a 14 MHz, al variare della concentrazione delle nanobolle in soluzione; una seconda serie di misure è stato ripetuta a distanza di 30 giorni

3. Conclusioni

Sono state riportate misure riguardo l’efficienza di scattering di nanobolle lipidiche con diametro medio di 200 nm contenenti tetradecafluoroesano; le misure, effettuate con la tecnica pulse-echo, rivelano un’attenuazione dipendente dalla concentrazione in soluzione delle nanobolle con valori che, per una concentrazione del 35% di nanobolle in hepes, raggiungono, a 14 MHz, il valore di circa 6 dB/cm. Tale valore è confrontabile con le attenuazioni prodotte da agenti di contrasto commercialmente disponibili come, ad esempio, il SonoVue®.

È stata inoltre utilizzata una tecnica fotoacustica per la valutazione dell’efficacia di intrappolamento del gas all’interno delle nanobolle, riscontrando, anche in questo caso, valori simili a quelli misurati nel SonoVue®.

4. Bibliografia

- [1] Stride E., Saffari N., *Microbubble ultrasound contrast agents: a review*, Proc. Instn Mech. Engrs Part H: J. Engineering in Medicine, **217** (2003), pp. 429-447
- [2] Cosgrove D., *Ultrasound contrast agents: an overview*, Eur. J. Radiol., **60** (2006), pp. 324-30
- [3] Brigger I., Dubernet C., Couvreur P., *Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis*, Adv. Drug Deliv. Rev., **54** (2002), pp. 631-651
- [4] Zarnitsyn V., Rostad C.A., Prausnitz M.R., *Modeling Transmembrane Transport through Cell Membrane Wounds Created by Acoustic Cavitation*, Biophys J., **95** (2008), pp. 4124-4138
- [5] Qin S., Caskey C.F., Ferrara K.W. *Ultrasound contrast microbubbles in imaging and therapy: physical principles and engineering*, Phys. Med. Biol, **54** (2009), pp.

R27-R57

- [6] Unger E.C., Hersh E., Vannan M., Matsunaga T.O., et al., *Local drug and gene delivery through microbubble*, Prog. Cardiovasc. Dis., **44** (2001), pp. 45-54
- [7] Alippi A., Bettucci A., Biagioni A., et al., *Photoacoustic cell for ultrasound contrast agent characterization*, Rev. Sci. Instrum., **81** (2010), pp. 1-7