



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Scienze Biologiche

Scuola di Dottorato di Ricerca in : Biochimica e Biotecnologie

Indirizzo: Biochimica e Biofisica

Ciclo: XX

Effetto della struttura chimica
del fotosensibilizzatore e del veicolante
sull'inattivazione di microorganismi patogeni
mediante terapia fotodinamica

Direttore della scuola: Ch.mo Prof. Lorenzo Pinna

Supervisore: Ch.mo Prof. Giulio Jori

Correlatore: Dott.ssa Fernanda Ricchelli

Dottorando: Dott.ssa Stefania Ferro

31 gennaio 2008

Riassunto

La terapia fotodinamica (PDT) è largamente utilizzata in campo oncologico per il trattamento di tumori solidi. Questa tecnica prevede l'utilizzazione di un fotosensibilizzatore che si localizzi a livello tumorale, e l'irradiazione dell'area neoplastica con lunghezze d'onda dello spettro visibile. La luce incidente è assorbita in maniera selettiva dal fotosensibilizzatore ed è in grado di produrre, nel microintorno, specie reattive dell'ossigeno con conseguente danno a livello delle cellule tumorali. Una nuova applicazione della PDT in campo antimicrobico è stata possibile grazie all'ingegnerizzazione di molecole fotosensibilizzatrici caratterizzate dalla presenza di gruppi carichi positivamente che promuovono una veloce e selettiva interazione con le cellule microbiche dotate, sulla superficie esterna, di una netta carica negativa.

Sono state sviluppate ricerche focalizzate sulla possibilità di estendere a fotosensibilizzatori non cationici l'utilizzazione come agenti antimicrobici. A tal fine, è stata studiata la fotosensibilità di batteri Gram-positivi all'azione di due diversi fotosensibilizzatori: l'ematoporfirina (anionica) e la clorofilla *a* (neutra). Il ceppo batterico scelto è lo *Staphylococcus aureus* meticillina-resistente (MRSA), un batterio Gram-positivo particolarmente difficile da debellare con tradizionali terapie. Le sostanze sono state testate sia nella forma libera (soluzione etanolica) che incorporate in vettori rappresentati da diversi tipi di liposomi unilamellari (DPPC, DMPC, DOTAP). I vettori liposomiali utilizzati si differenziano per dimensioni delle vescicole, fluidità delle membrane e cariche presenti sulle medesime. L'efficienza fotosensibilizzatrice dell'ematoporfirina (HP) incorporata in liposomi cationici (DOTAP) risulta essere molto maggiore rispetto a quella osservata per la porfirina in soluzione omogenea oppure a quella ottenuta con la stessa porfirina incorporata in liposomi neutri (DPPC e DMPC). Studiando il comportamento della seconda molecola, la clorofilla (Chl), sempre incorporata in liposomi, non è stato possibile ottenere lo stesso

grado d'inattivazione batterica sull'MRSA, mentre la forma libera risulta molto attiva. Per approfondire lo studio sul diverso comportamento dei vettori liposomiali utilizzati, abbiamo indagato sulla fluidità delle loro membrane.

Esperimenti di anisotropia di fluorescenza dimostrano come la molecola di Chl vada a modificare la struttura del liposoma (DOTAP) irrigidendola e facendole probabilmente perdere la struttura vescicolare. Si è concluso che, non solo la carica, ma anche la fluidità del veicolante sono necessari per una buona interazione con il substrato.

Nella seconda parte del progetto è stata studiata l'attività di una porfirina cationica meso-trifenil,mono(N-dodecil)piridil-porfina (TDPyP). Dopo incorporazione della sostanza in liposomi cationici DOTAP sono stati confermati i dati di maggior efficacia di fotoinattivazione nella sopravvivenza batterica, risultato che non è stato raggiunto dopo incorporazione della stessa porfirina in liposomi neutri sia solidi che fluidi. Questo fotosensibilizzatore è stato incorporato anche in complessi di ciclodestrine (β -CD) ed è stato testato con successo sia un ceppo Gram-positivo (*S. aureus* MRSA) che su un ceppo Gram-negativo (*Escherichia coli* 04).

Probabilmente, entrambe i veicolanti agiscono disorganizzando in un primo momento l'architettura tridimensionale della parete batterica per poi raggiungere più facilmente la membrana plasmatica sede di molti bersagli della PDT. Quest'ipotesi è confermata da studi di accumulo su cellule batteriche finalizzati a determinare il quantitativo di fotosensibilizzatore nei diversi compartimenti cellulari che dimostrano come nel caso dell'incubazione con liposomi, la porfirina vada a localizzarsi preferibilmente in membrana. Esperimenti su attività di enzimi marker di membrana (lattico e succinico deidrogenasi) hanno permesso di confermare che questo è il principale bersaglio d'azione dei fotosensibilizzatori sui microorganismi.

L'efficacia della PDT per il trattamento d'infezioni microbiche dovute a protozoi patogeni non è stata ancora studiata a fondo. A tal proposito è

stato scelto come modello *Acanthamoeba palestinensis*, protozoo responsabile di cheratiti, encefaliti granulomatose e infezioni cutanee nell'uomo. *A. palestinensis*, ameba a vita libera riscontrabile in aria, suolo e acqua presenta due forme: la vegetativa, in grado di nutrirsi e dividersi, e la cistica in grado di resistere alle condizioni ambientali più avverse.

In questi studi è stata utilizzata la ftalocianina RLP068, caratterizzata dalla presenza di quattro sostituenti cationici di natura N-metilpiridinica nelle posizioni periferiche del macrociclo tetraazaisoindolico.

Esperimenti di fotosensibilizzazione dimostrano come i trofozoiti siano inattivati dopo 10 min d'irradiazione, mentre è resa necessaria un'estensione del tempo d'irradiazione da fino a 20 min onde ottenere una sensibile inattivazione della forma cistica. Ulteriori studi di microscopia ottica sono stati utili per osservare la localizzazione del fotosensibilizzatore. Osservazioni al TEM di trofozoiti hanno evidenziato danni citoplasmatici dopo irradiazione, in parte confermati da test enzimatici su un enzima marker.

Il processo fotosensibilizzato si presenta, quindi come tecnica ad ampio spettro d'azione per il trattamento di infezioni microbiche.

Summary

Photodynamic therapy (PDT) represents a well established therapeutic modality, which was originally developed and recently approved for the treatment of a variety of solid tumours. The technique involves the combination of a tumour-localized and intrinsically non-toxic photosensitiser with harmless visible light wavelengths, which are specifically absorbed by the photosensitising agent; as a result, some hyper-reactive oxygen species are generated, which induce the specific irreversible damage of malignant cells and tissues. A novel application of PDT has been made possible by the preparation of photosensitisers whose molecule is characterized by the presence of functional groups (e. g. positively charged quaternarized nitrogens), which promote a very fast interaction with bacterial cells, hence a highly preferential inactivation of such pathogenic agents in comparison with the main constituents of host tissues, such as fibroblasts and keratinocytes.

With an aim to expand the type of photosensitising dyes which can be efficaciously used as antimicrobial photodynamic agents, we decided to study the photosensitised inactivation of a well-known antibiotic-resistant Gram-positive bacterium, namely meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), by using two non-cationic liposome-incorporated dyes, such as haematoporphyrin (HP) and chlorophyll (Chl).

Liposome-delivered photosensitisers have been often adopted in anti-tumour PDT and proven to yield a higher and more selective targeting of the neoplastic lesion. Thus, it appeared of interest to investigate the effect of liposomes as carriers of the photosensitising agent on its affinity for bacterial cells and the efficiency of photoinduced bacteria killing. Toward this purpose, we selected liposomal vesicles with a different degree of fluidity at the physiological temperature, as well as with different electric charge or size.

HP delivered via DOTAP liposomes induced a marked enhancement in phototoxicity of bacteria, while Chl delivered via the same liposomes had no detectable effect on the survival of MRSA cells, independently of the released amount or the nature of the vesicles.

The cationic photosensitizer TDPyP used in the second part of this research was designed with the aim to increase the selectivity for bacterial cell membranes. This porphyrin was found to be efficiently incorporated into DOTAP vesicles in spite of its positive charge. Thus, when the cationic DOTAP phospholipid is used as the porphyrin carrier, an appreciable potentiation of the photocidal effect takes place.

TDPyP was also included in inclusion complexes made by cationic cyclodextrin (β -CD). The inactivation of MRSA was very successful and was found to be efficient against the Gram-negative strain.

The DOTAP-delivered porphyrin is recovered from the protoplasts in significantly larger amount as compared with the free TDPyP. That the plasma membrane represents a primary target of the TDPyP-photosensitised process is also in agreement with the finding that the activity of two typical marker enzymes of the MRSA plasma membrane, namely succinate and lactate dehydrogenase, is rapidly impaired during the early stages of the process photosensitised by DOTAP-delivered TDPyP.

It is reasonable to hypothesize that the DOTAP vesicles or cyclodextrin behave similarly with other polycationic systems, such as poly-lysine, which primarily act as a disorganizing agent for the native three-dimensional architecture of the bacterial wall, thereby enhancing its permeability to externally added chemical agents; these can thus more easily reach the bacterial plasma membrane, where several targets of the porphyrin-photosensitised processes are present.

Acanthamoeba species are responsible for opportunistic and non-opportunistic infections, which can be fatal or highly invalidating in humans and other animals, such as granulomatous amoebic encephalitis and cutaneous infections in immunocompromised individuals, and amoebic

keratitis in immunocompetent individuals, respectively. The life cycle of *Acanthamoeba* consists of two stages, an actively feeding, dividing trophozoite and a dormant cyst. They encyst in response to adverse environmental conditions, such as food deprivation, desiccation, and changes in temperature and pH, forming a highly resistant stage endowed with a double wall containing cellulose as a major component. Antimicrobial therapy for these infections is generally empirical and patient recovery is often problematic, whereas some forms of combination therapy have proven to be more successful than single-drug therapies, because many drugs have amoebostatic but not amoebicidal activity. The development of alternative approaches in the medical and environmental control of such pathogenic protozoa is needed. Therefore we undertook a systematic investigation in order to assess the potential of PDT for the inactivation of protozoa in either the vegetative or cystic stage. In particular, our photosensitisation studies with *A. palestinensis* trophozoite cultures indicated the effectiveness of a tetracationic phthalocyanine (RLP068). We demonstrate that the RLP068 phthalocyanine, bearing four positively charged quaternary ammonium groups, exhibits a significant affinity for *A. palestinensis* even when the microorganism is in the cystic stage.

After irradiation there is an appreciable inactivation in both trophozoites and cysts; observations at the optical and electronic microscope demonstrated cytoplasmic damages of vegetative stages and wall damages of cysts.

Thus, PDT appears to represent an efficient modality for the therapy of microbial infections and is characterized by a broad spectrum of action.

Abbreviazioni

HP: Ematoporfirina

Chl: Clorofilla *a*

DMF: N,N-dimetilformammide

RLP068: 1(4),8(11),15(18),22(25)-tetrakis-3-(N-N-N-trimetilammonio)fenossi-ftalocianato Zn(II) cloruro

DOTAP: N-[1-(2,3 dioleoilossi)propil]-N,N,N-trimetilammonio cloruro

DPPC: DL- α -dipalmitoil-fosfatidil-colina

DMPC: L- α -dimiristoil-fosfatidil-colina

CD: ciclodestrina

SDS: sodio dodecil solfato

BHI: Brain Heart Infusion

BHA: Brain Heart Agar

DCIP: 2,6-diclorofenolindofenolo

PMS: fenazina metasolfato

D.O.: densità ottica

Tris-HCl: tris-(idrossimetil)amminometano cloridrato

TDPyP: 5-[4-(1-dodecanoilpiridinium)]-10,15,20-trifenil-porfirina

DMA: 9,10-dimetilantracene

¹O₂: ossigeno di singoletto

MRSA: *Staphylococcus aureus* meticillina-resistente

UFC: unità formanti colonia

NAD: nicotinaminadenin dinucleotide

NADH: nicotinaminadenin dinucleotide in forma ridotta

EDTA: acido etilendiamminotetraacetico

DTT: ditiotretitolo

DEVD-AFC: N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-AFC (7-amino-4-trifluorometil cumarina)

CPP32: 32-kDa cisteina proteasi

DEVD-CHO: N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-CHO (aldeide)

Pc: ftalocianina

LDH: lattico deidrogenasi

SDH: succinico deidrogenasi

NDH: NADH deidrogenasi

Scopo della tesi	1
Introduzione	3
1. Interazione tra luce e sistemi biologici	3
2. Principi di Fotofisica e Fotochimica	6
3. Fotosensibilizzazione in sistemi biologici	9
4. Agenti fotosensibilizzanti	12
5. Veicolanti di fotosensibilizzatori: caratteristiche chimico-fisiche	17
6. Interazione tra liposomi e fotosensibilizzatori	21
7. Fotosensibilizzazione di agenti patogeni	23
Materiali e metodi	39
1. Materiali	39
2. Colture cellulari	41
➤ cellule batteriche	41
➤ <i>Acanthamoeba palestinensis</i>	41
3. Preparazione dei liposomi	42
4. Studi spettroscopici	43
5. Anisotropia di fluorescenza	44
6. Prove di fotostabilità	46
7. Determinazione della resa quantica di generazione di $^1\text{O}_2$	47
8. Esperimenti di accumulo cellulare dei fotosensibilizzatori	48

➤ <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	48
➤ <i>Acanthamoeba palestinensis</i> : trofozoiti	49
➤ <i>Acanthamoeba palestinensis</i> : cisti	49
9. Esperimenti di fotosensibilizzazione	50
➤ cellule batteriche	50
➤ <i>Acanthamoeba palestinensis</i> : trofozoiti	50
➤ <i>Acanthamoeba palestinensis</i> : cisti	51
10. Attività enzimatica	51
➤ <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	51
➤ <i>Acanthamoeba palestinensis</i> : trofozoiti	52
11. Saggio di attività della CPP32 (CASPASI-3)	55
➤ <i>Acanthamoeba palestinensis</i> : trofozoiti	55
12. Analisi in microscopia	56
Microscopia Elettronica a Trasmissione	56
➤ cellule batteriche	56
Osservazioni in contrasto negativo	57
➤ <i>Acanthamoeba palestinensis</i> : trofozoiti	57
Microscopia in fluorescenza	58
➤ <i>Acanthamoeba palestinensis</i> : trofozoiti	58
➤ <i>Acanthamoeba palestinensis</i> : cisti	59
Risultati	61
1. Caratterizzazione spettroscopica dei fotosensibilizzatori	61
2. Fotostabilità	65
3. Misure di resa quantica di formazione di $^1\text{O}_2$	68
4. Misure di anisotropia di fluorescenza	68
5. Studi di accumulo	71

➤ <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	71
➤ <i>Acanthamoeba palestinensis</i>	74
6. Fotoinattivazione di microorganismi	75
➤ Cellule batteriche	75
➤ <i>Acanthamoeba palestinensis</i>	84
7. Attivita' enzimatiche	87
➤ <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	87
➤ <i>Acanthamoeba palestinensis</i>	88
Discussione	91
Conclusioni	101
Tavole	103
Bibliografia	117
Pubblicazioni	129

Scopo della tesi

Questa tesi si inserisce in un filone di ricerca finalizzato a definire la potenzialità ed il campo di applicazione della terapia fotodinamica (PDT) per il trattamento d'infezioni di origine microbica. I dati di letteratura sinora disponibili indicano come numerosi agenti patogeni vengano efficacemente inattivati per irradiazione con lunghezze d'onda dello spettro visibile, dopo incubazione con fotosensibilizzatori, soprattutto se caratterizzati dalla presenza di gruppi funzionali carichi positivamente: in particolare, l'attività antimicrobica risulta essere ottimale per derivati fotosensibilizzanti che appartengono alle classi delle fenotiazine, delle porfirine e loro analoghi (es. clorine e porfirceni), e delle ftalocianine. La PDT antimicrobica appare caratterizzata da un ampio spettro d'azione, è efficace sia su ceppi selvatici che antibiotico-resistenti, ed agisce con notevole selettività sui patogeni rispetto ai principali costituenti di tessuti ospiti.

Attualmente, la PDT antimicrobica si trova ancora in una fase sperimentale, ed i primi studi clinici di natura randomizzata sono stati avviati solo da alcuni mesi in alcuni centri europei. Esiste quindi la necessità di estendere ed approfondire il livello d'informazioni sinora esistenti in questo settore, anche per quanto riguarda specifici aspetti di base, quali la relazione tra struttura chimica del fotosensibilizzatore e attività fotocida o la definizione dell'insieme di parametri sperimentali che garantiscano un risultato clinico soddisfacente. Una serie di recenti indagini suggeriscono che il numero di agenti fotosensibilizzanti potenzialmente utilizzabili per l'inattivazione di batteri, funghi e protozoi può essere ampliato, e l'efficienza complessiva del fotoprocesso può essere esaltata attraverso l'associazione del fotosensibilizzatori stessi con opportuni veicolanti, come peptidi ed antibiotici.

Le nostre ricerche si sono focalizzate sull'uso di veicolanti di tipo liposomiale oppure ciclodestrinico per fotosensibilizzatori antimicrobici. Questo sviluppo non è stato ancora esplorato in letteratura, anche se l'incorporazione di fotosensibilizzatori in strutture lipidiche, come emulsioni oleose, liposomi o

micelle, ha consentito un significativo miglioramento della PDT per quanto riguarda la terapia di un vasto numero di tumori solidi. Essendo il nostro approccio privo di precedenti, è stato necessario prendere in considerazione un ampio numero di variabili, come la natura chimica del liposoma, il grado di fluidità e la temperatura di transizione di fase. Inoltre, l'azione potenziatrice od inibitrice della struttura lipidica sull'efficienza e sulla cinetica del processo di fotoinattivazione microbica è stata studiata utilizzando non solo fotosensibilizzatori cationici, ma anche fotosensibilizzatori che sono neutri od anionici a pH fisiologico. Particolare attenzione è stata dedicata all'effetto del veicolante liposomiale e ciclodestrinico sul grado di permeabilità della parete esterna, presente nelle cellule microbiche, che rappresenta un'efficace barriera, altamente organizzata, per proteggere i protoplasti o sferoplasti dall'azione di potenziali agenti citotossici. La presenza di tale elemento strutturale, in effetti, spesso inibisce l'attività fototossica di fotosensibilizzatori liberi; da questo punto di vista, l'utilizzazione di veicolanti in grado di aumentare la permeabilità della parete potrebbe consentire un salto di qualità per la PDT antimicrobica.

1. Interazione tra luce e sistemi biologici

Le lunghezze d'onda che raggiungono la superficie terrestre sono in grado di indurre diverse tipologie di risposte nei sistemi biologici. La regione infrarossa (900-4000 nm) dello spettro solare è importante per gli effetti termici; quella tra 220-900 nm produce eccitazione elettronica all'interno di una molecola ed è quindi, in grado di indurre reazioni chimiche che non sarebbero possibili per la stessa molecola nello stato fondamentale. Sotto l'aspetto fotobiologico, hanno particolare importanza le radiazioni di lunghezza d'onda superiore a 295 nm, in quanto quelle più energetiche, di lunghezza d'onda inferiore, sono intercettate dallo strato di ozono stratosferico, che circonda il nostro pianeta. L'energia che il sole esprime è dispensata sotto forma di radiazioni elettromagnetiche. Lo spettro solare che raggiunge la superficie della terra rappresenta una piccola frazione dell'energia emessa dal sole: ciò avviene per la presenza dell'atmosfera ed in particolare dello strato di ozono (O_3) nella stratosfera. Questo fondamentale agente fotoprotettivo agisce essenzialmente come filtro che assorbe le radiazioni al di sotto dei 295 nm. Esso si trova tra i 15 e 35 Km al di sopra del livello del mare e si forma a seguito della reazione dell'ossigeno con determinati raggi ultravioletti (RUV), gli UVC: quando gli UVC colpiscono una molecola di ossigeno (O_2) la scindono in due atomi di ossigeno ($O + O = 2O$) che si combinano rapidamente con altre molecole intatte di ossigeno (O_2) formando così ozono (O_3). La proprietà di questo gas di assorbire facilmente la luce ultravioletta fa sì che esso venga scisso nuovamente nelle due componenti (O_2 e O), in una sequenza continua di processi di dissociazione e formazione. Si crea così uno stato di stazionaria equivalenza tra i due processi con il risultato, in condizioni costanti, di una stabilizzazione dell'ozono.

L'ozono ha la proprietà di bloccare varie radiazioni (nocive per gli esseri viventi) con una banda di assorbimento molto forte tra 200 e 310 nm (banda di

Halery) e una più debole tra 310 e 350 nm (banda di Huggins). In particolare, sono bloccati gli UVC, raggi ultravioletti corti (190–290 nm) a grande energia, e le radiazioni a cortissima lunghezza d'onda (raggi X, raggi gamma e raggi cosmici), le quali, se non schermate, renderebbero impossibile qualsiasi forma di vita animale a causa della loro capacità di penetrare profondamente i tessuti. I tessuti biologici sono in grado di assorbire l'energia luminosa corrispondente a determinati intervalli di lunghezze d'onda, grazie alla presenza di cromofori endogeni. Il fenomeno dell'assorbimento è caratterizzato da un'elevata efficienza nella regione dell'UVB (250–320 nm) grazie alla presenza ubiquitaria di proteine contenenti aminoacidi aromatici (triptofano, tirosina e fenilalanina) ed acidi nucleici costituiti da basi puriniche e pirimidiniche. L'assorbimento nell'intervallo spettrale dell'UVA (320–400 nm) è da imputarsi fondamentalmente a cofattori enzimatici quali alcuni complessi con ioni metallici (es. Cu^+), il piridossale, il nicotinammide adenin nucleotide nella forma ridotta (NADH), flavine e chinoni. Nella zona del visibile (400–900 nm), l'assorbimento è, principalmente, dovuto a tetrapirroli a catena lineare come i pigmenti biliari, a tetrapirroli ciclici quali porfirine e clorine ed alla melanina. Le porfirine sono presenti nel gruppo prostetico dell'emoglobina e di alcune proteine con attività enzimatica come citocromi, catalasi e perossidasi, mentre le clorine, tetrapirroli ciclici parzialmente ridotti presenti in tessuti vegetali, sono soprattutto rappresentate dalle clorofille (Robbertecht, 1989) e dalle batterioclorine.

Porfirine e clorine, con coefficiente di estinzione molare dell'ordine di $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, presentano un'intensa banda di assorbimento attorno ai 400 nm (banda di Soret) dove assorbono, seppur con minor intensità, anche i carotenoidi (Krinsky, 1968).

La melanina, invece, che funge da filtro ottico protettivo contro eventuali effetti dannosi delle radiazioni luminose, assorbe a tutte le lunghezze d'onda, dell'UV e del visibile sebbene la probabilità di assorbimento decresca gradualmente al crescere della lunghezza d'onda.

Il verificarsi di processi fotobiologici in conseguenza dell'eccitazione elettronica indotta dall'assorbimento di un fotone dipende, oltre che dalle proprietà ottiche e dalla concentrazione del cromoforo, anche dalla capacità di penetrazione della

luce. Nei sistemi biologici la profondità di penetrazione luminosa dipende dall'interazione di tre fenomeni fisici:

- ▶ la riflessione dei fotoni incidenti sulla superficie
- ▶ la deviazione del raggio luminoso dalla direzione originaria di propagazione nel tessuto, senza contemporanea perdita di energia del fotone (scattering)
- ▶ l'assorbimento dei fotoni incidenti da parte di uno o più cromofori endogeni.

Il fenomeno della riflessione risulta, in prima approssimazione, indipendente dalla lunghezza d'onda, mentre i processi di scattering e di assorbimento vi sono strettamente correlati (Ishimaru, 1978). Il primo è determinato dalle dimensioni e dalla geometria delle particelle che interagiscono con i fotoni; nel caso di particelle con dimensioni minori o confrontabili con quelle della lunghezza d'onda (es. proteine e acidi nucleici confrontati con luce UV o visibile), lo scattering varia in maniera inversamente proporzionale alla quarta potenza della lunghezza d'onda. Per particelle di dimensioni superiori (cellule od organelli subcellulari) le relazioni matematiche diventano più complesse e l'entità del fenomeno dipende anche da fattori geometrici quali forma e orientamento; l'intensità del fenomeno, in ogni caso, diminuisce all'aumentare della lunghezza d'onda (Grossweiner, 1989).

Si può concludere che i sistemi biologici sono influenzati dalla luce visibile in quanto esistono alcuni cromofori che l'assorbono; la fotosensibilità viene ulteriormente esaltata in presenza di un adeguato fotosensibilizzatore, vale a dire un composto chimico, generalmente esogeno, ma talvolta prodotto metabolicamente nel determinato tessuto, che è in grado di assorbire specifici intervalli di lunghezza d'onda e di indurre modificazioni chimiche reversibili o irreversibili sui substrati biologici circostanti senza subire, a sua volta, modifiche chimiche, fatto che rende il processo fotosensibilizzato ripetibile ciclicamente. Il trasferimento di energia di eccitazione da parte del cromoforo a molecole non coinvolte nell'assorbimento diretto di radiazioni incidenti è definito fotosensibilizzazione (Spikes, 1989).

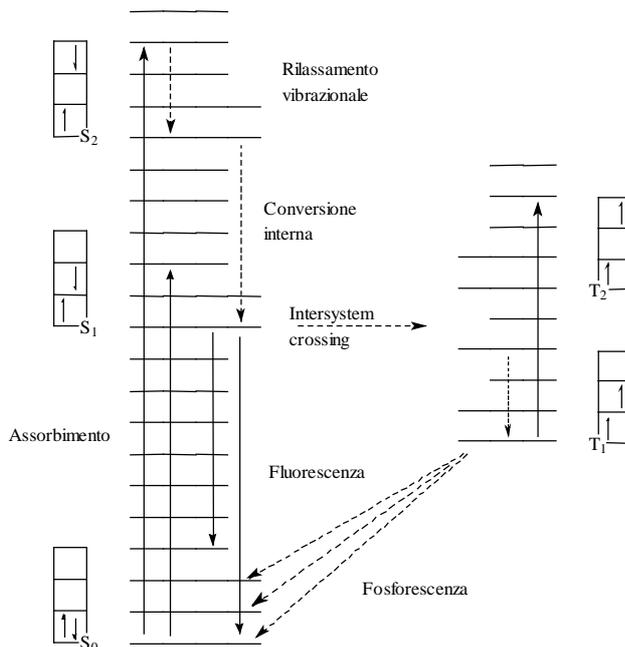
2. Principi di Fotofisica e Fotochimica

L'assorbimento di un fotone da parte di una molecola corrisponde alla transizione di un elettrone da un orbitale molecolare a più bassa energia ad uno con energia maggiore. In assenza di luce, gli elettroni occupano generalmente gli orbitali disponibili a minor energia (stato fondamentale della molecola) ed ogni orbitale contiene, al massimo due elettroni con spin antiparallelo (stato di singoletto). Poche molecole, tra cui l'ossigeno molecolare, possiedono gli elettroni più esterni distribuiti in due orbitali degeneri con spin paralleli e si trovano in quello che viene definito stato di tripletto.

L'assorbimento di un fotone promuove il passaggio di un elettrone ad un orbitale a più alto contenuto energetico senza cambiamento di spin, permettendo la transizione dallo stato fondamentale di singoletto ad uno stato di singoletto eccitato che ha un tempo di vita dell'ordine del nanosecondo. Da questo stato, la molecola torna allo stato fondamentale attraverso processi di conversione interna e di rilassamento vibrazionale

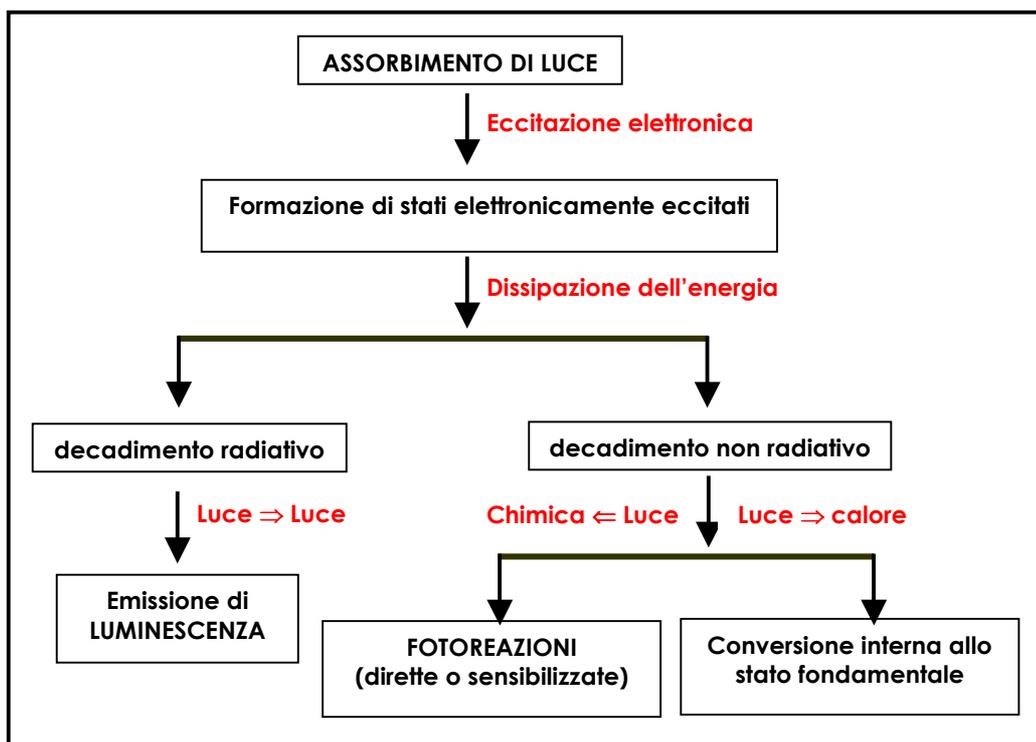
Il decadimento allo stato fondamentale avviene secondo tre possibili modalità (vedi diagramma di Jablonsky):

- via non radiativa cioè conversione interna (ic)
- via radiativa con emissione di fluorescenza (f)
- intersystem crossing con passaggio al primo stato eccitato di tripletto e inversione dello spin elettronico (ics)



-Diagramma di Jablonsky-

Dal primo stato eccitato di tripletto si può verificare il decadimento allo stato fondamentale per via radiativa e non radiativa (fosforescenza).



Tutti questi processi seguono cinetiche del primo ordine e la loro velocità è proporzionale alla concentrazione di molecole ancora presenti nello stato eccitato, secondo una costante di velocità, k , specifica per ogni processo.

Il parametro più significativo che regola la probabilità di un cromoforo di decadere, secondo i diversi modi (radiativi e non radiativi), è costituito dalla resa quantica: essa è il rapporto tra il numero di eventi relativi al processo considerato e il numero totale di fotoni assorbiti dalla molecola. La resa quantica è, equivalente al rapporto tra la costante di velocità, relativa ad un determinato processo di decadimento, e la somma di tutte le costanti di velocità tipiche dei processi che competono nella disattivazione di quel particolare stato eccitato.

Per es., la resa quantica di fluorescenza è descritta come:

$$\phi_f = k_f / (k_f + k_{ic} + k_{isc})$$

Dove k_f , k_{ic} e k_{isc} si riferiscono rispettivamente ai processi di decadimento per fluorescenza, conversione interna e intersystem crossing.

Un altro parametro importante è il tempo di vita di una molecola nello stato eccitato. Tale parametro è il reciproco della somma di tutte le costanti di velocità che intervengono nel decadimento di tale stato eccitato.

Il tempo di vita del primo stato eccitato di singoletto è:

$$\tau = 1 / (k_f + k_{ic} + k_{isc})$$

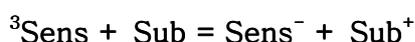
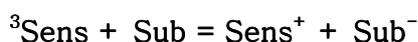
Di solito i tempi di vita del primo stato eccitato di singoletto delle molecole organiche e d'interesse biologico sono dell'ordine dei ns (10^{-9} - 10^{-8} ns) mentre i tempi di vita dello stato di tripletto sono generalmente più lunghi (10^{-3} s) in mezzi fluidi (Moan *et al.*, 1985), perché il ritorno delle molecole allo stato fondamentale implica un'inversione di spin elettronico ed è quindi una transizione generalmente proibita sulla base dei principi della meccanica quantistica.

Essendo la velocità di depopolamento dello stato di tripletto particolarmente lenta, il tripletto ha un'elevata probabilità di diffondere nelle zone circostanti il suo microintorno e di reagire con altre molecole. Per questo motivo il tripletto risulta il principale intermedio fotoreattivo (Jori, 1980).

3. Fotosensibilizzazione in sistemi biologici

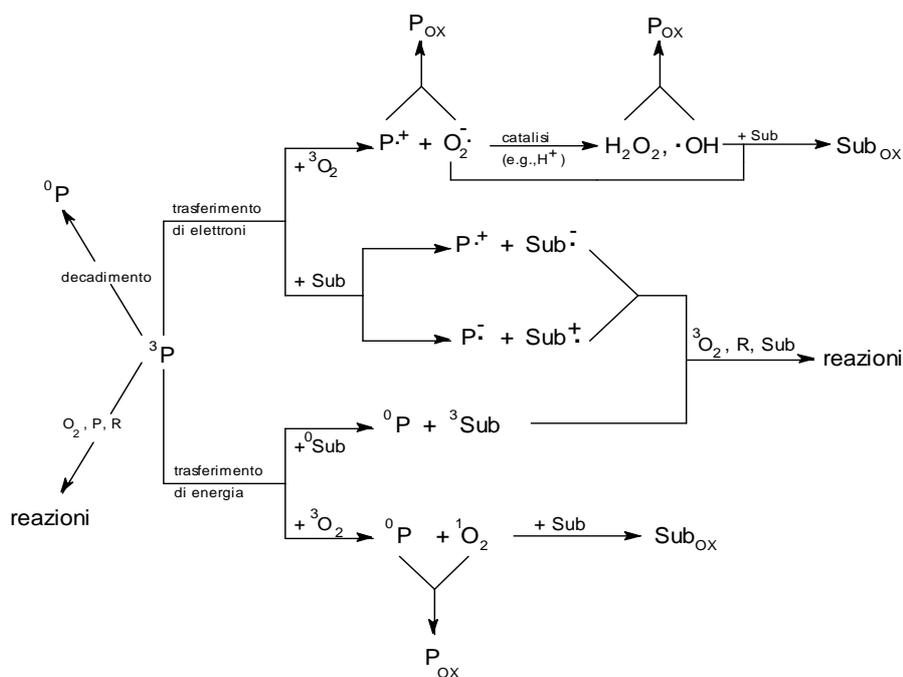
Moltissime molecole organiche e di origine biologica possono comportarsi da fotosensibilizzatori; poiché presentano una buona resa quantica di formazione di tripletto e un tempo di vita di questo stato eccitato relativamente lungo. Il tripletto svolge un ruolo predominante in queste reazioni che possono avvenire secondo due modalità:

- Meccanismo di tipo I: caratterizzato dal trasferimento di elettroni o atomi di idrogeno dal fotosensibilizzatore nello stato di tripletto (3P) verso il substrato o viceversa, seguita da reazioni redox la cui direzione dipende dal valore relativo del potenziale redox del tripletto del sensibilizzatore e del substrato. Ne risultano specie radicaliche in grado di interagire ulteriormente con altre molecole:



La direzione del trasferimento di elettroni dipende dal potenziale ossido-riduttivo delle specie coinvolte. A volte il trasferimento di elettroni può coinvolgere l'ossigeno molecolare con formazione dell'anione superossido, O_2^- , il quale può, in presenza di H^+ , dare origine ad altre specie altamente reattive come H_2O_2 e il radicale ossidrilico OH (Rodgers, 1985). Questo meccanismo si rivela efficiente ad alte concentrazioni di substrato ed a basse concentrazioni di ossigeno, in quanto l'ossigeno compete con il substrato per l'interazione con il

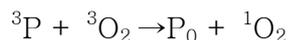
sensibilizzatore nello stato di tripletto. Se invece, gli elettroni o l'idrogeno sono trasferiti direttamente al substrato, quest'ultimo può reagire con l'ossigeno o con altre molecole di substrato, eventualmente generando un processo a catena. Questi eventi sono schematizzati nella seguente figura:



- Meccanismo di tipo II: avviene se il tripletto del fotosensibilizzatore trasferisce la sua energia all'ossigeno molecolare formando una specie ipereattiva, detta ossigeno di singoletto (1O_2) che è in grado di reagire efficientemente con substrati del suo microintorno. Affinché possa avvenire questo meccanismo è necessario che la differenza di energia tra stato fondamentale e tripletto eccitato del fotosensibilizzatore sia uguale o maggiore della differenza di energia tra lo stato fondamentale e lo stato eccitato dell'accettore. Per la maggior parte dei substrati biologici la fotosensibilizzazione mediante meccanismo di tipo II è poco probabile perché impedita da limitazioni energetiche. Infatti, mentre i più comuni fotosensibilizzatori, quali le porfirine, assorbono nel visibile ed hanno energie di tripletto relativamente basse (20-30 kcal/mole), i substrati biologici più comuni, quali amminoacidi, proteine ed acidi nucleici,

assorbono prevalentemente nell'ultravioletto ed hanno energie di tripletto più alte.

Nel processo di trasferimento di energia è, invece, frequentemente implicato l'ossigeno molecolare, che nello stato fondamentale è un tripletto e può accettare l'energia di eccitazione del fotosensibilizzatore passando al suo più basso stato eccitato, che è un singoletto, secondo la reazione:



Questa transizione richiede un'energia pari a 22.5 kcal/mole (Turro, 1978), quindi, la grandissima maggioranza dei fotosensibilizzatori possiede energie di tripletto sufficienti a promuoverlo.

L'azione combinata di fotosensibilizzatore, luce e ossigeno su di un substrato costituisce l'azione fotodinamica (Clare, 1956).

Reazioni di tipo I e II possono avvenire competitivamente; le loro velocità dipendono dalle rispettive costanti di velocità, dalla concentrazione del substrato e dalla concentrazione dell'ossigeno. Le costanti di velocità delle reazioni, inoltre, dipendono da fattori quali pH, polarità del mezzo di reazione e natura del mezzo, per cui è molto difficile prevedere l'efficienza relativa dei due meccanismi. In ogni caso, gli intermedi delle reazioni fotosensibilizzate, come specie radicaliche ed ossigeno di singoletto, possiedono uno spiccato carattere elettrofilo. Questo significa che tali intermedi sono particolarmente reattivi nei confronti di siti ricchi di elettroni, come substrati biologici che presentino elettroni π o elettroni di non legame. Di conseguenza, mono e polisaccaridi risultano relativamente inerti alla fotosensibilizzazione mentre particolarmente reattivi risultano alcuni amminoacidi quali triptofano, istidina, cisteina e metionina, gli acidi grassi insaturi e il colesterolo (Kessel, 1977). Tra le basi azotate degli acidi nucleici, le purine sono le più reattive ed in particolare la guanina è fotoossidata più rapidamente rispetto alle altre basi in condizioni fisiologiche (Krinsky, 1982). Le alterazioni chimiche a carico degli amminoacidi possono portare a variazioni conformazionali e strutturali delle proteine, con perdita dell'attività enzimatica od ormonale. I lipidi insaturi sono ossidati a livello dei doppi legami con formazione di endo e idroperossidi. Viceversa, a

livello di DNA e RNA, alcuni fotosensibilizzatori si possono intercalare e formare legami crociati.

Tutti questi substrati possono essere modificati sia secondo un meccanismo di tipo I che di tipo II; in alcuni casi la natura dei prodotti ottenuti è molto diversa e specifica a seconda del meccanismo di reazione. Un esempio tipico è il colesterolo, in cui l'attacco dell'ossigeno di singoletto avviene solo in posizione 5 con la formazione del 5 α -idroperossido; reazioni di tipo I portano, invece, ad una miscela di prodotti tra cui il 7 α e il 5 β -idroperossido ma non al 5 α -derivato (Clare, 1956).

4. Agenti fotosensibilizzanti

Un ideale sensibilizzatore che promuove l'azione fotodinamica dovrebbe possedere alcune importanti proprietà:

- ▶ elevato livello di purezza
- ▶ alto coefficiente di estinzione molare e assorbimento nella regione rossa della spettro
- ▶ alta resa quantica di formazione dello stato di tripletto con tempo di vita relativamente lungo (μ s) in modo da garantire un efficiente formazione di ROS (specie attivate dell'ossigeno)
- ▶ assenza di tossicità al buio
- ▶ notevole selettività di accumulo in una determinata cellula o tessuto onde orientare il fotoprocesso verso siti predeterminati.

La selettività di accumulo dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche del fotosensibilizzatore come il grado di lipofilicità e lo stato di aggregazione, ma anche dalla fisiologia e morfologia della cellula o del tessuto bersaglio. In generale, infatti, molecole liposolubili si accumulano e sono trattenuti con più efficienza, ad esempio, da tessuti neoplastici rispetto a quelli idrosolubili (Segalla *et al.*, 1997). Il motivo è da imputarsi al fatto che, le cellule tumorali presentano un maggior numero di recettori per lipoproteine a bassa densità

(LDLs) rispetto alle cellule normali. In seguito a somministrazione si ha formazione nel circolo sanguigno di un complesso fotosensibilizzatore-LDL che viene internalizzato dalla cellula neoplastica tramite endocitosi mediata da recettore (Soncin *et al.*, 1995), con conseguente accumulo selettivo del fotosensibilizzatore (Allison *et al.*, 1990; Allison *et al.*, 1991; Allison *et al.*, 1994)

Tra le prime molecole utilizzate come agenti fotosensibilizzanti di organismi viventi con luce visibile, vi furono alcuni agenti di origine naturale, come le porfirine. Le porfirine sono molecole aromatiche derivate dalla porfina la cui struttura base è costituita da un anello macrociclico tetrapirrolico (quattro anelli pirrolici legati da ponti metilici) a carattere aromatico con risonanza di 18 elettroni π delocalizzati; possono differire tra loro per i possibili sostituenti sulle posizioni 1-8 degli anelli pirrolici e/o sugli atomi di carbonio in posizione meso dei quattro ponti metilici (Jori, 1987) e per l'eventuale presenza di un metallo al centro della struttura planare, coordinato agli anelli pirrolici.

Le porfirine, come tutti i cromofori, subiscono un'eccitazione elettronica, in seguito all'assorbimento di un quanto di luce, passando dallo stato elettronico fondamentale ad un livello elettronico a più alta energia, il singoletto eccitato.

Le stesse porfirine potrebbero essere la causa degli effetti letali delle radiazioni UVA sulle cellule, come si è dimostrato con ricerche su ceppi superproduttori o difettivi nel metabolismo delle porfirine (Tyrrel e Keyse, 1990). Inoltre, è noto che nelle malattie chiamate porfirie e caratterizzate dall'accumulo di queste sostanze in fegato, cute e sangue, è presente anche una reazione di fotosensibilizzazione acuta in seguito all'esposizione alla luce (Jori e Spikes, 1984). Lo spettro di assorbimento di queste molecole presenta una banda di Soret molto intensa localizzata nell'intorno dei 400 nm e quattro bande più deboli nell'intervallo 500-650 nm. Le porfirine, quindi, presentano bande di assorbimento anche nella regione rossa (600-700 nm) dello spettro dove i cromofori endogeni (con l'eccezione della melanina) hanno un assorbimento trascurabile e i tessuti sono caratterizzati dal massimo di trasparenza; per queste ragioni le porfirine risultano essere fotosensibilizzatori ottimali per applicazioni in campo terapeutico. Sia le bande di assorbimento nel vicino UV

che quelle nel visibile sono attribuite a transizione elettroniche di tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, anche se è possibile un contributo da parte di transizioni $n \rightarrow \pi^*$. Una significativa frazione delle porfirine eccitate al primo stato di singoletto decade allo stato fondamentale con emissione di fluorescenza nella regione dello spettro compresa tra 600–750 nm. Tipicamente, la resa quantica di emissione di fluorescenza delle porfirine è compresa tra 0.1 e 0.3 (Reddi e Jori, 1988). Lo spettro di emissione è caratterizzato da due bande con massimi che per la posizione dipendono dalla struttura chimica e dal solvente. Dal primo stato di singoletto eccitato (tempo di vita dell'ordine di 10^{-9} s) la molecola va incontro ad un processo di decadimento non radiativo via intersystem crossing, che le fa assumere la configurazione elettronica di tripletto. Le porfirine sono, inoltre, caratterizzate da elevate rese quantiche di tripletto il cui tempo di vita è dell'ordine di alcune centinaia di microsecondi (Reddi *et al.*, 1983; Bonnet *et al.*, 1983).

Le porfirine attualmente utilizzate nella terapia fotodinamica (PDT) sono:

- l'ematoporfirina (HP);
- il suo derivato (HPD), ottenuto per trattamento di HP con una miscela di acido acetico e solforico;
- il Photofrin (PII), una forma parzialmente purificata di HPD

Si sono ottenuti risultati positivi nell'applicazione fototerapeutica dei suddetti composti, tuttavia l'efficacia è limitata da alcune caratteristiche intrinseche delle sostanze stesse:

- ▶ grado di purezza chimico limitato; in alcune porfirine ci possono essere contaminazioni pari al 10% (Atlante *et al.*, 1989; Ho *et al.*, 1990);
- ▶ ridotta selettività di accumulo in tessuti neoplastici rispetto alla maggior parte dei tessuti sani;
- ▶ accumulo di quantità apprezzabili di fotosensibilizzatore nella cute con conseguenti fenomeni di fotosensibilizzazione cutanea;
- ▶ accumulo di alcuni componenti delle preparazioni di HP e PII nel reticolo endoteliale che a lungo termine inducono effetti tossici;

- ▶ limitata efficienza di fotoinattivazione a basse dosi a causa della banda di assorbimento di minor energia con un massimo a 630 nm con coefficiente di estinzione molare inferiore a $10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Dougherthy, 1987).

Per ovviare a tali inconvenienti sono stati sintetizzati alcuni fotosensibilizzatori definiti di *seconda generazione*, caratterizzati da coefficienti di estinzione molare più elevati e da un maggior grado di purezza chimica.

Di questa classe fanno parte le clorine, le ftalocianine, le naftalocianine e i derivati della benzoporfirina.

Le ftalocianine (Pc) sono composti chimici derivati dalla condensazione ciclica di quattro unità isoindoliche legate tra loro da atomi di azoto; presentano una serie di caratteristiche vantaggiose come la semplicità di sintesi, la disponibilità di composti puri, la resistenza alla degradazione fotochimica e chimica e, infine, la non tossicità al buio alle dosi attive fototerapeuticamente (Ben Hur e Rosenthal, 1986).

Esse assorbono intensamente a lunghezze d'onda maggiori (650–750 nm) ed hanno una ϵ pari a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dovuta alla più estesa delocalizzazione degli elettroni π e, di conseguenza, ad un più marcato carattere aromatico. Le Pc possono formare complessi con ioni metallici (Al, Zn, Ga) (Darwent *et al.*, 1982) che non ne influenzano le proprietà spettroscopiche allo stato monomero, oppure esistere come basi libere; se prive di sostituenti periferici sono insolubili in solventi acquosi o in mezzi polari. Per ottenere derivati idrosolubili a pH fisiologico è sufficiente introdurre gruppi amminici, carbossilici o solfonici a livello delle posizioni periferiche del macrociclo. Le Pc idrosolubili mostrano una forte tendenza a formare aggregati relativamente stabili in sistemi acquosi, a causa del carattere idrofobico dell'anello tetraazaisoindolico con conseguente possibilità d'interazioni intramolecolari tra le nuvole elettroniche " π - π " delocalizzate sul macrociclo. Quest'aggregazione causa un allargamento delle bande di assorbimento, ipocromicità e diminuzione dell'attività fotosensibilizzatrice (Jori e Spikes, 1984; Spikes, 1986). Tutto ciò può essere evitato con l'aggiunta alle soluzioni acquose delle ftalocianine di solventi organici miscibili con acqua e a più bassa costante dielettrica come etanolo, metanolo o dimetilsolfossido, o mediante l'incorporazione delle ftalocianine

all'interno della matrice idrofobica di micelle o liposomi (Spikes e Bommer, 1986).

Il caratteristico picco di assorbimento delle ftalocianine in forma monomerica presenta: una banda di Soret attorno a 350 nm, una banda di bassa intensità attorno a 600 nm e uno stretto ma intenso picco di assorbimento, la banda Q, attorno a 670 nm.

Nel caso in cui le Pc dimerizzano o si aggregano, si può notare uno spostamento della banda di Soret verso lunghezze d'onda più corte e un allargamento della banda Q, con spostamento verso il blu di 30-50 nm.

Anche gli spettri di emissione di fluorescenza sono influenzati dal grado di aggregazione: in forma monomerica le Pc fluorescono intensamente attorno ai 680-690 nm, in forma aggregata non fluorescono in modo apprezzabile. Il tempo di vita di fluorescenza T_f della ZnPc monomerica varia da 3 a 3.5 ns, mentre quello della forma aggregata varia da 1.2-1.5 ns per i dimeri a 0.4-0.5 ns per le specie oligomeriche (Valduga *et al.*, 1992). In generale, le ftalocianine monomere possiedono una resa quantica di fluorescenza (ϕ_f) che varia tra 0.1 e 0.2. La resa quantica è abbassata dalla formazione di specie aggregate o dalla coordinazione di ioni metallici paramagnetici; infatti, complessi delle ftalocianine con ioni Cu (II) e Fe (III) presentano ϕ_f inferiore a 0.01.

Inoltre, allo stato monomero, le ftalocianine presentano rese quantiche di tripletto variabili tra 0.2 e 0.9.

L'aggregazione e la presenza di ioni paramagnetici influenzano sia la resa di formazione di tripletto che il suo tempo di vita. Infatti la CrPc e la CuPc hanno un τ_T estremamente breve (rispettivamente di 20 e 35 ns) e per questo non sono considerati buoni fotosensibilizzatori nonostante la ϕ_T molto elevata (Darwent *et al.*, 1982). Invece AlPc e ZnPc, che possiedono tempi di vita di tripletto di qualche centinaio di μ s, sono fotosensibilizzatori assai attivi pur avendo una resa quantica di tripletto più bassa.

L'energia posseduta dal tripletto delle ftalocianine oscilla tra 26-30 kal/mole, per cui le ftalocianine possono generare con elevata efficienza ossigeno di singoletto, che rappresenta l'intermedio reattivo probabilmente più importante nelle reazioni fotosensibilizzate. Studi condotti in diversi laboratori hanno

effettivamente dimostrato che solamente le ftalocianine monomere, che producono $^1\text{O}_2$ con rese quantiche elevate, hanno una buona attività fotosensibilizzatrice. In generale, la bassa resa di produzione di $^1\text{O}_2$ da parte delle forme aggregate è la conseguenza di forte diminuzione nel tempo di vita del tripletto (sino a valori inferiori al nanosecondo) rispetto alle corrispondenti forme monomere (Spikes e Bommer, 1986; Wagner *et al.*, 1987).

Le ftalocianine possono fotosensibilizzare efficacemente substrati modello ricchi di elettroni quali idrochinone, metilviologeno e dimetilfurano; inoltre, possono indurre la fotodegradazione di alcune classi importanti di biomolecole, tra cui amminoacidi (triptofano) e colesterolo (Spikes e Bommer, 1986). Nei casi finora studiati i danni maggiori a queste molecole biologiche sono dovuti all'ossigeno di singoletto. Per queste caratteristiche, le ftalocianine si sono rivelate validi fotosensibilizzatori di seconda generazione sia su cellule che su modelli tumorali (Selman *et al.*, 1986; Reddi *et al.*, 1990).

5. Veicolanti di fotosensibilizzatori: caratteristiche chimico-fisiche

Quando molecole di fosfolipidi sono disciolte in soluzione acquosa la condizione che corrisponde ad un minor contenuto di energia libera è la risultante di due fattori: un contributo entropico, che favorisce la massima dispersione delle molecole, un contributo entalpico dovuto all'idrofobicità delle code lipofile che tende a promuovere l'aggregazione. Il primo cresce con il logaritmo dell'attività del fosfolipide (in soluzione diluita l'attività corrisponde alla concentrazione); il secondo dipende direttamente dal numero d'interazioni idrofobiche cioè dalla quantità di sostanza disciolta nell'unità di volume. Se la concentrazione di molecole fosfolipidiche è sufficientemente diluita, esse esistono in uno stato disperso in soluzione acquosa. Al di sopra della concentrazione micellare critica CMC, il contributo entalpico diventa predominante e la tendenza delle code idrofobiche ad aggregarsi genera

vescicole di tipo unilamellare. Nella vescicola i lipidi sono disposti in due strati concentrici, così come nelle membrane cellulari. La membrana delimita un compartimento acquoso interno in equilibrio termodinamico con l'esterno. La tendenza dei lipidi all'aggregazione dipende dalla loro quantità, quindi, il numero e le dimensioni medie dei liposomi sono proporzionali alla concentrazione fosfolipidica usata. E', in effetti, possibile ottenere dispersioni acquose relativamente omogenee variando solo quest'ultimo parametro. Le dimensioni delle vescicole non possono, però, aumentare all'infinito; un ulteriore aumento della concentrazione lipidica porta alla formazione di liposomi definiti multilamellari (MLV), cioè di vescicole contenenti vescicole di dimensioni minori. Questa fase viene definita fase esagonale o fase micellare inversa. I sistemi più riproducibili sono i liposomi di tipo unilamellare che costituiscono un sistema polifasico complesso definito "microeterogeneo" e caratterizzato da:

- ▶ solvente acquoso esterno in cui sono dispersi i liposomi;
- ▶ fase lipidica costituita da liposomi separati ma strutturalmente omogenei;
- ▶ compartimento acquoso interno costituito dalla soluzione incapsulata dai liposomi, la cui composizione è, solitamente, identica a quella del solvente esterno.

Al compartimento acquoso interno sono associati due parametri importanti: il primo è l'efficienza d'incorporazione e rappresenta il rapporto tra la sommatoria dei volumi dei compartimenti interni dei vari liposomi ed il volume totale della fase acquosa interna ed esterna; il secondo è il volume catturato, che rappresenta il volume totale del compartimento interno che nei liposomi unilamellari è di circa 0.5 litri per mole di lipide.

Il doppio strato lipidico può esistere in due stati possibili, grazie all'equilibrio tra interazioni idrofobiche e movimenti termici: solido-cristallino e liquido-cristallino. Nel primo, caratteristico a basse temperature, la vescicola assume una conformazione estremamente rigida per la scarsa possibilità di diffusione laterale dei suoi componenti. A temperature maggiori rispetto a quella di transizione di fase (T_c) prevalgono i moti termici e conseguentemente interviene la fluidificazione del liposoma. La T_c varia a seconda del lipide utilizzato ed è proporzionale alla lunghezza della catena carboniosa. La presenza

d'insaturazioni nella coda idrofobica dei fosfolipidi modifica la situazione; la stereoisomeria di tipo trans tipica del doppio legame, infatti, riduce la superficie di interazione idrofobica tra le code. Come conseguenza si ha l'abbassamento della temperatura del punto di equilibrio e una fluidificazione della membrana. L'aggiunta di altre molecole si traduce in variazioni della T_c , che dipendono dal tipo di interazioni che si instaurano tra soluto e fosfolipide. Il colesterolo, ad esempio, aumenta l'idrofobicità e stabilizza il liposoma irrigidendolo; la cardiolipina, invece, agisce da fluidificante.

Un altro tipo di veicolante utilizzato in campo biomedico è costituito dalle ciclodestrine.

Le ciclodestrine (CD) hanno struttura tronco conico cava. In base al numero di monomeri: 6, 7, o 8 sono dette α -, β - o γ -CD. Le tre classi di CD differiscono tra loro per grandezza dell'anello e dunque dalla cavità e per la solubilità in acqua (Olvera *et al*, 2007). A temperatura ambiente, si presentano come una polvere bianca cristallina inodore dal sapore debolmente dolce. La cavità centrale è di natura idrofobica, mentre la parte esterna è idrofilica; tali proprietà dipendono dalla conformazione degli idrossili delle unità glucosidiche. Grazie a questa struttura le ciclodestrine sono in grado di ospitare nella loro cavità sostanze di natura lipofila formando complessi d'inclusione di tipo sopramolecolare. Le sostanze che si accomodano nella cavità delle ciclodestrine sono dette *guest*, mentre le CD stesse sono dette *host*, così come altre sostanze con comportamento simile. Tra le tre CD la più usata è la β , in quanto la α risulta avere una cavità troppo piccola, la γ invece risulta avere costi di produzione troppo elevati. La β -CD è meno idrosolubile rispetto alle altre due a causa dell'elevata tendenza con la quale forma dimeri, per questo sono state operate varie modifiche strutturali al fine di determinare un decremento della dimerizzazione e dunque un aumento della solubilità in acqua. La formazione di un complesso d'inclusione host/guest con ciclodestrine determina un miglioramento delle proprietà chimico-fisiche della sostanza inclusa e ne determina un notevole incremento della solubilità in acqua.

L'interazione di una ciclodestrina con un substrato avviene sulla base di processi simili a quelli che si osservano nelle proteine:

- ▶ esse infatti sono selettive nel riconoscimento di una molecola (la loro cavità ha una dimensione precisa e poco flessibile);
- ▶ il processo di riconoscimento è reversibile e non avviene mediante la formazione di legami covalenti;
- ▶ l'incorporazione è soggetta ad inibizione da parte di molecole che abbiano una maggiore affinità per la ciclodestrina del substrato stesso.

Le CD sono prodotte per degradazione enzimatica dell'amido, più precisamente dell'amilosio. L'enzima implicato in questo processo è la ciclodestrina glicosil transferasi (CGTase) prodotta da diversi bacilli (Villiers, 1981; Schardinger, 1903). Tale enzima esplica la sua azione rompendo la struttura elicoidale della macromolecola per dare l'anello ciclico; le spire d'amido vengono poi ricomposte tra di loro tramite un trasferimento di legami dando così luogo ad oligoglucosidi a corona (Saenger, 1980). Le ciclodestrine sono anche chiamate cicloamilosio, cicloglucani, ciclomaltoside o destrine da Schardinger. Le unità di glucosio costituenti le ciclodestrine sono in numero variabile da 6 a 12 conseguentemente alla provenienza dell'enzima CGTase da diverse tipologie di Bacilli. Quello impiegato attualmente per la produzione di CD è il *Bacillus Macerans* (Schardinger, 1911) che produce una miscela di α (60%), β (20%) e γ (20%) ciclodestrine oltre ad una piccola percentuale di composti con più di 8 unità glicosidiche (Bender e Kamiyama, 1978). Non si osserva la presenza di CD con meno di 6 unità a causa dell'impedimento sterico e della caratteristica struttura delle spire dell'amido. Questa struttura conferisce, alle CD particolari proprietà. Una densità elettronica elevata, causata dagli ossigeni glicosidici, determina una duplice caratteristica delle CD: carattere idrofobico apolare nella cavità e un carattere idrofilo all'esterno. La struttura macrociclica, l'idrofilia esterna e la cavità interna apolare conferiscono delle caratteristiche peculiari alle CD (Olvera *et al.*, 2007). Studi spettroscopici sulle CD in soluzione acquosa hanno evidenziato che la loro conformazione in soluzione è pressochè identica alla conformazione allo stato cristallino. Le CD sono stabili in soluzioni alcaline, tuttavia sono suscettibili all'idrolisi acida che porta alla formazione di glucosio e ad una serie di maltosaccaridi aciclici. La stabilità delle ciclodestrine all'idrolisi acida dipende dalla temperatura e dall'acidità; essendo composti ciclici, non

presentano unità terminali libere e per questo motivo sono più resistenti all'idrolisi acida rispetto agli analoghi composti lineari, come l'amilosio. La proprietà più caratteristica delle ciclodestrine è la loro notevole abilità a formare complessi d'inclusione con una grande varietà di molecole, dai composti organici e inorganici neutri o carichi ai gas nobili. La complessazione avviene con legami di tipo non covalente ed è possibile sia allo stato solido che in soluzione.

Le ciclodestrine "naturali" sono state ingegnerizzate con l'aggiunta di gruppi funzionali con geometria prestabilita per conferire diverse caratteristiche a seconda dell'utilizzo. Le nuove CD con diverso grado di idrofobicità sono macrocicli anfifilici che in solvente polare possono formare vari tipi di strutture quali monostrati lipidici, micelle o nanoparticelle. Le CD anfifiliche possono essere neutre, anioniche o cationiche.

Le CD utilizzate negli esperimenti sono le prime CD cationiche sintetizzate che formano in acqua vescicole a doppio strato. Sono state sintetizzate sulla base di una β -ciclodestrina "naturale" a cui sono stati aggiunti 7 gruppi alchilici identici (uno per glucosio) e 3 unità di etilen glicole (Donohue *et al.*, 2002).

6. Interazione tra liposomi e fotosensibilizzatori

Negli anni sessanta fu rivolta molta importanza a studi che riguardavano le proprietà dei sistemi acqua-lipidi come modelli di struttura di membrane biologiche. In un primo momento studi di tipo submicroscopico e sulle proprietà dinamiche come fluidità e transizione di fase furono portati avanti separatamente rispetto a quelli più classici che riguardavano la capacità di rilascio di farmaci da parte dei liposomi. Tutte queste proprietà lasciavano supporre un probabile utilizzo di queste applicazioni per studi *in vivo*.

Furono sviluppate molte procedure per la preparazione di liposomi ma poche di queste permettevano una buona resa di incorporazione di materiale idrofilico. Queste metodologie che comprendevano l'evaporazione, l'iniezione e il metodo freeze/thaw, portavano alla formazione di LUV, grandi vescicole unilamellari o

oligolamellari. Tutti questi protocolli richiedono che il materiale da incorporare sia disciolto in un solvente organico e una successiva sonicazione per produrre vescicole di dimensioni minori; entrambe queste necessità potevano essere dannose nel caso in cui il materiale da incorporare fosse particolarmente delicato come materiale proteico. I primi due metodi in particolare hanno una bassissima resa di incorporazione che non supera il 30%. Quando i lipidi si idratano e formano vescicole chiuse solo una piccola quantità di soluzione viene incorporata; per migliorare la resa di incorporazione, il maggior numero di molecole di soluto deve essere nell'intorno dei lipidi prima della formazione delle vescicole come nel metodo dell'iniezione. Utilizzando questa metodologia il diametro e l'eterogeneità dei liposomi ottenuti dipendono dalla concentrazione iniziale dei lipidi e dai volumi relativi acqua/alcool. Anche in questo caso la resa di incorporazione non è altissima e si ottiene una soluzione liposomica molto diluita. E', quindi, necessario un ulteriore stadio per rimuovere la sostanza non incapsulata e il solvente organico in cui questa era originariamente disciolta.

Un altro fattore fondamentale è la stabilità della soluzione liposomiale soprattutto per l'utilizzo *in vivo*. La stabilità dipende dai materiali utilizzati (farmaco e lipidi), dalla stabilità fisica del liposoma inteso come integrità del materiale incapsulato e dalla stabilità delle dimensioni della vescicola.

A seconda delle applicazioni, sono necessari differenti tipi di liposomi; il cambiamento della composizione lipidica e la carica elettrica alterano la distribuzione *in vivo* e la successiva clearance. I liposomi possono essere classificati come: LUV, grandi liposomi unilamellari, MLV, grandi liposomi multilamellari e SUV, piccoli liposomi unilamellari.

Questi ultimi, per le loro caratteristiche, sono di grande interesse in ambito farmaceutico, per la possibilità di rilascio controllato del farmaco poiché il loro target non è il reticolo endoteliale e per la lenta clearance dal circolo sistemico. Ognuna delle tre fasi liposomiali è in grado di ospitare molecole in maniera alquanto selettiva. In particolare i tetrapirroli idrofobici si concentreranno spontaneamente nella membrana mentre gli idrofilici si sistemano nella fase acquosa. L'aggiunta di composti polari prima della preparazione dei liposomi avrà come conseguenza la presenza di questi sia nella compartimento interno

che in quello esterno. Tramite dialisi a freddo ($T < T_c$) si allontana la frazione esterna modificando solo debolmente l'interna.

Inoltre, i due strati della membrana lipidica non sono perfettamente equivalenti: la curvatura fa sì che quello esterno abbia le code idrofobiche più vicine che non le teste polari, mentre nel monostrato interno si realizza una situazione opposta. All'interno della membrana sono stericamente distinguibili cinque zone. La prima di esse è la fascia delle teste polari esterne distanziate fra loro ed ospitanti molecole idrofiliche. In continuità con questa c'è la zona delle code idrofobiche del monostrato esterno che ospita molecole non eccessivamente idrofobiche. La relativa vicinanza delle code aciliche degli acidi grassi forma uno sbarramento debole ma reale verso la terza zona: lo spazio che separa i due monostrati. Questa è una fascia molto lipofilica in continuità con la successiva, quella costituita dalle code idrofobiche del monostrato interno. In questo settore andranno ad alloggiarsi le sostanze estremamente lipofiliche. La quinta ed ultima zona è costituita dalle teste polari del monostrato interno. L'aumento del raggio liposomiale porta alla diminuzione delle differenze steriche fra le due zone che ospitano le molecole idrofobiche.

Dall'interazione con il fotosensibilizzatore la vescicola potrebbe risultare notevolmente appesantita con cambiamento di viscosità e densità; mentre il fotosensibilizzatore risulta stabilizzato. Il vantaggio nell'uso dei liposomi, oltre al fatto di costituire ottimi veicolanti, sta nel fatto che un fotosensibilizzatore, anche ad alto grado d'idrofobicità, si trova nella forma monomera, la più attiva, anche in solvente acquoso.

7. Fotosensibilizzazione di agenti patogeni

L'utilizzo della terapia fotodinamica per il trattamento d'infezioni microbiche localizzate è attualmente in rapida espansione. In campo medico, il primo riferimento all'uso di questa tecnica risale a più di un secolo fa quando Raab (Raab *et al.*, 1900) riportò i risultati di uno studio su *Paramecium caudatum* trattato con acridina e luce visibile. Von Tappeiner (von Tappeiner, 1904)

attribuì, qualche anno dopo, quest'effetto all'azione combinata di un fattore fisico, la luce visibile, ed un fattore chimico, l'ossigeno e coniò il termine "fotodinamica". Per molti anni questa scoperta non fu sfruttata soprattutto per due ragioni; la prima è da attribuire alla non efficacia di questa tecnica, nella forma originaria, sui batteri Gram-negativi e su molti protozoi allo stadio cistico utilizzando fotosensibilizzatori tradizionali come xantene, acridina e porfirine anioniche utilizzate per il trattamento di tumori. La seconda motivazione fu che la scoperta degli antibiotici fece pensare ad una definitiva sconfitta di questi microorganismi. La successiva insorgenza dell'antibiotico-resistenza rese necessario lo sviluppo di terapie innovative ed efficaci. Una valida alternativa sembra essere rappresentata dalla terapia fotodinamica. Le caratteristiche principali di un buon fotosensibilizzatore oltre alle più comuni proprietà fotofisiche, come una buona resa quantica di formazione di tripletto e di produzione di ossigeno di singoletto dovrebbero essere:

- ▶ ampio spettro d'azione (batteri, funghi, lieviti e protozoi);
- ▶ efficacia indipendente dall'antibiotico resistenza;
- ▶ selettività di danno rispetto al tessuto o cellula ospite;
- ▶ mancanza di sviluppo di resistenza alla terapia fotodinamica;
- ▶ mancanza di mutagenicità;
- ▶ formulazione adatta per uno specifico rilascio nell'area infetta;
- ▶ attivazione da parte di sorgenti luminose a basso costo.

Cellule batteriche

Le cellule batteriche rappresentano utili modelli di studio per elevata variabilità strutturale, assenza di organelli e compartimentazione subcellulare e, soprattutto, alta velocità di replicazione. La dimensione di una cellula microbica varia tra 0.1 e 0.2 μm di diametro e, proprio questa caratteristica, è responsabile di molte delle loro proprietà biologiche. Ad esempio, la velocità con cui sostanze nutritive e prodotti di scarto fluiscono in entrambe le direzioni, un fattore che influenza la velocità del metabolismo cellulare e quello di crescita, è inversamente proporzionale alle dimensioni cellulari. La velocità di

trasporto, infatti, è funzione della superficie di membrana, e le cellule piccole ne hanno a disposizione una maggiore. Questo fattore si manifesta in genere con un tasso di sviluppo più rapido e con popolazioni microbiche più ampie in cellule più piccole che in cellule di dimensioni maggiori.

I batteri sono circondati da parete e membrana citoplasmatica, la prima previene la lisi osmotica e conferisce forma e rigidità, la seconda è responsabile del metabolismo cellulare con il trasporto di nutrienti. La membrana citoplasmatica è una struttura sottile (circa 8 nm), la sua distruzione comporta la diffusione all'esterno del citoplasma e la conseguente morte cellulare; è, inoltre, una barriera altamente selettiva che permette la concentrazione di composti metabolici all'interno e di sostanze di scarto all'esterno. La membrana è un doppio strato fosfolipidico che ingloba, al suo interno, varie molecole proteiche. La struttura della membrana citoplasmatica è stabilizzata da legami idrogeno e da interazioni idrofobiche. Inoltre, cationi, quali Mg^{2+} e Ca^{2+} , contribuiscono alla stabilizzazione grazie ad interazioni ioniche con le cariche negative dei fosfolipidi. La superficie della membrana rivolta verso l'ambiente esterno, è a contatto con una molteplicità di proteine che legano substrati o processano molecole di grandi dimensioni per il loro trasporto verso l'interno. La parte rivolta verso l'ambiente citoplasmatico, invece, interagisce con proteine coinvolte in reazioni energetiche e cellulari. Proteine a localizzazione periplasmatica o citoplasmatica possono essere strettamente associate alla superficie e funzionare come proteine di membrana e, di fatto, interagire con quest'ultime in importanti processi cellulari. Alcune sono lipoproteine e contengono all'estremità aminoterminale una coda lipidica che ancora la proteina alla membrana stessa. La membrana non rappresenta solamente una barriera di permeabilità, ma è anche sede di diverse proteine molte delle quali enzimi coinvolti in numerose reazioni e nel trasporto di sostanze. La concentrazione di soluti all'interno di una cellula sviluppa una notevole pressione che può raggiungere le 2 atmosfere. Per sopportare questa pressione i batteri sono dotati di una parete esterna che conferisce loro anche forma e rigidità. Nella parete vi è uno strato principale di peptidoglicano, costituito da due derivati polisaccaridici: N-acetilglucosamina e acido N-acetilmuramico e da un

piccolo gruppo di aminoacidi rappresentato da L-alanina, D-alanina, acido D-glutamico e lisina o, in alternativa, acido diaminopimelico (DAP). Questi costituenti sono assemblati in modo da formare un'unità di ripetizione, il glican tetrapeptide. Le catene di glicano formate da zucchero sono tenute insieme da legami crociati peptidici tra aminoacidi. I legami glicosidici che uniscono tra loro gli zuccheri nelle catene glicaniche sono molto forti, ma tali catene non sono sufficienti a conferire rigidità alla cellula in tutte le direzioni. La robustezza propria della struttura peptidoglicanica si ottiene soltanto quando queste catene vengono interlacciate tra loro da aminoacidi mediante legami crociati. La quantità di legami varia tra batteri diversi inducendo diversa rigidità, tanto più elevata quanto più sono numerosi. Nei batteri Gram-negativi questi sono rappresentati da un legame peptidico diretto tra il gruppo aminico dell'acido diaminopimelico e il gruppo carbossilico della D-alanina terminale. Nei Gram-positivi, i legami crociati sono costituiti generalmente da un ponte peptidico, mentre il tipo e il numero di legami variano in modo caratteristico tra diversi ceppi batterici. In *Staphylococcus aureus* ogni ponte peptidico è costituito da cinque molecole di glicogeno, collegate tra loro da legami peptidici.

La distribuzione subcellulare del fotosensibilizzatore è importante nel determinare il tipo di danno causato alle cellule, ma anche lo stato fisiologico di queste ultime può influenzarne la sensibilità. Microrganismi in fase logaritmica di crescita sono molto più fotosensibili di quelli in fase stazionaria, ma non è stato accertato se questo dipenda dal maggior contenuto di lipidi insaturi nella membrana che si riscontra in questa fase. La crescita di una popolazione batterica inoculata in un terreno fresco di solito non inizia immediatamente, ma dopo un periodo di tempo definito fase di latenza o "lag". Questa fase non compare se una coltura in fase esponenziale di crescita è inoculata in un terreno con la medesima composizione, ma se la coltura è in fase stazionaria vi sarà la presenza della fase "lag". Ciò è imputabile alla mancanza di quantità ottimali di coenzimi o di altri costituenti essenziali per la crescita da parte di cellule provenienti da una coltura in fase stazionaria e alla necessità di un periodo di tempo per la loro nuova sintesi. Una fase di latenza si osserva anche quando l'inoculo è formato da cellule danneggiate da trattamenti con calore, radiazioni,

agenti chimici, perché le cellule devono avere il tempo per riparare il danno subito. La fase esponenziale è conseguenza del fatto che ogni cellula si divide per formare due nuove cellule figlie capaci, a loro volta, di duplicarsi per formarne quattro, e così via. Le cellule in questa fase di crescita sono quelle che si trovano nel miglior stato di salute e solitamente sono usate per studi su enzimi o altri componenti. Dopo la fase esponenziale, subentra la stazionaria che è generalmente provocata dalla mancanza di nutrienti e dall'accumulo di prodotti di rifiuto riversati nel terreno dal microrganismo stesso. Oltre la fase stazionaria le cellule entrano nella fase di morte.

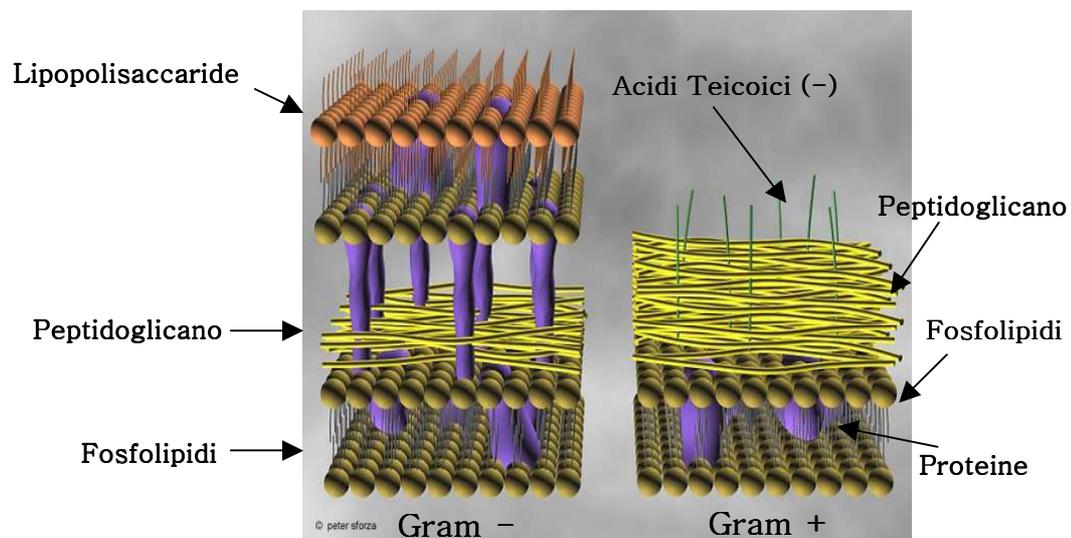
Un ruolo fondamentale nel processo di fotosensibilizzazione è giocato dalla struttura del rivestimento esterno. I batteri sono classificati in base alle caratteristiche di quest'ultimo che li rende più o meno sensibili alla fotoinattivazione.

I batteri, definiti Gram-positivi (violetti dopo colorazione di Gram), sono dotati di una parete esterna omogenea e spessa (20-80 nm); essa è formata da un numero variabile di strati di peptidoglicano (fino a 25) e costituisce 90% del peso secco del batterio. Molti batteri Gram-positivi possiedono all'interno della parete cellulare dei polisaccaridi acidi, gli acidi teicoici. Con questo termine si indicano tutti i polimeri della parete della membrana contenenti residui di glicerofosfato e ribitolfosfato. Questi polialcoli sono legati da esteri fosforici e sono generalmente associati ad altri zuccheri ed alla D-alanina. A causa della loro carica negativa gli acidi teicoici sono in parte responsabili della carica complessiva negativa della superficie cellulare e possono contribuire al passaggio di ioni attraverso la parete cellulare. Nei batteri Gram-positivi alcuni acidi teicoici contenenti glicerolo sono strettamente legati ai lipidi di membrana e vengono detti acidi lipoteicoici. La parete conferisce rigidità ma, essendo porosa, non agisce da filtro selettivo al passaggio di molecole esterne, come gliopeptidi e polisaccaridi con peso molecolare compreso tra a 30,000 e 60,000 Da, verso la membrana interna da cui è separata da uno spazio periplasmatico. Queste caratteristiche rendono i Gram-positivi una classe di batteri alquanto sensibile alla fotosensibilizzazione, poiché la maggior parte dei fotosensibilizzatori ha un peso molecolare intorno a 1,600 Da.

I batteri Gram-negativi (rosso-arancio dopo colorazione di Gram) sono dotati di uno strato di peptidoglicano più sottile e lasso (minor numero di legami crociati; 10% del peso secco) ma possiedono un ulteriore rivestimento: la membrana esterna. Il suo spessore è di circa 10-15 nm ed è costituita, oltre che da fosfolipidi, anche da polisaccaridi e proteine strettamente legati tra loro a formare specifiche strutture lipopolisaccaridiche. La porzione lipopolisaccaridica consiste di due frazioni, il polisaccaride interno o “core” polisaccaridico e il polisaccaride esterno, chiamato anche “polisaccaride O”. In *Salmonella*, dove è stato ben caratterizzato, il “core” polisaccaridico è costituito da chetodeossiottonato (KDO), zuccheri a sette atomi di carbonio, glucosio, galattosio, e N-acetilglucosamina. Strettamente connesso al “core” è il “polisaccaride O”, che contiene galattosio, glucosio, ramnosio e mannosio, nonché uno o più dideossizuccheri, quali abequosio, colitosio, paratosio e tivelosio. Questi zuccheri sono legati a formare catene da quattro o cinque elementi, spesso ramificate. La ripetizione delle catene di zuccheri porta alla formazione di un lungo polisaccaride esterno. La porzione lipidica del lipopolisaccaride, detta “lipide A”, non è costituita da glicerolipidi: gli acidi grassi sono legati tramite un legame estere-aminico ad un disaccaride costituito da N-acetilglucosamina fosfato. Il disaccaride è attaccato al polisaccaride esterno attraverso il KDO. Gli acidi che si trovano più comunemente nel “lipide A” comprendono gli acidi caproico, laurico, miristico, palmitico e stearico. Il lipopolisaccaride si associa a varie proteine e formare la metà esterna della membrana. Sul lato interno della membrana esterna di molti batteri Gram-negativi è presente un complesso lipoproteico costituito da una piccola proteina che svolge funzioni di ancoraggio tra membrana esterna e peptidoglicano. Sul lato interno sono presenti principalmente fosfolipidi, mentre su quello esterno vi è una maggior presenza di lipopolisaccaridi. Un'importante proprietà biologica della membrana esterna è la tossicità. Questa proprietà dipende dalla porzione rappresentata dal “lipide A” del lipopolisaccaride. A differenza della membrana citoplasmatica, quella esterna, pur essendo un doppio strato lipidico, è parzialmente permeabile a piccole molecole. Ciò avviene grazie alla presenza di piccole proteine chiamate porine, con funzione di canali; soluti con opportune

caratteristiche quali idrofilicità e peso molecolare inferiore ai 600–700 Da (Nikaido, 1989) sono in grado di perforarla. Studi ultrastrutturali hanno dimostrato che questi canali sono formati da tre subunità identiche associate a formare pori di circa 1 nm di diametro. Per azione delle porine, la membrana esterna risulta impermeabile ad enzimi e molecole di grandi dimensioni. Si ritiene, infatti, che una delle funzioni principali sia quella di impedire la diffusione all'esterno di alcuni enzimi a localizzazione periplasmatica. È noto come i batteri Gram-negativi abbiano una generalizzata resistenza alla fotosensibilizzazione probabilmente per la difficoltà di accumulo del fotosensibilizzatore a livello dei siti vitali.

Infine, vi è la classe estremamente sensibile alla fotosensibilizzazione grazie alla totale assenza di rivestimento esterno: i Mollicuti.



Grazie a studi citofluorimetrici si è dimostrato che la membrana esterna inibisce il legame dei fotosensibilizzatori con la membrana citoplasmatica, svolgendo così un'azione protettiva nei confronti di quest'ultima (Ehrenberg *et al.*, 1985). È, tuttavia, possibile aumentare la permeabilità della membrana esterna mediante pre-trattamento con:

- Tris-EDTA, che fa perdere ai batteri fino al 50% dei lipopolisaccaridi presenti nella membrana esterna a causa della potenziata repulsione elettrostatica tra queste molecole, dovuta alla rimozione di cationi divalenti che naturalmente la neutralizzano;
- Policationi (es., il nonapeptide polimixina B e oligomeri di lisina), che causano cambiamenti nella disposizione dei lipopolisaccaridi, poiché tendono a legarsi strettamente alla superficie cellulare spostando i cationi bivalenti;
- CaCl₂ associato a basse temperature, che comportano un aumento della permeabilità della membrana esterna, inducendo uno stato di “competenza artificiale”.

I batteri Gram-negativi sono, inoltre, più resistenti all'inattivazione dovuta all'esposizione diretta ad ossigeno di singoletto (generato in fase gassosa da un sensibilizzatore separato dal substrato) rispetto ai Gram-positivi. Mutanti “*deep rough*”, incapaci di sintetizzare tutti i componenti della membrana esterna, mostrano un'elevata mortalità se esposti alle stesse dosi di ossigeno di singoletto. È evidente, quindi, la funzione della membrana esterna nella fotosensibilizzazione dei batteri Gram-negativi come barriera per l'ingresso di molecole esogene come il fotosensibilizzatore e come “trappola” per gli intermedi reattivi generati durante l'irradiazione.

I passaggi richiesti per la fotosensibilizzazione fotodinamica sono, infatti, i seguenti:

1. localizzazione del fotosensibilizzatore sulla parete cellulare;
2. legame di questo alla membrana interna, che avviene al buio e senza apprezzabile tossicità per la cellula;
3. possibile sua traslocazione nel citoplasma;
4. fotoinattivazione

Il primo effetto di questo processo è il blocco immediato della sintesi di DNA e conseguentemente della sintesi proteica nonché il blocco di una serie di attività enzimatiche di membrana. La maggior parte delle cellule, inoltre, non è più in grado di completare la divisione (Malik *et al.*, 1982; Nitzan *et al.*, 1983). Studi

ultrastrutturali compiuti su cellule fotosensibilizzate con ematoporfirina o suoi analoghi hanno evidenziato un'alterazione della morfologia cellulare, con formazione di strutture multilamellari (mesosomi) vicino ai setti che separano le cellule in fase di divisione (Nitzan *et al.*, 1983; Bertoloni *et al.*, 1984; Malik *et al.*, 1988). All'interno di queste strutture sono stati identificati, colorando con rosso rutenio, composti precursori della parete (Malik *et al.*, 1988).

Sembra che le reazioni ossigeno-dipendenti, potenziate dalla fotosensibilizzazione tramite porfirina, possano indurre danni nella sintesi delle membrane e della parete.

Le ftalocianine, diversamente dalle porfirine, causano il fotodanno in altri siti intracellulari, come è stato dimostrato dalla fotosensibilizzazione di *Streptococcus faecium* e del lievito *Candida albicans* (Bertoloni *et al.*, 1992).

E' stato dimostrato come fotosensibilizzatori cationici (Merchat *et al.*, 1996; Minnock *et al.*, 1996) siano particolarmente indicati nella fotoinattivazione batterica dato l'elevato accumulo a livello di sferoplasti o protoplasti; probabilmente attratti dai gruppi anionici che si trovano esternamente allo strato di peptidoglicano.

Le membrane batteriche sono anche ricche di fosfolipidi anionici, come la fosfatidilserina ed il fosfatidilglicerolo, che contribuiscono ad un'interazione di tipo elettrostatico tra fotosensibilizzatore carico positivamente e membrana, meccanismo alla base del successivo effetto di perturbazione del doppio strato (Malik *et al.*, 1992). Un altro fattore importante per l'interazione è il valore del potenziale di membrana: un potenziale più negativo all'interno della cellula, tipico delle cellule batteriche (100-150 mV), facilita l'interazione del fotosensibilizzatore cationico con lo strato lipidico

Infatti, la diversa efficienza di fotoinattivazione batterica, da parte di porfirine cationiche, anioniche o neutre, non si può spiegare sulla base di proprietà fotofisiche, poiché tutte presentano simili rese quantiche di generazione di ossigeno di singoletto e simile fotostabilità (Merchat *et al.*, 1996). La mancata inattivazione dei batteri Gram-negativi ad opera di porfirine anioniche o neutre può invece essere spiegata con la loro scarsa affinità di legame con questo tipo di microorganismi (Ehrenberg *et al.*, 1985).

E' già stata spiegata l'importanza del legame del fotosensibilizzatore alla membrana citoplasmatica delle cellule stesse per la fotoinattivazione. Il successo della penetrazione del fotosensibilizzatore dipende dalla presenza o meno di una o più cariche positive che ne permettono l'interazione iniziale, di natura elettrostatica, con la membrana esterna. L'efficienza di fotoinattivazione da parte di porfirine e ftalocianine cationiche è anche dovuta al fotodanno primario, causato all'inizio dell'irradiazione, che provoca un aumento della permeabilità cellulare o della membrana citoplasmatica. Questo meccanismo aumenta la probabilità d'ingresso del fotosensibilizzatore, aumentandone, quindi, gli effetti.

La fotoinattivazione di microrganismi, quindi, può avvenire tramite due meccanismi: il primo è tipico dei batteri Gram-positivi ed è caratterizzato dalla traslocazione del fotosensibilizzatore alla membrana plasmatica interna dopo interazione elettrostatica con la parete esterna; per quanto riguarda i Gram-negativi vi è la presenza di uno stadio addizionale che prevede, dopo il legame al buio con la membrana esterna, l'alterazione fotoindotta di questa con aumento della sua permeabilità. La molecola raggiunge quindi la parete che possiede canali con filtro di maggiori dimensioni, quindi a questo livello la molecola può facilmente raggiungere la membrana interna sede di attività vitali per la cellula.

Protozoi

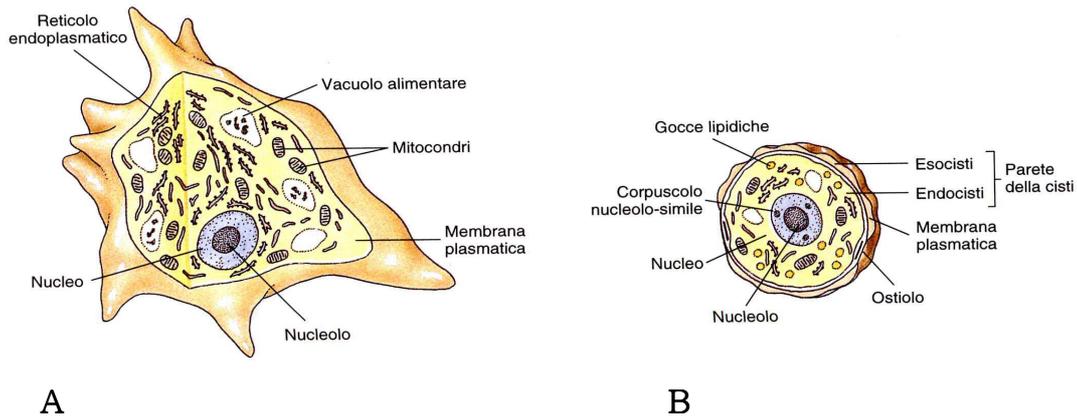
In passato il regno animale veniva suddiviso nei due sottoregni: Protozoa e Metazoa. In una classificazione degli esseri viventi nei due soli regni Animalia e Plantae, i Protozoi, con oltre 70000 specie viventi, rappresentano il gruppo più abbondante, sia come numero di specie che come biomassa. La loro principale importanza è legata al fatto che molti di essi sono parassiti o simbiotici di organismi pluricellulari e molti altri sono "consumatori" di batteri, dei quali possono controllare numero e massa. Tuttavia, la collocazione sistematica dei Protozoi, organismi eucariotici unicellulari, è attualmente oggetto di studi e continui aggiornamenti.

In seguito alle moderne tecniche di indagine biochimica e molecolare, la classificazione di tutti gli organismi unicellulari è, infatti, in una fase di profonda revisione. Anche i termini formali di alghe e di protozoi sono stati abbandonati nella classificazione moderna, sebbene per comodità continuano ad essere comunemente utilizzati anche da parte degli specialisti.

Ogni protozoo è un “organismo completo” in grado di svolgere tutte le funzioni vitali entro i confini della singola membrana citoplasmatica. Poiché la massa citoplasmatica non è suddivisa in cellule, i protozoi sono stati talora definiti “acellulari”, ma viene preferito il termine di “unicellulari” per sottolinearne le numerose somiglianze con le cellule degli animali “poliricellulari”. Come tutti gli eucarioti sono dotati di nucleo, rivestito da due membrane unitarie, al cui interno è riconoscibile un nucleolo contenente il materiale genetico. Nel citoplasma si trovano molti tipi di organelli: mitocondri, reticolo endoplasmico, apparato di Golgi e varie vescicole.

Molti protozoi sono tra i principali agenti eziologici di malattie letali per l'uomo. *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* e *Balantidium coli* sono, ad esempio, incapaci di sopravvivere al di fuori dell'ospite, ad esclusione dello stadio cistico, responsabile della trasmissione dell'infezione. Differenti specie di *Acanthamoeba* infettano il sistema nervoso centrale causando encefaliti granulomatose amebiche (GAE), soprattutto in individui immunocompromessi, e cheratiti anche in individui immunocompetenti (Martinez e Visvesvara, 1997; Marciano-Cabral e Cabral, 2003); è un organismo ubiquitario diffuso nel suolo e negli ambienti acquatici come: mare, piscine, acqua minerale, di uso domestico e in sistemi di aerazione. Questo protozoo è un parassita di tipo opportunistico che può penetrare nell'ospite attraverso varie vie. La via intranasale lo conduce direttamente al sistema nervoso centrale così come quella attraverso il tratto respiratorio; può anche penetrare attraverso abrasioni dermiche. La patologia assume un andamento cronico con peggioramento lento e progressivo e la diagnosi avviene solamente *post mortem* con analisi del tessuto cerebrale infetto. Il genere *Acanthamoeba* causa cheratiti soprattutto in individui con abrasioni corneali, primi fra tutti i fruitori di lenti a contatto. Il protozoo prolifera nelle soluzioni oftalmiche mantenute in scarsa igiene e può, quindi,

infettare l'occhio con l'applicazione della lente stessa. Come la maggior parte dei protozoi, anche *Acanthamoeba* ha un ciclo vitale che comprende uno stadio vegetativo (A) chiamato trofozoite, con dimensioni tra 25 e 15 μm , che si nutre e si divide per scissione binaria, e uno stadio cistico di resistenza (B).



I trofozoiti si nutrono di batteri, alghe e lieviti, ma possono assumere anche terreno liquido grazie a fenomeni di pinocitosi. La nutrizione è di tipo olozoico; l'assunzione di nutrienti può avvenire tramite fagocitosi o formazione di coppe alimentari. La particella di cibo viene inglobata ed è guidata tramite una vescicola intracellulare al vacuolo alimentare o fagosoma. I lisosomi, contenenti enzimi digestivi, si fondono col fagosoma e versano il loro contenuto al suo interno, iniziando la digestione. Via via che i prodotti digeriti vengono assorbiti attraverso la membrana, il fagosoma diventa più piccolo. Il materiale non digerito è rilasciato all'esterno, per esocitosi, quando il vacuolo alimentare si fonde nuovamente con la membrana citoplasmatica. Nella maggior parte dei ciliati il sito di fagocitosi è un'area specializzata della membrana chiamata citostoma, mentre nelle amebe può avvenire in qualsiasi punto della superficie cellulare per avvolgimento di una particella da parte degli pseudopodi. La locomozione avviene tramite la formazione di pseudopodi ialini, lobopodi rotondeggianti, con polimerizzazione di actina. L'area periferica e quella centrale del citoplasma appaiono distinte in ectoplasma ed endoplasma. L'endoplasma, in fase fluida di sol, appare più granulare e contiene il nucleo e gli organelli citoplasmatici. L'ectoplasma, in fase colloidale di gel, appare più

trasparente. La forma vegetativa è rivestita dalla sola membrana plasmatica al cui esterno si estende un ricco glicocalice. All'interno sono presenti vari tipi di organelli come: numerosi mitocondri, un grosso vacuolo alimentare e uno contrattile per l'osmoregolazione, complesso di Golgi, reticolo endoplasmico liscio e rugoso, nucleo e nucleolo e all'interno del citoplasma vi è la presenza di gocce lipidiche e granuli di glicogeno. I vacuoli contrattili, così come tutti gli altri organelli nelle amebe, non occupano una posizione fissa all'interno del citoplasma, sono formati dalla fusione di piccole vescicole che lo raggiungono e vi scaricano il loro contenuto acquoso. Quando il vacuolo si riempie fonde la propria membrana con quella superficiale e svuota il contenuto all'esterno. L'escrezione di rifiuti metabolici (azoto e ammoniaca), invece, avviene esclusivamente per diffusione attraverso la membrana, così come la respirazione. Lo stadio cistico sopraggiunge in condizioni ambientali sfavorevoli come mancanza di nutrienti, siccità e cambiamenti repentini di temperatura e pH. Durante l'incistamento la cellula crea intorno a sé due spesse pareti (ecto- ed endo-cisti), la cui continuità è interrotta solamente in due o tre punti chiamati ostii, chiusi da una struttura fibrillare, che prende il nome di *operculum*. L'esocisti ha uno spessore compreso tra 120 e 150 nm, ed è costituita principalmente da polisaccaridi anche se, in alcune specie, vi è la presenza di chitina (Arroy-Begovich *et al.*, 1980; Das e Gill, 1991; Coppi ed Eichenger, 1999). Nel genere ameba è stata identificata una glicoproteina con domini che legano chitina (Frisardi *et al.*, 2000), notevoli quantità di cellulosa (Blanton e Villemez, 1978; Tomlinson e Jones, 1962) e proteine insolubili agli acidi (Neff e Neff, 1969). Tutti i polisaccaridi contenuti nelle pareti cistiche hanno una configurazione a foglietto β e presentano una fluorescenza positiva con il sodio calcofluor white m2r che reagisce specificatamente con i polimeri in questa conformazione come la cellulosa (Maeda e ishida, 1967; Arroy-Begovich *et al.*, 1978; Chàvez-Munguía *et al.*, 2003, 2005). Durante l'incistamento, i costituenti della parete sono concentrati e trasportati in specifiche vescicole di diametro tra i 100 e i 900 nm che contengono materiale fibrillare (Chàvez-Munguía *et al.*, 2005); questo materiale è depositato sulla membrana plasmatica dopo l'apertura delle vescicole. In un primo momento, si ha la formazione di

quelle che sono definite cisti immature, provviste, cioè, di una sola parete; successivamente a questa si aggiunge un secondo strato e la cisti viene definita matura. Dopo trattamento con calcofluor m2r si può notare una fluorescenza sia nelle vescicole sia nella parete bistratificata soprattutto per quel che riguarda l'ectocisti; questo dato suggerisce che nelle vescicole sono contenuti i precursori di parete. Recentemente, analisi cinetiche hanno rivelato che le vescicole di incistamento originano dalle cisterne del reticolo endoplasmico, indicando una nuova via di secrezione nella quale il reticolo endoplasmico e le cisterne del Golgi colocalizzano (Lanfredi-Rangel *et al.*, 2003). In questo stadio, di dimensioni inferiori ai 10 μm , la cellula non si nutre, dato che nessuna molecola può attraversare la doppia parete, e può rimanere latente fino a 25 anni, indifferente agli insulti esterni come biocidi, clorurazione e antibiotici. Il disincistamento è provocato dall'aggiunta di terreno fresco alla coltura cistica alla temperatura ottimale di crescita di 30°C. Durante questa fase sono visibili nel citoplasma, mediante microscopio elettronico a trasmissione, molti granuli elettrondensi del diametro di circa 30–50 nm (Rodanelli *et al.*, 1965; Sbata, 1985; Martinez-Palomo *et al.*, 1987), a cui sono correlate molte attività di tipo proteolitico (Leon *et al.*, 1997). Questi granuli sono associati, in particolare, allo strato più interno della membrana plasmatica, nella regione vicina all'ostiolo; possono presentare una regione centrale più chiara che indica l'inizio di una parziale digestione del contenuto dei granuli stessi. Sebbene la liberazione di questi granuli non sia mai stata osservata in amebe che conducono vita libera, sono presenti grossi vacuoli citoplasmatici contenenti materiale fibrillare e granuli densi (Chávez-Munguía *et al.*, 2005). Durante questo processo sembrano coinvolte fosfatasi lisosomiali acide collocate nelle vescicole periferiche, che provocherebbero la defosforilazione di proteine di parete (Slavin *et al.*, 2002). Data la spiccata capacità di fagocitosi delle amebe non stupisce il fatto che porzioni di parete cistica siano ingerite dal trofozoite emergente o dallo stadio metacistico. Le amebe a vita libera formano strutture di endocitosi nella zona che circonda l'*operculum*. Quando il cappuccio è rimosso, il protozoo spinge attraverso l'apertura opercolare i suoi pseudopodi (Chávez-Munguía *et al.*, 2005) ed emerge lasciando il guscio cistico vuoto (Chambers e Tompson, 1972).

La terapia antimicrobica per questa categoria d'infezioni rappresenta solitamente una terapia combinata poiché molti farmaci hanno spesso attività amebostatica, ma non amebicida (Marciano-Cabral e Cabral, 2003). E' indispensabile lo sviluppo di terapie alternative in campo medico e ambientale per il controllo di questi protozoi patogeni (Khan, 2003). Dati di letteratura hanno dimostrato (Dutta *et al.*, 2005) l'efficacia della fotosensibilizzazione con Al-ftalocianina per la cura di patologie causate dal flagellato *Leishmania amazonica*, parassita nell'uomo di molti tipi di cellule eucariotiche nelle forma sia amastigote che promastigote. In particolare, sono stati trattati, con la terapia fotodinamica, pazienti affetti da leishmaniosi, malattia cutanea causata da tripanosomi del genere *Leishmania*. Questo parassita è trasmesso da un dittero ematofago del genere *Phlebotomus*. All'interno dell'ospite definitivo può vivere nei fagolisosomi dei macrofagi mononucleati. Anche in questo caso, il decorso della malattia è cronico. Lo sviluppo di resistenza a farmaci e antibiotici è ben documentato in letteratura ed ha portato all'uso di tecniche alternative come la crioterapia (Asilian *et al.*, 1991) con risultati solo nel 30% dei casi, la termoterapia (Reithinger *et al.*, 2005) con effetti collaterali nell'80% dei casi e, infine, la terapia fotodinamica che sembra indurre, *in vivo*, la morte selettiva della forma amastigote presente all'interno dei macrofagi (Gardlo *et al.*, 2003). Anche nel caso del protozoo responsabile della malaria, *Plasmodium falciparum*, è stata comprovata (Smith *et al.*, 1992) l'efficacia della terapia fotodinamica utilizzando Merocianina 540 illuminata da luce rossa (600-700 nm). Le cellule ematiche infettate dal parassita mostrano un legame maggiore con il fotosensibilizzatore, forse per gli importanti e drastici cambiamenti che il protozoo provoca a livello della membrana plasmatica dell'eritrocita. Nel caso di *Plasmodium falciparum* è risaputo (Clark *et al.*, 1989) che i suoi stadi eritrocitari sono particolarmente sensibili agli stress ossidativi e quindi a tutti i ROS e all'¹O₂, che, anche in questo caso, gioca un ruolo fondamentale nell'inattivazione del patogeno.

1. Materiali

La clorofilla *a* (Chl) è stata acquistata dalla Sigma-Aldrich in forma pura; la concentrazione è stata determinata mediante spettrofotometria di assorbimento in soluzione di dimetilformammide (DMF) utilizzando un ϵ pari a $68,693 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 410 nm (λ_{max}). Il suo peso molecolare è pari a 893.5.

L'ematoporfirina (HP) è stata fornita dalla ditta Frontier Scientific (Logan, Utah) sotto forma di polvere cristallina con una purezza pari al 90% in base all'analisi mediante HPLC. La concentrazione della porfirina è stata determinata in soluzione di etanolo assoluto utilizzando un coefficiente di estinzione molare (ϵ) pari a $140,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 410 nm (λ_{max}). Il suo peso molecolare è pari a 598.7.

La porfirina monocationica 5-[4-(1-dodecanoilpiridinium)]-10,15,20-trifenilporfirina (TDPyP) è stata sintetizzata dall'Istituto di Metodologie Chimiche del CNR, Università La Sapienza, Roma. La sua concentrazione è stata determinata utilizzando un coefficiente di estinzione molare (ϵ) pari a $176,570 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 416 nm (λ_{max}) in etanolo. Il suo peso molecolare è pari a 784.

La ftalocianina tetracationica RLP068 1(4),8(11),15(18),22(25)-tetrakis-3-(N,N,N-trimetilammonio)fenossi-ftalocianato Zn(II) cloruro con un peso molecolare pari 1686.33 è stata fornita dalla ditta Molteni Farmaceutici (Firenze, Italia); la sua concentrazione è stata determinata utilizzando un coefficiente di estinzione molare (ϵ) pari a $195,930 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 693 nm (λ_{max}) in DMF.

I lipidi monocationici N-[1-(2,3 dioleoilossi)propil]-N,N,N-trimetilammonio cloruro (DOTAP), come pure DL- α -dipalmitoil-fosfatidil-colina (DPPC) e L- α -dimiristoil-fosfatidil-colina (DMPC) sono stati acquistati dalla ditta Sigma-Aldrich.

Le ciclodestrine cationiche $\text{SC}_6\text{NH}_3\text{Cl}$ sono state fornite da Dott. A. Mazzaglia dell'Istituto per lo Studio dei Materiali Nanostrutturali (SMN-CNR), Università di Messina. Le strutture dei veicolanti utilizzati sono mostrati in tabella 1. Il sodio

dodecilsolfato (SDS) è stato acquistato dalla ditta Merck (Darmstadt, Germania); Brain Heart Infusion (BHI) e il Proteoso Peptone dalla DIFCO (Mayland, USA), il 2,6-diclorofenolindofenolo (DCIP) dalla Prolabo (Parigi, Francia). La fenazinametasolfato (PMS), il NADH, la Fosfolipasi A₂, l'Antimicina A e il lisozima dalla Sigma-Aldrich. Il kit per il dosaggio delle proteine mediante il metodo dell'acido bicinconinico (BCA) è stato acquistato dalla Pierce (Illinois, USA). Il kit ApoAlert CPP32 contenente i reagenti per il saggio dell'attività della caspasi-3 è stato acquistato dalla Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, California).

Tutti i sali e solventi utilizzati erano prodotti commerciali di grado analitico.

DPPC	
DMPC	
DOTAP	
α -CD	
SC ₆ NH ₃ Cl	

Tabella 1: Strutture dei veicolanti utilizzati:

- liposomi di DL- α -dipalmitoil-fosfatidil-colina (DDPC)
- liposomi di L- α -dimiristoil-fosfatidil-colina (DMPC)
- liposomi di N-[1-(2,3 dioleoilossi)propil]-N,N,N-trimetilammonio cloruro (DOTAP)
- α -ciclodestrina naturale
- β -ciclodestrina cationica SC₆NH₃Cl

2. Colture cellulari

➤ cellule batteriche

I batteri utilizzati erano rappresentati da un ceppo Gram-positivo, e precisamente *Staphylococcus aureus* MRSA (meticillina-resistente), ceppo 110 e da un ceppo Gram-negativo, *Escherichia coli* ceppo 04. Le linee batteriche sono mantenute in capsule Petri contenenti terreno agarizzato (BHA) a 4°C e trasferite ogni venti giorni.

A 24 h dall'esperimento era prelevata una colonia dalla linea cellulare e seminata in BHA a 37°C. Le cellule batteriche, in fase stazionaria, sono raccolte, passate in BHI precedentemente incubato a 37°C, e sedimentate mediante centrifugazione a 1650xg per 15 min. Il sedimento era poi lavato due volte mediante successive centrifugazioni e risospensioni con una soluzione salina tamponata con fosfato a pH=7.4 (PBS 10 mM). Infine era misurata la torbidità della sospensione cellulare, che veniva diluita in modo da ottenere una densità ottica (D.O) di 0.7 a 650 nm, che corrisponde ad una concentrazione di circa 5×10^8 cellule batteriche per ml; la soluzione viene ulteriormente diluita sino ad ottenere una concentrazione di 2×10^8 cell/ml

➤ *Acanthamoeba palestinensis*

Il ceppo axenico di *A. palestinensis* definito CCAP 1547/1 è stato acquistato dalla Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP, Ambleside, UK). La linea

cellulare è mantenuta a 15°C, temperatura a cui la fissione binaria è rallentata, in terreno liquido ricco contenete 1.5% di proteoso peptone (Difco, Detroit) e 1.8% di glucosio. Le cellule trattate sono, invece, mantenute a 30°C, valore di temperatura più favorevole alla loro crescita.

Per indurre l'incistamento, cellule in fase logaritmica di crescita sono trasferite in terreno povero di Neff (Neff *et al.*, 1964) contenente: KCl 0.1 M, TrisHCl 0.02 M, MgSO₄ 8 mM, CaCl₂ 0.4 mM e NaHCO₃ 1 mM con pH 8.9-9. La soluzione è mantenuta sotto agitazione circolare a 30°C in una beuta per 4 giorni. A questo punto la popolazione cistica risulta abbastanza omogenea e può essere utilizzata per le analisi.

3. Preparazione dei liposomi

Le vescicole unilamellari di liposomi DOTAP, DPPC, DMPC aventi un diametro di circa 100 nm sono preparate mediante iniezione etanolica secondo il metodo di Kremer (Kremer *et al.*, 1977), co-solubilizzando in etanolo la porfirina o clorina con il fosfolipide desiderato. In una tipica preparazione, 0.75 ml di questa soluzione sono iniettati in 10 ml di PBS 10 mM a pH 7.4, alla temperatura di 20°C per i DOTAP, di 37°C per i DMPC e di 56°C per i DPPC, vale a dire temperature superiori alla rispettiva temperatura critica. A temperatura ambiente, i primi due liposomi si presentano in forma fluida, mentre le vescicole di DPPC sono in fase gel. La sospensione liposomiale ottenuta è dializzata contro PBS per 3 h.

Per la formazione dei complessi di ciclodestrina SC₆NH₃Cl con un diametro di circa 20 nm, la polvere è stata pesata e sciolta in cloroformio con la desiderata concentrazione di porfirina (il rapporto molare è 1:10). La soluzione è fatta evaporare ed il sedimento così ottenuto è risospeso in tampone fosfato PBS e sonicato per 10 minuti. Sono stati effettuati gli spettri di assorbimento e fluorescenza per accertarsi della monomericità del composto.

4. Studi spettroscopici

Gli spettri di assorbimento dei fotosensibilizzatori nei loro solventi, in soluzione acquosa contenente PBS e incorporati nei tre diversi tipi di liposomi, sono stati ottenuti con uno spettrofotometro Perkin-Elmer, modello Lambda 2, utilizzando cuvette di quarzo con cammino ottico pari a 1 o 0.5 cm. L'emissione di fluorescenza è stata misurata mediante uno spettrofotofluorimetro Perkin-Elmer, modello MPF4. I campioni erano eventualmente diluiti fino ad ottenere un'assorbanza inferiore a 0.1 alla lunghezza d'onda di eccitazione al fine di minimizzare l'insorgere di artefatti ottici conseguenti alla netta sovrapposizione tra banda di assorbimento e di fluorescenza. Le soluzioni da analizzare erano poste in cuvette di quarzo con cammino ottico di 1 cm ed eccitate con luce di appropriata lunghezza d'onda (400 nm per HP, TDPyP e Chl e 630 nm per RLP068). La fluorescenza è stata registrata nell'intervallo spettrale compreso tra 630 e 700 nm.

La resa quantica di fluorescenza della ftalocianina è stata ottenuta in seguito ad eccitazione in stato stazionario utilizzando la Zn(II)-ftalocianina (ZnPc) come riferimento (R), mentre per le porfirine è stata utilizzata come riferimento l'ematoportirina, ed applicando la seguente formula

$$\phi_s = (F_s \cdot A_r \cdot \eta^2 / A_s \cdot F_r \cdot \eta_0^2) \phi_r$$

ove A_s ed A_r rappresentano, rispettivamente, le assorbanze alla lunghezza d'onda di eccitazione delle soluzioni dei campioni e del riferimento. F_s ed F_r rappresentano, rispettivamente, l'area dello spettro di emissione di fluorescenza dei campioni e del riferimento (ZnPc; HP).

η è l'indice di rifrazione del solvente utilizzato

η_0 è l'indice di rifrazione del solvente (etanolo) utilizzato per il riferimento.

ϕ_r è la resa quantica di fluorescenza del riferimento in etanolo ed è uguale a 0.2 per ZnPc (Valduga *et al.*, 1987) ed a 0.1 per HP (Reddi e Jori, 1988).

5. Anisotropia di fluorescenza

La tecnica di polarizzazione o anisotropia di fluorescenza può dare indicazioni molto utili sulla struttura e dinamica di proteine e membrane lipidiche, mediante lo studio dei moti Browniani, in particolare dei movimenti rotazionali delle molecole.

Nonostante sia un metodo di analisi indiretto, esso presenta diversi vantaggi rispetto alle altre tecniche spettroscopiche, come l'alta sensibilità e l'immediata interpretazione dei dati. Nello studio di membrane biologiche, lo svantaggio principale dipende dall'alta eterogeneità dei domini di membrana per cui l'informazione ottenuta è da considerarsi una media di diverse situazioni strutturali. Infatti, nella maggior parte dei sistemi biologici a temperature fisiologiche, i lipidi si trovano nello stato fluido definito "liquido cristallino" ma alcuni agglomerati (cluster) possono esistere in una conformazione rigida, simile ad un gel solido. Domini lipidici eterogenei si osservano anche in membrane modello, in particolare quando nella preparazione vengono utilizzati lipidi diversi. L'interpretazione dei dati può essere facilitata usando sonde fluorescenti diverse che, in base alla loro caratteristica di idro/lipofilità, si distribuiscono in domini specifici di membrana (Szöllősi, 1994)

In soluzione, le molecole di un fluoroforo si trovano in una disposizione casuale (random), in cui le possibili direzioni di rotazione sono ugualmente rappresentate (distribuzione isotropica dei fluorofori). In presenza di luce polarizzata si assiste ad una fotoselezione di molecole, cioè sono eccitate solo quelle molecole che hanno una determinata direzione rispetto al piano di polarizzazione della luce (distribuzione anisotropica). E' noto, infatti, che l'assorbimento e l'emissione della luce da parte di molecole organiche sono collegati con direzioni fisse delle molecole stesse, i cosiddetti oscillatori di assorbimento e di emissione, e che le molecole hanno una buona probabilità di assorbire la luce di eccitazione solo se la direzione del loro oscillatore di assorbimento è parallela, o quasi, al piano di vibrazione della luce eccitante.

Ciascuna molecola fotoselezionata riemette poi una radiazione polarizzata in un piano parallelo all'oscillatore di emissione. Se nell'intervallo di tempo che

intercorre tra eccitazione e emissione le molecole si riorientano in modo random, la fotoselezione sarà persa e non si osserverà polarizzazione. Se, invece, tale intervallo è abbastanza breve, le molecole fotoselezionate si possono trovare in una posizione non completamente casuale. Si potrà allora osservare un certo grado di polarizzazione. Il grado di polarizzazione della fluorescenza dipende, quindi, da due fattori: l'intervallo tra eccitazione ed emissione (tempo di vita dello stato eccitato) e la velocità di rotazione della molecola in soluzione (tempo di rilassamento rotazionale). In soluzione acquosa, a temperatura ambiente, non si osserva generalmente polarizzazione di fluorescenza. Un fluoroforo incorporato in una proteina o in uno strato lipidico, per esempio, subisce una serie di restrizioni rotazionali dovute a tale legame e il suo tempo di rilassamento segue essenzialmente quello più lungo della macrostruttura incorporante. In questo caso l'emissione di fluorescenza può risultare parzialmente polarizzata. La polarizzazione aumenta con l'aumento della viscosità del sistema e con l'abbassamento della temperatura, in seguito al rallentamento dei moti Browniani. A causa delle caratteristiche della fotoselezione, l'emissione è in qualche modo proporzionale anche al grado di ordine (anisotropia) e quindi alla rigidità del sistema.

Le misure di anisotropia di fluorescenza sono state effettuate con uno spettrofotofluorimetro Perkin-Elmer LS 50 munito di termostato Haake DC3, provvisto di polarizzatori incorporati e collegato ad un computer che esegue automaticamente gli spettri e i calcoli dei vari componenti dell'anisotropia. Il valore di anisotropia (r) è definito come:

$$r = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + 2GI_{VH})$$

Il campione viene illuminato con luce polarizzata linearmente, che vibra in un piano verticale (V) al piano di propagazione (H) del raggio luminoso. La luce di emissione parzialmente polarizzata viene analizzata osservandone l'intensità attraverso un polarizzatore lineare orientato in due direzioni: un'orientazione parallela (I_{VV}) e un'orientazione perpendicolare (I_{VH}) al piano di vibrazione del raggio luminoso. Poiché elementi strumentali non riflettono in misura uguale le

componenti perpendicolare e parallele della luce di emissione, è necessario introdurre un fattore correttivo (G) che è calcolato utilizzando luce di eccitazione polarizzata orizzontalmente.

6. Prove di fotostabilità

La fotostabilità delle molecole è stata valutata in soluzione di PBS e in sospensione acquosa di liposomi. A tal fine, i campioni sono stati irradiati per determinati tempi d'irradiazione ed è stata seguita la diminuzione di assorbanza in corrispondenza del picco di massimo assorbimento.

In questi esperimenti, i vari fotosensibilizzatori liberi o veicolati in liposomi sono stati posti in una cuvetta di quarzo con cammino ottico pari ad 1 cm, e sotto agitazione magnetica, sono stati irradiati, per diversi intervalli di tempo, compresi tra 0 e 30 min.

La luce utilizzata aveva una lunghezza d'onda compresa tra 600 e 700 nm per la ftalocianina o pari a 400 nm per porfirine e clorine, e l'irradiazione veniva effettuato ad una velocità di fluenza pari a 50 o 100 mW/cm², utilizzando una sorgente luminosa (Teclas, Lugano, Svizzera) costituita da una lampada ad alogeni munita di filtro ottico a larga banda.

A tempi prefissati la soluzione veniva prelevata ed era eseguito uno spettro di assorbimento nell'intervallo tra 300 e 850 nm mediante uno spettrofotometro Perkin-Elmer modello Lambda 2. La fotostabilità veniva determinata misurando il calo di assorbanza in prossimità del massimo del monomero rispetto al valore di assorbanza misurata al t=0.

7. Determinazione della resa quantica di generazione di ossigeno di singoletto

La resa quantica di produzione di ossigeno di singoletto da parte dei vari fotosensibilizzatori utilizzati è stata valutata in vitro seguendo la fotoossidazione del substrato modello 9,10-dimetilantaracene che reagisce con questa specie reattiva dell'ossigeno dando luogo alla produzione di 9,10-endoperossidi con efficienza di "quenching" chimico paria al 100% (Gross *et al.*, 1992).

Le soluzioni sottoposte a questo tipo di studio contenevano una concentrazione di DMA pari a 10 μM in metanolo o N,N-dimetilformammide e una concentrazione dei fotosensibilizzatori tale da avere un'assorbanza pari a 0.2 al massimo di assorbimento. La soluzione era posta in una cuvetta di quarzo con cammino ottico pari a 1 cm, e veniva irradiata sotto agitazione magnetica per vari intervalli di tempo ad una velocità di fluenza pari a 100 o 50 mW/cm^2 con luce di lunghezza d'onda pari a 400 nm per porfirine e clorine ed a 600–700 nm per quanto riguarda la ftalocianina.

La resa quantica di formazione di $^1\text{O}_2$ è stata valutata seguendo la diminuzione di fluorescenza del DMA in funzione del tempo d'irradiamento. Le misure di fluorescenza sono state effettuate eccitando la soluzione a 360 nm e, osservando l'emissione nell'intervallo spettrale tra 380 e 550 nm.

La costante di velocità, per la fotoossidazione del DMA, (che segue una cinetica di primo ordine) è uguale alla pendenza della retta ottenuta mettendo in grafico il $\ln F_0/F$ in funzione del tempo d'irradiamento espresso in secondi. F_0 ed F rappresentano, rispettivamente, l'intensità di emissione di fluorescenza al tempo 0 e al tempo t d'irradiamento (Gross *et al.*, 1992).

La costante viene convertita in resa quantica di produzione di ossigeno di singoletto confrontando le costanti di fotoossidazione dei campioni con quella di riferimento: Zn(II)-ftalocianina, per quanto riguarda la RLP068, la cui resa quantica di produzione di $^1\text{O}_2$ è stata misurata essere pari a 0.55 (Valduga *et al.*, 1992); ematoporfirina, per quanto riguarda le porfirine e clorine, la cui resa quantica è uguale a 0.67 (Lambert *et al.*, 1986).

8. Esperimenti di accumulo cellulare dei fotosensibilizzatori

➤ *Staphylococcus aureus* MRSA

L'accumulo delle diverse sostanze è stato studiato in cellule di *S.aureus*, ceppo MRSA 110. Per questi esperimenti, le cellule sospese in 5 ml di PBS alla concentrazione di 10^8 - 10^9 cell/ml erano incubate al buio, a temperatura ambiente, fino a 2 h, con diverse concentrazioni di fotosensibilizzatore libero o incorporato in liposomi. Terminato il periodo di incubazione, le cellule sono state sedimentate e risospese in 0,5 ml di sodio dodecilsolfato (SDS) al 2% o lavate da 1 a 3 volte in PBS prima della sedimentazione. Dopo 24 h è stata determinata la quantità di fotosensibilizzatore legata al lisato cellulare mediante analisi spettrofotofluorimetrica. A tale scopo un'aliquota del lisato era diluita con SDS al 2% in modo tale da ottenere soluzioni con una assorbanza inferiore a 0.1 alla lunghezza d'onda di eccitazione ed a quella corrispondente al massimo di assorbimento dei fotosensibilizzatori utilizzati. Le misure di fluorescenza sono state effettuate registrando lo spettro di emissione dopo eccitazione con luce a lunghezza d'onda adeguata. Successivamente, è stata misurata l'intensità del massimo di emissione di fluorescenza e la concentrazione è stata calcolata mediante interpolazione con una retta di taratura costruita misurando l'intensità di fluorescenza di soluzioni a concentrazione nota di sostanza in SDS al 2%. Un'altra aliquota dei lisati cellulari è stata utilizzata per determinare la concentrazione delle proteine mediante applicazione del saggio dell'acido bicinconinico (Smith *et al.*, 1985). In questo modo è stato possibile esprimere la quantità di fotosensibilizzatore legato alle cellule come: (nmoli di fotosensibilizzatore)/(mg di proteine cellulari).

Distribuzione subcellulare

E' stata determinata la distribuzione subcellulare di fotosensibilizzatore dopo aver frazionato le cellule in protoplasti e parete. Un pellet di 5×10^8 cellule batteriche, dopo incubazione, è risospeso in 1 ml di una soluzione contenente

Tris-HCl 0.05 M, pH 7.2; saccarosio 0.5 M, acetato di magnesio tetraidrato 0.01 M e 1 mg/ml di lisozima. Dopo 70 minuti d'incubazione sotto agitazione magnetica a 37°C e 30 minuti a 4°C, le cellule sono state sedimentate a 2933xg per 10 min. I pellets, contenenti i protoplasti, sono stati risospesi in 1 ml di SDS al 2%, mentre il surnatante (1 ml circa), contenente le pareti, è stato diluito con 2 ml di SDS al 3%. Entrambe le soluzioni sono state analizzate allo spettrofotofluorimetro per valutare la quantità di sostanza legata ai due distretti cellulari (Merchat *et al.*, 1996).

➤ ***Acanthamoeba palestinensis*: trofozoiti**

A 24 h dall'esperimento, le cellule seminate in fiasche sono state staccate utilizzando un raschietto sterile, contate, utilizzando una camera di Burker e seminate in dischetti del diametro di 35 mm contenenti 2×10^5 cellule per ml (2 ml totali) in terreno fresco. Per il trattamento, è stato rimosso il terreno fresco dai dischetti e sostituito con PBS contenente la concentrazione desiderata del fotosensibilizzatore; questa soluzione è stata incubata per un massimo di 1 h. Quindi la soluzione è stata rimossa e il monostrato è stato sciacquato con PBS. Le cellule sono state staccate con un raschietto sterile e passate in un tubo per la successiva centrifugazione (1115xg per 10 min). Il pellet è stato risospeso, con 1 ml di SDS 2% e, dopo 18 h a temperatura ambiente, analizzato allo spettrofotofluorimetro; anche in questo caso la concentrazione è stata calcolata mediante interpolazione con una retta di taratura costruita misurando l'intensità di fluorescenza di soluzioni a concentrazione nota di sostanza in SDS al 2%. La quantità di sostanza è stata riferita al numero di cellule presenti nel controllo.

➤ ***Acanthamoeba palestinensis*: cisti**

Per gli accumuli a livello delle cisti è stata utilizzata la metodologia già descritta per i trofozoiti, ad eccezione dell'incubazione che è stata eseguita in sospensione. Anche in questo caso, la quantità di ftalocianina recuperata è stata riferita al numero di cellule contenute nei campioni.

9. Esperimenti di fotosensibilizzazione

➤ cellule batteriche

La soluzione di fotosensibilizzatore, libera od incorporata in veicolanti, è stata diluita in PBS fino ad un volume di 2 ml a cui veniva aggiunto un eguale volume di sospensione di cellule batteriche (1×10^8 cell/ml). La sospensione così ottenuta veniva lasciata incubare con il fotosensibilizzatore per diversi tempi (5 min–2 h), poi irradiata per 30 minuti ad una velocità di fluenza pari a 100 o 50 mW/cm² mediante lampada Teclas. Ogni 5 minuti è stata prelevata un'aliquota di 100 µl che era seminata in piastre di BHA. I batteri di controllo, incubati ma non irradiati, e quelli non incubati e non irradiati, venivano diluiti in modo seriale e piastrati nello stesso modo. Le capsule Petri erano mantenute a 37°C per 18–24 h, quindi si procedeva al conteggio delle colonie per calcolare le unità formanti colonia (UFC/ml).

➤ *Acanthamoeba palestinensis*: trofozoiti

A 24 h dall'esperimento, le cellule seminate in fiasche sono state staccate con un raschietto sterile, contate, utilizzando una camera di Bunker, e seminate in dischetti (35 mm di diametro) contenenti 1×10^5 cellule per ml (2 ml totali) in terreno fresco. Per il trattamento veniva rimosso il terreno fresco dai dischetti e sostituito con PBS contenente la concentrazione desiderata del fotosensibilizzatore; questa soluzione è stata incubata per un massimo di 1 h, quindi veniva rimossa, il monostrato era sciacquato con PBS contenente ioni calcio e magnesio e irradiato per 10 minuti ad una velocità di fluenza di 50 mW/cm² (600–700 nm).

Dopo irradiazione, il PBS era rimosso e sostituito con terreno fresco; le cellule sono state tenute a 30°C per 24 h, quindi si procedeva alla conta cellulare con il saggio di esclusione dell'eosina.

➤ *Acanthamoeba palestinensis*: cisti

Gli esperimenti di fotoinattivazione sono stati condotti su una soluzione contenente 1×10^5 cisti per ml, che era stata incubata con la ftalocianina (0.5–5 μM) per 1 h. Al termine dell'incubazione, le cisti sono state centrifugate (1150xg per 10 min) e lavate con PBS. Si è quindi, proceduto all'irradiamento per 10 o 20 min a 50 mW/cm^2 (600–700 nm). Dopo irradiamento, le cisti sono state sedimentate e, infine, risospese in terreno fresco e seminate in dischetti posti a 30°C per 5 giorni. Il quinto giorno veniva eseguito il test di esclusione dell'eosina con la conta cellulare per determinare la percentuale di disincistamento dei trofozoiti.

10. Attività enzimatica

➤ *Staphylococcus aureus* MRSA

E' stata studiata l'attività di due diversi enzimi di membrana nei protoplasti lisati.

Dopo incubazione di 5×10^8 cellule per 5 min con una soluzione contenente TDPyP, libera o incorporata in liposomi cationici DOTAP, alla concentrazione di 5 μM , le cellule venivano centrifugate (1650xg per 10 minuti) e poste in soluzione di lisi contenente: Tris-HCl 0.05M pH 7.2; saccarosio 0.5 M; $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01 M e 1 mg/ml di lisozima.

Dopo 70 minuti d'incubazione sotto agitazione magnetica a 37°C e successiva incubazione per 30 minuti a 4°C , le cellule sono state sedimentate a 2933xg per 10 min. I pellets erano risospesi in 0.5 ml di H_2O e sonicati per 5 minuti fino a lisi completa.

Lattico deidrogenasi NAD-indipendente

L'attività di quest'enzima è stata valutata secondo un protocollo (Santos e Kaback, 1986) che prevedeva l'utilizzo di: 800 µl di Tris-HCl 0.05 M, pH 7.2, contenente NaCl 0.1 M, 20 µl di DCIP (2.9 mg/ml), 100 µl di PMS (0.75 mg/ml) con l'aggiunta di 50-75-100 µl di proteine cellulari.

Al tempo 0 sono stati introdotti 200 µl di una soluzione di lattato di sodio 0.05 M. La reazione enzimatica, corrispondente alla riduzione del DCIP, è stata seguita spettrofotometricamente attraverso la diminuzione di assorbanza a 600 nm.

Succinico deidrogenasi

Il protocollo da noi utilizzato (Osborn et al., 1972) prevedeva l'utilizzo di: 950 µl di Tris-HCl 0.05 M, pH 7.2, contenente NaCl 0.01 M, 13.3 µl di DCIP (2.9 mg/ml), 13.3 µl di PMS (1.5 mg/ml), 31.7 µl di KCN (6.86 mg/ml) e proteine batteriche in quantità compresa tra 50 e 100 µl. Al tempo 0 sono stati aggiunti 50 µl di succinato di sodio (153.1 mg/ml). La riduzione del DCIP è stata seguita a 600 nm.

La velocità iniziale delle reazioni enzimatiche è stata misurata per diverse concentrazioni di proteina, calcolate mediante applicazione del saggio dell'acido bicinconinico. E' stata verificata l'esistenza di una relazione lineare tra le velocità iniziali misurate e la quantità di proteina utilizzata per i saggi. La pendenza della retta di regressione rappresenta una misura del contenuto enzimatico dell'estratto cellulare ed è definita come attività enzimatica specifica. L'attività enzimatica (µmoli di DCIP ridotto/min/mg di proteina) è stata espressa come percentuale dell'attività enzimatica misurata nei controlli.

➤ *Acanthamoeba palestinensis*: trofozoiti

Per valutare i danni indotti a livello subcellulare dopo trattamento di fotosensibilizzazione sono state valutate le attività di tre enzimi, due

mitocondriali (NADH e succinico deidrogenasi) e uno citoplasmatico (lattico deidrogenasi).

Le cellule seminate in dischetti sono state incubate per 20 minuti con RLP068 2 μM e irradiate per 10 min a 50 mW/cm^2 (600–700 nm); le cellule erano quindi staccate, raccolte e centrifugate (1150xg per 10 min). Il pellet contenente le cellule era posto a -20°C per 10 min e poi in terreno di lisi contenente: Tris HCl 50 mM; KCl 100 mM; EDTA 1 mM per 2 h, le cellule sono state nuovamente centrifugate (1150xg per 10 min) e risospese in 1 ml di acqua e sonicate per 10 minuti.

NADH deidrogenasi

Il protocollo da noi utilizzato (Galante *et al.*, 1978) prevedeva l'utilizzo di: 40 μl di K_2HPO_4 1 M pH 7.5; 60 μl di CaCl_2 750 μM in H_2O ; 5 μl di fosfolipasi A_2 (1 mg/ml) in H_2O /glicerolo (1:1, v/v); 25–125 μl di lisato cellulare. La miscela di reazione era portata ad un volume finale di 0.85 ml con H_2O . La reazione è stata innescata per aggiunta di 100 μl di $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10 mM in H_2O e 50 μl di NADH 15 mM in H_2O . La diminuzione di assorbanza a 410 nm dovuta alla riduzione del $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ è stata seguita per 3 minuti a 37°C . Le misure di assorbanza sono state effettuate contro una soluzione priva di $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e NADH e portata a 1 ml con H_2O . La velocità di riduzione del $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ espressa in $\mu\text{moli/min}$ era calcolata utilizzando un coefficiente di estinzione molare pari a $1000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 410 nm. L'attività della NADH deidrogenasi è stata espressa come $\mu\text{moli di } \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 \text{ ridotto/min/mg}$ di proteina dopo aver misurato le concentrazioni di proteine cellulari dei campioni utilizzati.

Succinico deidrogenasi

I lisati cellulari sono stati ottenuti utilizzando il protocollo descritto precedentemente. Per questo saggio (Akrely *et al.*, 1978) sono state preparate le seguenti soluzioni: 750 μl di K_2PO_4 200 mM pH 7.4; $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_4$ 200 mM in K_2HPO_4 200 mM; KCN 100 mM in H_2O ; 60 μl di CaCl_2 7.5 mM in H_2O ; 2 μl di Antimicina A 110 mg/ml in H_2O ; 5 μl di fosfolipasi A_2 (1 mg/ml) in H_2O /glicerolo (1:1, v/v); 50–200 μl di lisato cellulare. La soluzione è stata portata a 2.6 ml con H_2O . La reazione è stata innescata per aggiunta di: 300 μl di PMS 0.33% in H_2O e 100 μl di DCIP 0.05% in K_2HPO_4 200 mM.

La diminuzione di assorbanza dovuta alla riduzione del DCIP è stata seguita a 600 nm per 5 min a 37°C. Le letture sono state eseguite contro una soluzione contenente 750 μl di tampone, 60 μl di CaCl_2 , 5 μl di fosfolipasi ed un volume di lisato pari a quello del campione ed H_2O fino a 3 ml.

La velocità di riduzione del DCIP espressa in $\mu\text{moli}/\text{min}$ era calcolata utilizzando un coefficiente di estinzione molare pari a $19100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 600 nm.

L'attività della SDH è stata espressa come μmoli di DCIP ridotto/min/mg di proteina dopo aver misurato le concentrazioni di proteine cellulari dei campioni utilizzati.

Lattico deidrogenasi

Dopo aver ottenuto i lisati cellulari si procedeva secondo un protocollo (Reeves *et al.*, 1996) che prevedeva l'utilizzo di: 300 μl di K_2HPO_4 1 M pH 7.4; 100 μl di NADH 5 mM in H_2O ; 100 μl di $\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$ 22.7 mM in H_2O . Il volume della soluzione era portato a 3 ml per aggiunta di H_2O .

La reazione è stata innescata con l'aggiunta di 30–60 μl di lisato cellulare. La velocità di ossidazione del NADH veniva seguita per 3 min a 340 nm a 25°C. L'attività della LDH è stata espressa come μmoli di NADH ossidato/min/mg di proteina.

11. Saggio di attività della CPP32 (CASPASI-3)

➤ *Acanthamoeba palestinensis*: trofozoiti

Per questo tipo di saggio sono state seminate 4×10^5 cellule su dischetti Petri del diametro di 35 mm e successivamente incubate per 1 h con una soluzione contenente PBS e ftalocianina alla concentrazione di 2 μM . Tolto il mezzo di incubazione ed eseguiti due lavaggi con PBS contenente Ca^{2+} e Mg^{2+} , ogni dischetto veniva irradiato ad una velocità di fluenza di 50 mW/cm^2 (600–700 nm) per 10 min. Poste in incubatore con il loro terreno di crescita, 2 h dopo la fine dell'irradiamento, le cellule nei dischetti venivano staccate e raccolte in provette in cui veniva aggiunto il PBS senza Ca^{2+} e Mg^{2+} , utilizzato per il lavaggio di ogni dischetto. Di questa sospensione, costituita da circa 10^6 cellule, veniva misurata l'attività della caspasi-3 utilizzando il Kit ApoAlert CPP32.

La procedura utilizzata era quella originariamente messa a punto da Guru *et al.* (1997). Tale procedura prevedeva la sedimentazione delle cellule in sospensione mediante centrifugazione a 1150xg per 6 minuti. Una volta eliminato il surnatante si aggiungevano 50 μl di tampone di lisi e si lasciava ogni campione in ghiaccio per 10 minuti. Si aggiungevano poi, 50 μl di tampone di reazione contenente DTT e 5 μl di DEVD-AFC e si lasciava ad una temperatura costante di 37°C per 1 h. Il DEVD-AFC è un tetrapeptide (Asp-Glu-Val-Asp) marcato con la sonda fluorescente 7-amino-4-trifluorometilcumarina (AFC) e costituisce un substrato sintetico per la CPP32. Quest'ultima agisce scindendo il legame del AFC con il DEVD e l'attività della caspasi-3 è valutata misurando l'emissione di fluorescenza emessa dall'AFC libera.

La fluorescenza veniva misurata per mezzo di uno spettrofotofluorimetro Cary Eclipse Varian nell'intervallo compreso tra 420 e 600 nm dopo eccitazione con luce di 400 nm. L'intensità di emissione di fluorescenza, misurata utilizzando cellule fotosensibilizzate, è stata paragonata con quella ottenuta partendo da cellule non trattate e con la fluorescenza misurata in presenza dell'inibitore della CPP32 (DEVD-CHO).

Quando il saggio è stato effettuato in presenza dell'inibitore della CPP32 non si è osservata alcuna emissione di fluorescenza. Questo controllo ha permesso di escludere che la fluorescenza osservata in assenza di inibitore fosse dovuta a reazioni diverse da quella catalizzata dalla CPP32.

12. Analisi in microscopia

Microscopia Elettronica a Trasmissione

➤ cellule batteriche

Cellule di *Staphylococcus aureus* MRSA e di *Escherichia coli* 04 incubate per 5 e 30 minuti con TDPyP 10 μ M contenuta in complessi di ciclodestrine, sono state preparate per l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione. Dopo incubazione, le cellule sono state sedimentate a 1650xg per 10 minuti e risospese in glutaraldeide all'1% per 30 min.

Le cellule venivano quindi ricentrifugate a 1650xg per 10 min e lavate 3 volte a distanza di 10 min con tampone sodio cacodilato-HCl, pH 7.2, arricchito in saccarosio al 4% a freddo. Seguiva una post-fissazione con OsO₄ al 1% in tampone sodio-cacodilato-HCl 0.1M, pH 7.2, a freddo per 30 min. Il passaggio successivo, eseguiti 3 lavaggi con tampone sodio-cacodilato-HCl 0.1M, pH 7.2, era la disidratazione dei campioni, sottoponendoli a concentrazioni crescenti di etanolo (50°, 70°, 95° e alcool assoluto). I campioni sono stati infine posti a 4°C per 24 h in alcool assoluto.

I campioni così ottenuti erano sottoposti a due lavaggi (10 min) in alcool assoluto e due lavaggi in acetone, e ad una prima inclusione in acetone/resina Polybed 812 (1:1) per 1 h. La successiva inclusione avveniva in resina per 1 h. I campioni venivano quindi posti nelle formelle e posti in stufa a 60°C per 72 h. I campioni così ottenuti erano poi sezionati con ultramicrotomo LKB per formare sezioni ultrasottili tra 60 e 80 nm, ottenute utilizzando una lama di diamante

Diatome. Le sezioni sono state raccolte su retini di rame di 200–300 mesh e contrastate con coloranti a base di sali di metalli pesanti (acetato di uranile in soluzione alcolica al 30% e citrato di piombo). L'osservazione delle sezioni ultrasottili è stata effettuata con un microscopio elettronico a trasmissione Hitachi H-600.

Osservazioni in contrasto negativo

I campioni, contenenti le vescicole liposomiali, sono stati colorati con acetato di uranile all'1% per l'osservazione in contrasto negativo; sono poi stati trasferiti su retini di rame di 400 mesh con film di carbone. Le osservazioni sono state effettuate utilizzando un microscopio Hitachi-H600 (Tokyo, Giappone).

➤ *Acanthamoeba palestinensis*: trofozoiti

Studi di microscopia elettronica sono stati effettuati su cellule di *A. palestinensis* allo stato vegetativo, dopo fotosensibilizzazione con ftalocianina. I dischetti seminati 24 h prima con 2×10^5 cellule per ml erano incubati per 20 e 10 minuti con RLP068 2 μM . Dopo irradiazione per 10 min a 50 mW/cm^2 (600–700 nm), dai dischetti veniva rimosso il PBS e sostituito con glutaraldeide al 3% in tampone sodio cacodilato 0.1 M, pH 7.2. La fissazione con aldeide durava per 3 h in ghiaccio. Le cellule venivano quindi staccate con un raschietto sterile e centrifugate a 1150xg per 10 min e lavate 3 volte a distanza di 10 min con tampone sodio cacodilato-HCl, pH 7.2, arricchito in saccarosio al 4% a freddo. Seguiva una post-fissazione con OsO_4 al 2% in tampone sodio-cacodilato-HCl 0.1M, pH 7.2, a freddo per 90 min.

Il passaggio successivo, eseguiti 3 lavaggi con tampone sodio-cacodilato-HCl 0.1M, pH 7.2, era la disidratazione dei campioni, che avveniva sottoponendoli a concentrazioni crescenti di etanolo (50°, 70°, 95° e alcool assoluto). I campioni sono infine posti a 4°C per 24 h in alcool assoluto.

I campioni così ottenuti erano sottoposti a due lavaggi (10 min) in alcool assoluto ed a due lavaggi in acetone, ed infine, ad una prima inclusione in acetone/resina Polybed 812 (1:1) per 1 h.

La successiva inclusione avveniva in acetone/resina (1:2) per 1h e, infine, resina per 1 h. I campioni venivano quindi posti nelle formelle e tenuti in stufa a 60°C per 72 h; i due ulteriori passaggi in resina sono stati aggiunti dopo aver notato la difficoltà di penetrazione della resina che condizionava la buona riuscita del successivo taglio.

I campioni venivano poi sezionati con ultramicrotomo LKB per formare sezioni ultrasottili tra 60 e 80 nm ottenuti utilizzando una lama di diamante Diatome.

Le sezioni sono state raccolte su retini di rame di 200-300 mesh e contrastate con coloranti a base di sali di metalli pesanti (acetato di uranile in soluzione alcolica al 30% e citrato di piombo). L'osservazione delle sezioni ultrasottili è stata effettuata mediante microscopio elettronico a trasmissione Hitachi H-600.

Microscopia in fluorescenza

➤ *Acanthamoeba palestinensis*: trofozoiti

La localizzazione intracellulare della ftalocianina RLP068 in trofozoiti di *A. palestinensis*, sia in forma cistica, che vegetativa è stata studiata utilizzando un microscopio LEICA DMR equipaggiato con filtro di eccitazione a 620-660 nm e filtro di emissione a 700-775 nm. Le cellule erano seminate in dischetti nel cui fondo era stato adagiato un vetrino coprioggetto, le cellule formavano così un monostrato adeso al vetrino. Dopo incubazione di 1 h con RLP068 10 µM il monostrato veniva lavato con PBS e il vetrino era staccato e montato su un portaoggetti per procedere all'osservazione. Le osservazioni sono state anche effettuate parallelamente su cellule di controllo non incubate con ftalocianina né irradiate.

➤ *Acanthamoeba palestinensis*: cisti

Per la localizzazione intracellulare di RLP068 in cisti di *A. palestinensis* si procedeva con incubazione in soluzione e dopo lavaggi si prelevava un'aliquota che veniva posta in un vetrino portaoggetti. Le osservazioni sono state anche effettuate parallelamente su cellule di controllo non incubate con ftalocianina né irradiate.

Le cisti sono state ulteriormente osservate anche dopo colorazione con rosso congo, colorante caratterizzato da alta affinità per la cellulosa, componente di parete. Il filtro di eccitazione era a 450 nm mentre quello di emissione era a 490 nm. Le cisti sono state osservate subito dopo incubazione con RLP068 0.5, 3, 5 μM e irradiazione per 20 min a 50 mW/cm^2 (600–700 nm). Anche in questo caso, le osservazioni sono state effettuate parallelamente su cellule di controllo non incubate con ftalocianina, né irradiate.

Le cellule sono state, inoltre, osservate mediante microscopio LEICA DMR con sistema di contrasto di Nomarsky a 5 giorni dal trattamento della coltura cistica. Le cisti sono state incubate con RLP068 0.5 e 1 μM per 1 h e irradiate per 20 min a 50 mW/cm^2 (600–700 nm). Alla fine del trattamento le cisti sono state poste in terreno ricco e alla temperatura di 30°C per favorire il disincistamento delle cisti non danneggiate.

1. Caratterizzazione spettroscopica dei fotosensibilizzatori

In Fig.1 sono mostrate le strutture chimiche dei quattro fotosensibilizzatori utilizzati negli esperimenti d'inattivazione di microorganismi.

In Fig.1a è rappresentata la struttura chimica della clorofilla *a* (Chl) caratterizzata da un macrociclo tetrapirrolico che è ridotto per idrogenazione di un doppio legame in corrispondenza di un anello pirrolico, e dalla presenza di una lunga catena pirrolica, che impartisce idrofobicità alla molecola.

In Fig.2 sono rappresentati lo spettro di assorbimento (a) con un picco massimo situato a 410 nm (banda di Soret), e lo spettro di fluorescenza (b) con un picco massimo a 663 nm della clorofilla. Il suo coefficiente di estinzione molare è stato calcolato essere pari a $68,693 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 410 nm in DMF. La resa quantica di fluorescenza è stata calcolata essere pari a 0.09.

In Fig.1b è rappresentata la struttura dell'ematoporfirina (HP) con il caratteristico macrociclo tetrapirrolico tipico di questi composti. La molecola è sostanzialmente anfifilica in quanto il contributo idrofobico dovuto al macrociclo aromatico è, in parte, compensato dalla presenza di due gruppi carbossilici e due gruppi alcolici secondari a livello dei sostituenti periferici.

In Fig.3 sono rappresentati lo spettro di assorbimento (a) con un picco massimo situato a 410 nm, e lo spettro di fluorescenza (b) con un picco massimo a 625 nm dell'ematoporfirina. Il suo coefficiente di estinzione molare è pari a $140,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 410 nm in etanolo. La resa quantica di fluorescenza è pari a 0.1 (Reddi e Jori, 1988).

In Fig.1c è rappresentata la struttura della porfirina monocationica 5-[4-(1-dodecanoilpiridinio)]-10,15,20-trifenil-porfina (TDPyP) che si caratterizza per la presenza dei sostituenti in posizione meso e per le proprietà anfifiliche dovute alla carica positiva su un anello piridinico. In Fig.4 sono rappresentati lo spettro di assorbimento (a) con un picco massimo situato a 416 nm, e lo spettro di fluorescenza (b) con un picco massimo a 658 nm di TDPyP. Il suo coefficiente

di estinzione molare è stato calcolato essere pari a $176,570 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 416 nm in etanolo. La resa quantica di fluorescenza di questa porfirina è risultata essere pari a 0.14 . In Fig.1d, infine, è rappresentata la struttura della 1(4),8(11),15(18),22(25)-tetrakis-3-(N,N,N-trimetilammonio)fenossi ftalocianato Zn(II) cloruro (RLP068) con l'esteso macrociclo tetraazaisoindolico tipico delle ftalocianine. In Fig.5 sono rappresentati lo spettro di assorbimento (a) con un picco massimo situato a 693 nm , e lo spettro di fluorescenza (b) con un picco massimo alla medesima lunghezza d'onda di RLP068. Il suo coefficiente di estinzione molare è stato calcolato essere pari a $195,930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 693 nm in DMF. La resa quantica di fluorescenza è risultata essere pari a 0.07 . Le principali caratteristiche spettroscopiche dei vari fotosensibilizzatori sono sinteticamente presentati in tabella 2.

Fotosens	$\lambda_{\text{ass max}}$	ϵ	$\lambda_{\text{em max}}$	Φ_f	Φ_{Δ}
Chl	410	68,693	663	0.09	0.1
HP	410	140,000	625	0.1	0.67*
TDPyP	417	176,570	658	0.14	0.95
RLP068	693	195,930	693	0.07	0.85

*valori ottenuti da Lambert *et al.*, 1986

Tabella 2: Valori delle principali caratteristiche spettroscopiche dei fotosensibilizzatori utilizzati.

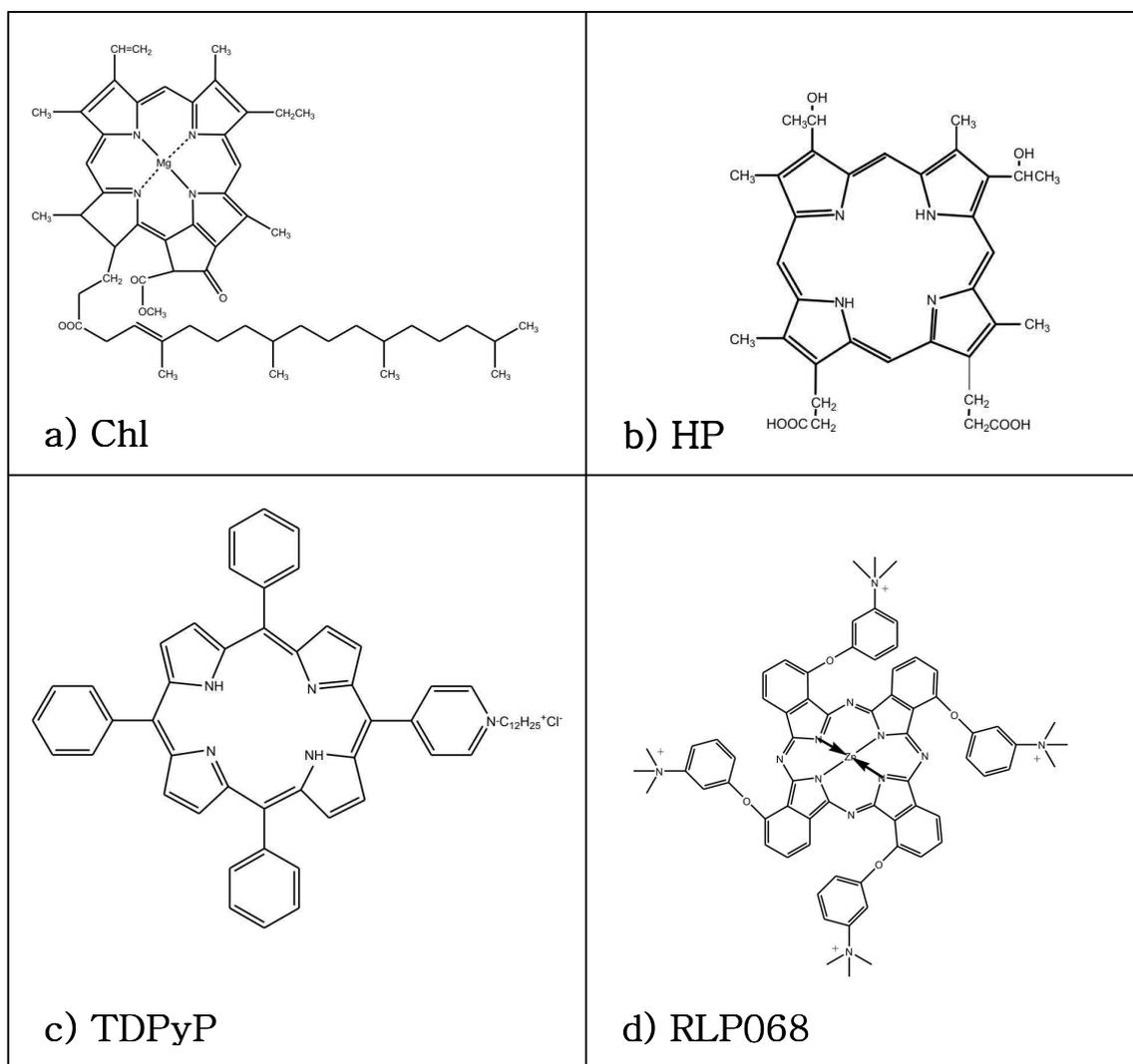


Fig 1: Strutture chimiche dei fotosensibilizzatori utilizzati:

- Clorofilla *a* (Chl)
- Ematoporfirina (HP)
- 5-[4-(1-dodecanoilpiridinio)]-10,15,20-trifenil-porfina (TDPyP)
- 1(4),8(11),15(18),22(25)-tetrakis-3-(N,N,N-trimetilammonio)fenossi-ftalocianato Zn(II) cloruro (RLP068)

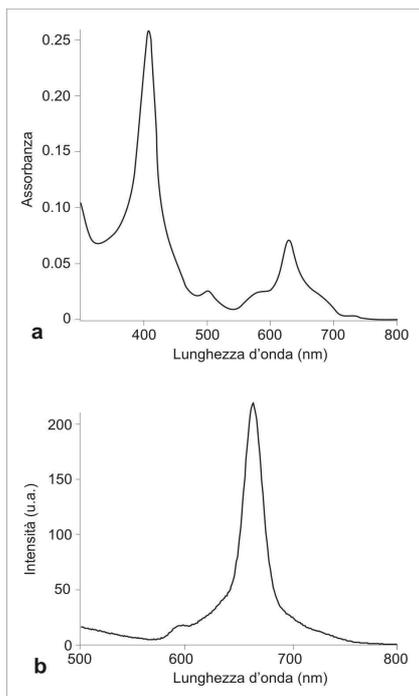


Fig. 2: Spettro di assorbimento (a) e di fluorescenza (b) di Chl in soluzione di dimetilformammide.

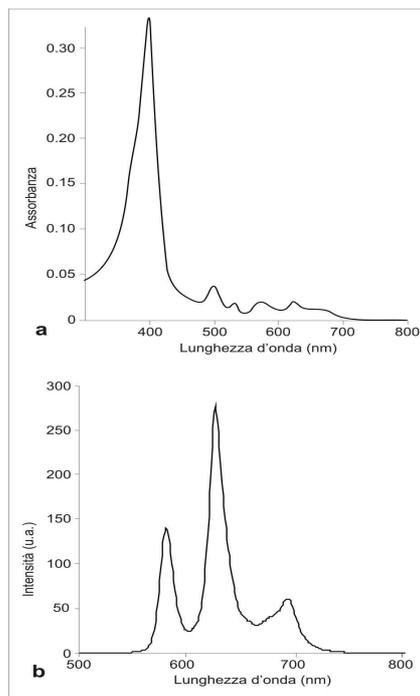


Fig. 3: Spettro di assorbimento (a) e di fluorescenza (b) di HP in soluzione etanolica.

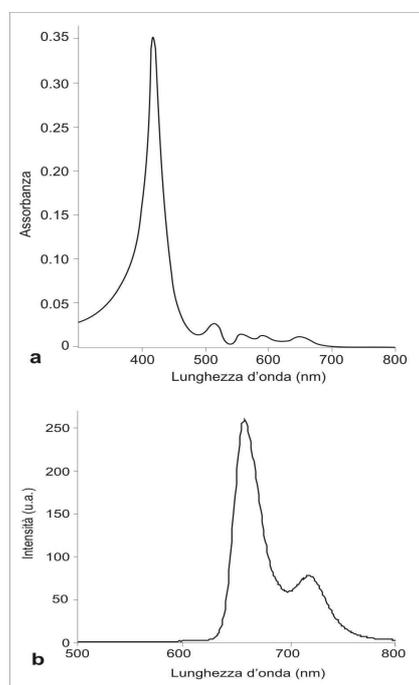


Fig. 4: Spettro di assorbimento (a) e di fluorescenza (b) di TDPyP in soluzione etanolica.

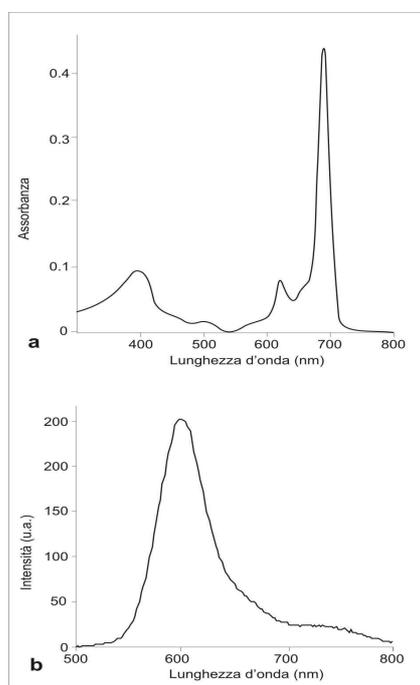


Fig. 5: Spettro di assorbimento (a) e di fluorescenza (b) di RLP068 in soluzione di dimetilformammide.

2. Fotostabilità

In Fig.6 sono rappresentati gli spettri (a) della clorofilla in soluzione omogenea e, (b) della stessa incorporata in liposomi cationici DOTAP dopo successivi irradimenti con luce bianca (400–700 nm). Come si vede nel grafico, la clorofilla incorporata in liposomi DOTAP come anche la Chl libera mostrano il tipico spettro dei derivati tetrapirrolici in forma monomera, cioè con un picco a 410 nm (banda di Soret) e uno a 630 nm. Le analisi spettroscopiche dei liposomi cationici contenenti Chl mostrano come la clorina rimanga stabile in assenza di irradiazione almeno fino a 5 giorni; in particolare, non si osserva alcuna tendenza alla formazione di aggregati. Durante l'irradiazione con luce bianca fino a 30 min, la clorina va, invece, incontro a fotodegradazione, il che è tipico di molti composti tetrapirrolici. Sono visibili, inoltre, punti isosbastici (b), il che suggerisce come, almeno nella fase iniziale, si formi un unico fotoprodotto.

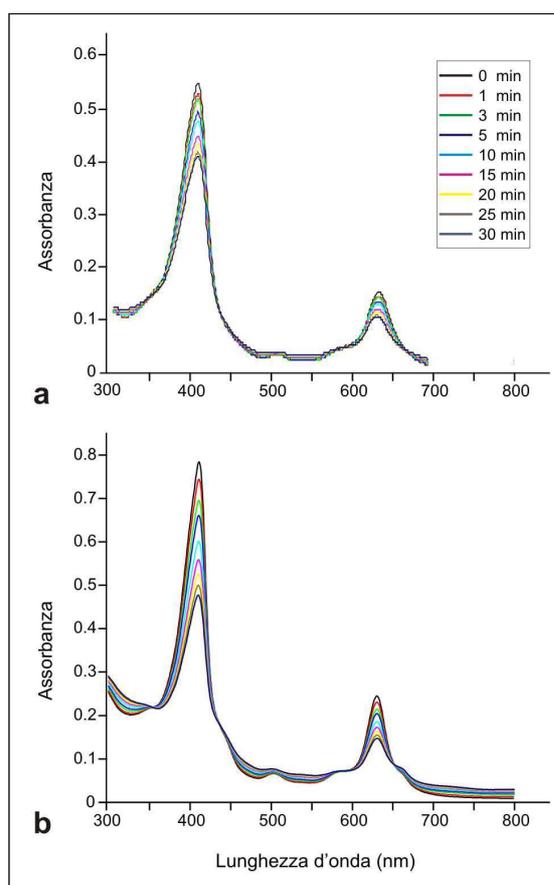


Fig.6: Spettri di assorbimento della clorofilla a diversi tempi di irradiazione

- a) Clorofilla in soluzione omogenea di dimetilformammide irradiata con luce bianca (400–600 nm; 100 mW/cm²);
- b) Clorofilla incorporata in liposomi cationici DOTAP irradiata con luce bianca (400–600 nm; 100 mW/cm²);

L'ematoporfirina appare essere incorporata allo stato monomeric in liposomi cationici (Fig.7b) ed è significativamente fotodegradata. La fotodegradazione in questo caso è più pronunciata rispetto a quella osservata nel caso della Chl. Inoltre, si può notare un aumento del rumore di fondo (probabilmente legato alla formazione di materiale aggregato o polimerico) e, al prolungarsi dell'irradiazione, una forte ipocromicità. Nel caso dell'ematoporfirina libera (Fig.7a), la fotodegradazione avviene con una cinetica più lenta e sembra coinvolgere l'intera sequenza di bande di assorbimento.

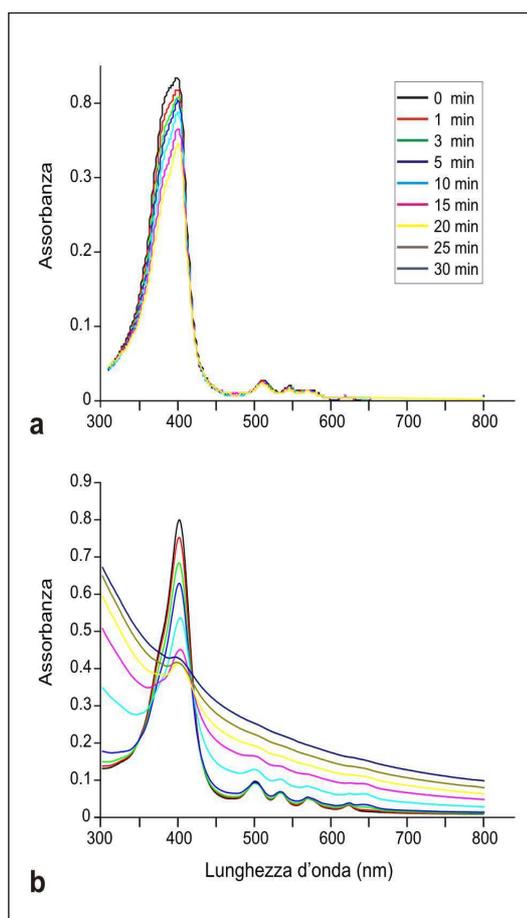


Fig.7: Spettri di assorbimento dell'ematoporfirina dopo irradiazione

- a) Ematoporfirina in soluzione omogenea di etanolo irradiata con luce bianca (400–600 nm; 100 mW/cm²);
- b) Ematoporfirina incorporata in liposomi cationici DOTAP irradiata con luce bianca (400–600 nm; 100 mW/cm²);

Irradiando la porfirina TDPyP in forma libera (Fig.8a) si può notare una veloce fotodegradazione che non appare quando la stessa è incorporata in liposomi cationici DOTAP (Fig.8b), dove è invece visibile un aumento del rumore di fondo. La fotodegradazione della sostanza incorporata in ciclodestrine SC₆NH₃Cl appare minima e non vi è presenza di alcun rumore di fondo (Fig.8c).

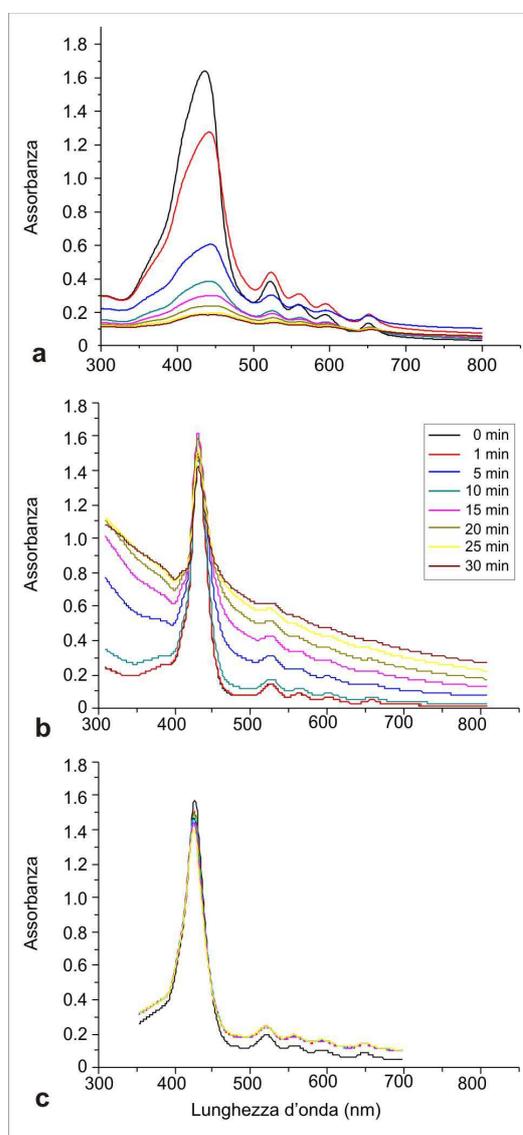


Fig. 8: Spettri di assorbimento di TDPyP dopo irradiazione

- a) TDPyP in soluzione omogenea di etanolo irradiata con luce bianca (400–600 nm; 100 mW/cm²);
- b) TDPyP incorporata in liposomi cationici DOTAP irradiata con luce bianca (400–600 nm; 100 mW/cm²);
- c) TDPyP incorporata in complessi d'inclusione formati da ciclodestrine SC₆NH₃Cl irradiata con luce bianca (400–600 nm; 100 mW/cm²).

Per quanto riguarda la ftalocianina, essa presenta una minima fotodegradazione, e non si osserva la formazione di fotoprodotto con l'irradiazione.

3. Misure di resa quantica di formazione di ¹O₂

E' stata valutata la resa quantica di formazione ¹O₂ (Φ_{Δ}) da parte della clorofilla e della TDPyP. Le varie rese quantiche sono state calcolate utilizzando come standard di riferimento quello per la generazione di ¹O₂ da parte dell'ematoporfirina. Tale resa quantica è stata determinata in precedenti studi e trovata essere pari a 0.67 (Lambert *et al.*, 1986). Su queste basi, la resa quantica di formazione di ¹O₂ da parte della clorofilla è pari a 0.1, mentre quella di TDPyP risulta essere 0.95. Le rese quantiche di formazione di ¹O₂ sono state calcolate solo per le sostanze in forma libera in quanto i solventi solubilizzanti il dimetilantracene altererebbero in maniera significativa la struttura del liposoma. La resa quantica di formazione di ¹O₂ da parte della RLP068 è pari a 0.85 in relazione a quella della ZnPc di riferimento che è stata calcolata essere 0.55 (Valduga *et al.*, 1988).

I valori di Φ_{Δ} sono mostrati in tabella 2.

4. Misure di anisotropia di fluorescenza

E' stata valutata l'anisotropia di fluorescenza della due sonde: ematoporfirina e clorofilla incorporate nei tre differenti tipi di liposomi (DPPC, DMPC, DOTAP).

Come si può vedere in Fig.9b, il grafico di anisotropia in funzione della temperatura, per la HP associata ai liposomi DPPC e DMPC, mostra un andamento tipico della transizione di fase gel-liquido di questi lipidi. Il punto di transizione di fase (T_C) è leggermente spostato verso temperature inferiori. Tali dati sono concordanti con quelli disponibili in letteratura (30 e 23 °C, rispettivamente). Questo fatto potrebbe essere conseguenza della localizzazione preferenziale della HP nello strato più interno del monostrato lipidico dovuto alla maggior curvatura (Ricchelli *et al.*, 1991).

I liposomi cationici DOTAP con HP incorporata non presentano alcuna transizione di fase, poichè si presentano allo stato fluido alle temperature da noi analizzate ($T_C=0^\circ\text{C}$). La clorofilla presenta diversi gradi di anisotropia di fluorescenza quando è incorporata nei tre tipi di liposomi (Fig.9a). Questo potrebbe dipendere dalla maggior rigidità del microambiente circostante. Probabilmente la Chl va a posizionarsi nella parte interna, nel core idrofobico del liposoma, mentre l'HP si localizza preferenzialmente all'interfaccia lipide/acqua, a stretto contatto con il solvente. (Hamblin *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 2001). L'impedimento della rotazione per la Chl è particolarmente evidente nel caso dei liposomi DOTAP, probabilmente come conseguenza dell'aggregazione delle vescicole, visibile da studi al microscopio elettronico dove i liposomi cationici contenenti HP (Fig.10b) mostrano una normale struttura sferica, mentre quelli contenenti Chl (Fig.10a) formano grandi aggregati.

L'incorporazione della clorofilla influenza anche la struttura del liposoma DMPC; in questo caso la temperatura di transizione di fase è spostata verso temperature più alte (28°C) rispetto a quelle tipiche di questo lipide (23°C).

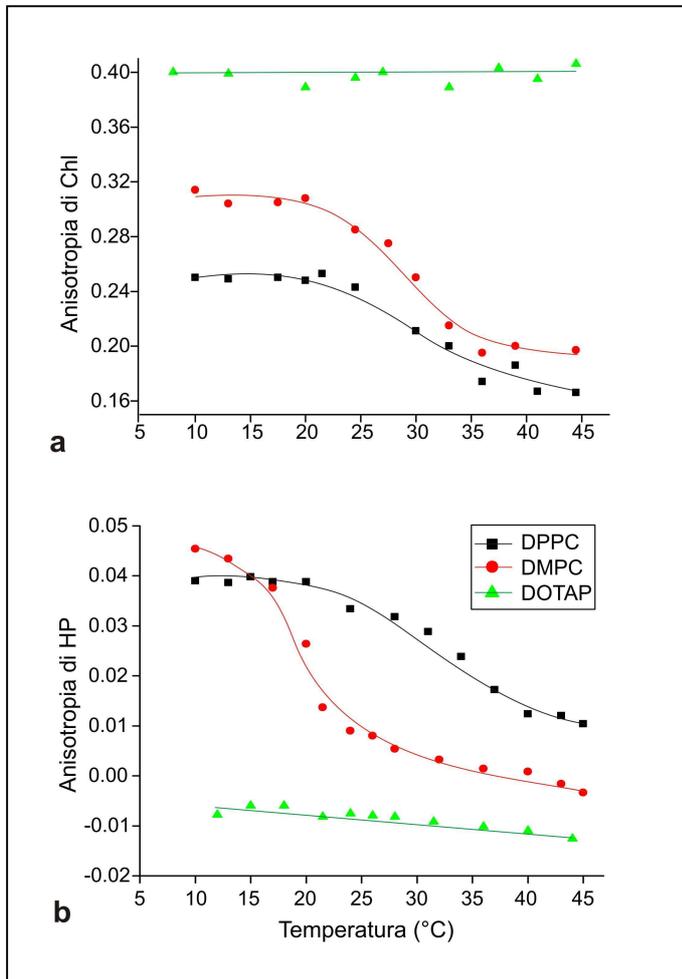


Fig. 9: Effetto della temperatura sull'anisotropia di fluorescenza di Chl (a) e HP (b) incorporate in diversi tipi di liposomi. L'eccitazione è posta a 410 nm per la Chl (λ_{\max} : 640 nm) e a 520 nm per la HP (λ_{\max} : 620 nm).

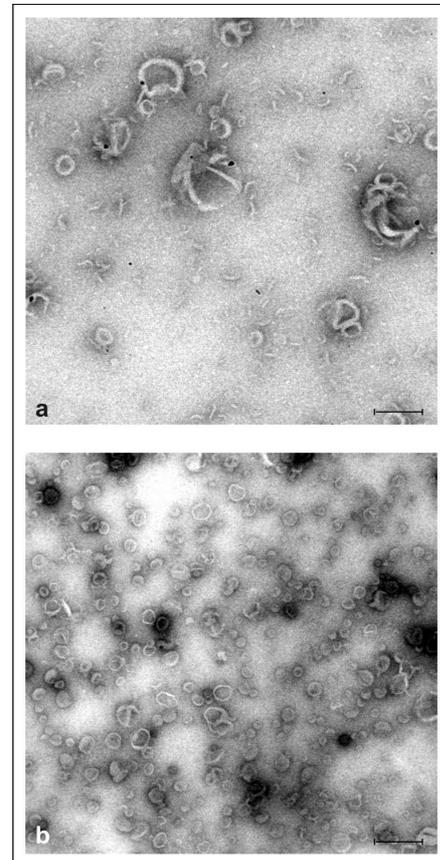


Fig 10: Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione dopo colorazione con contrasto negativo di liposomi cationici DOTAP incorporanti Chl (a) HP (b).
barra = 200 nm

5. Studi di accumulo

➤ *Staphylococcus aureus* MRSA

I risultati degli esperimenti di accumulo in cellule di MRSA con i vari fotosensibilizzatori alla concentrazione 10 μ M, liberi oppure incorporati in diversi tipi di liposomi dopo 2 h d'incubazione sono mostrati in Fig.11.

E' evidente come, a parità di condizioni sperimentali, i diversi fotosensibilizzatori siano accumulati in quantità diverse a livello della cellula microbica. Ad esempio, la clorofilla, sia in forma libera che incorporata in liposomi cationici DOTAP (Fig. 11a), si accumula in concentrazioni molto simili nel microorganismo (ca 3 nmoli/ 10^8 cellule); quando è somministrata incorporata in liposomi neutri, sia fluidi che rigidi (DMPC, DPPC), viene accumulata in concentrazioni notevolmente inferiori nelle cellule.

Per quanto riguarda l'ematoporfirina (Fig.11b), invece, si ha un accumulo tre volte superiore (ca 3 nmoli/ 10^8 cellule) nel caso di somministrazione dopo incorporazione in liposomi DOTAP piuttosto che in liposomi neutri (DMPC, DPPC) o in forma libera (ca 1 nmoli/ 10^8 cellule).

Dopo successivi lavaggi, si nota in generale, una diminuzione più marcata nell'accumulo della clorofilla rispetto all'ematoporfirina. In particolare, la diminuzione nella quantità di clorofilla legata alle cellule di MRSA, dopo incubazione veicolata da DOTAP, indotta dai ripetuti lavaggi, risulta essere più accentuata rispetto a quella osservata nel caso dell'ematoporfirina.

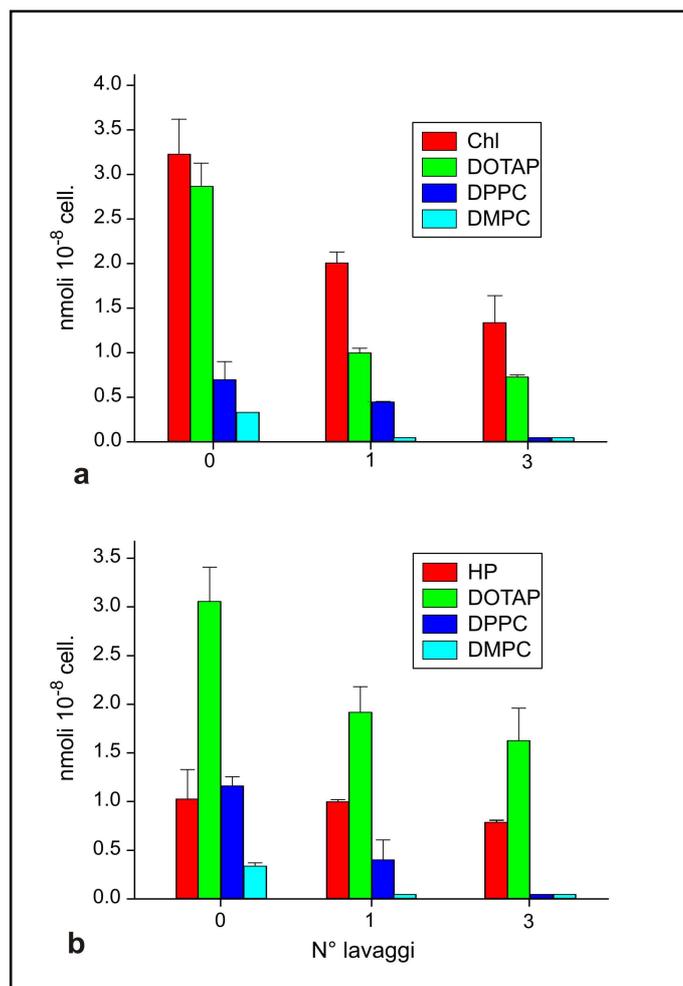


Fig. 11: Gli istogrammi mostrano l'accumulo di (a) Chl e (b) HP 10 μM libere oppure incorporate in diversi tipi di liposomi in cellule di *S. aureus* MRSA dopo 2 h d'incubazione al buio. La quantità di sostanza accumulata è misurata allo spettrofotometro dopo vari lavaggi con PBS. L'incubazione con il fotosensibilizzatore libero è stata fatta per 30 min.

Gli stessi liposomi cationici sono stati utilizzati per incorporare un'altra porfirina debolmente cationica (TDPyP); i risultati ottenuti da esperimenti di accumulo in cellule di MRSA hanno dimostrato, anche in questo caso, un accumulo maggiore della porfirina somministrata mediante il veicolante cationico rispetto alla porfirina in forma libera (Fig.12a).

Studi più specifici, che prevedevano la separazione della parete batterica dal protoplasto, hanno permesso di dimostrare come l'accumulo della porfirina associata ai liposomi DOTAP avvenga con alta preferenzialità nel protoplasto rispetto alla parete (Fig.12b), indicando come l'uso del veicolante cationico consenta alla porfirina di penetrare almeno sino alla membrana citoplasmatica.

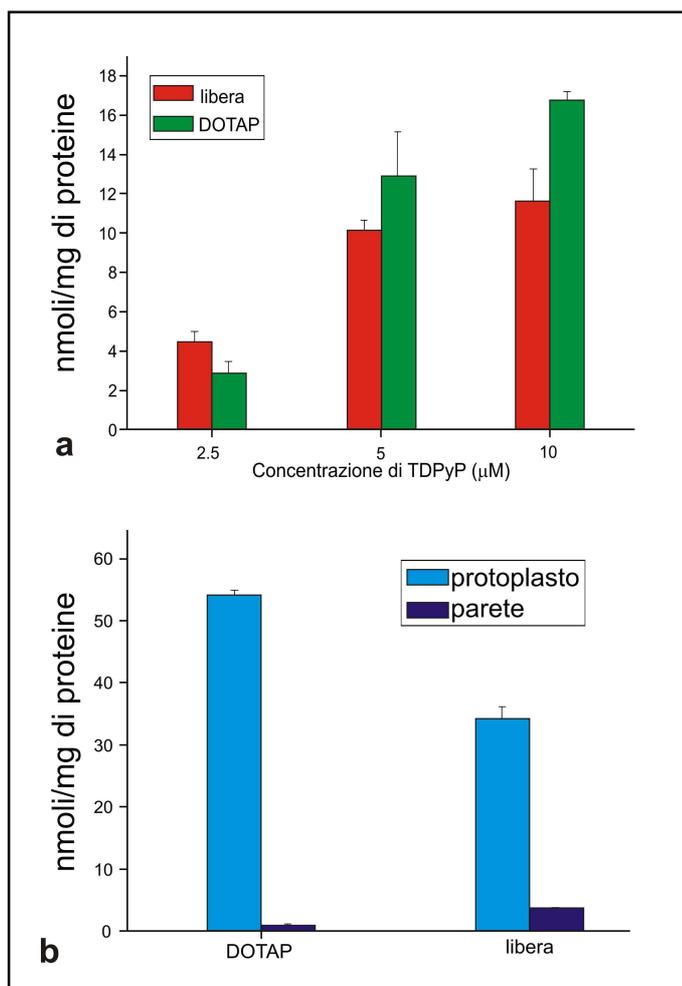


Fig. 12:

- Accumulo di TDPyP in cellule di MRSA (nmol /mg di proteina) dopo 30 min d'incubazione con la porfirina libera od incorporata in liposomi DOTAP, a varie concentrazioni.
- Accumulo di TDPyP a livello di protoplasto e parete di MRSA dopo 5 min d'incubazione con TDPyP 5 μM .

➤ *Acanthamoeba palestinensis*

L'effetto della ftalocianina RLP068 è stato studiato sul protozoo *Acanthamoeba palestinensis* nello stadio di trofozoite e di cisti.

Tale fotosensibilizzatore è stato scelto in quanto studi precedenti (Soncin *et al.*, 2002; Ferro, 2000–2001) avevano dimostrato un'ottima efficacia di inattivazione fotosensibilizzata dalla ftalocianina a livello di cellule di batteri sia Gram-positivi che Gram-negativi.

Come si può osservare in Fig.13a, nel caso dei trofozoi, l'accumulo della ftalocianina cresce all'aumentare della sua concentrazione nel mezzo d'incubazione, almeno nell'intervallo 0.5–2 μM .

Un analogo andamento si nota (Fig.13b) nel caso delle cisti di *A. palestinensis*, ove non si evidenzia una tendenza al raggiungimento di un livello di plateau, per quanto riguarda la concentrazione legata alle cellule, almeno sino a dosi di RLP068 pari a 5 μM .

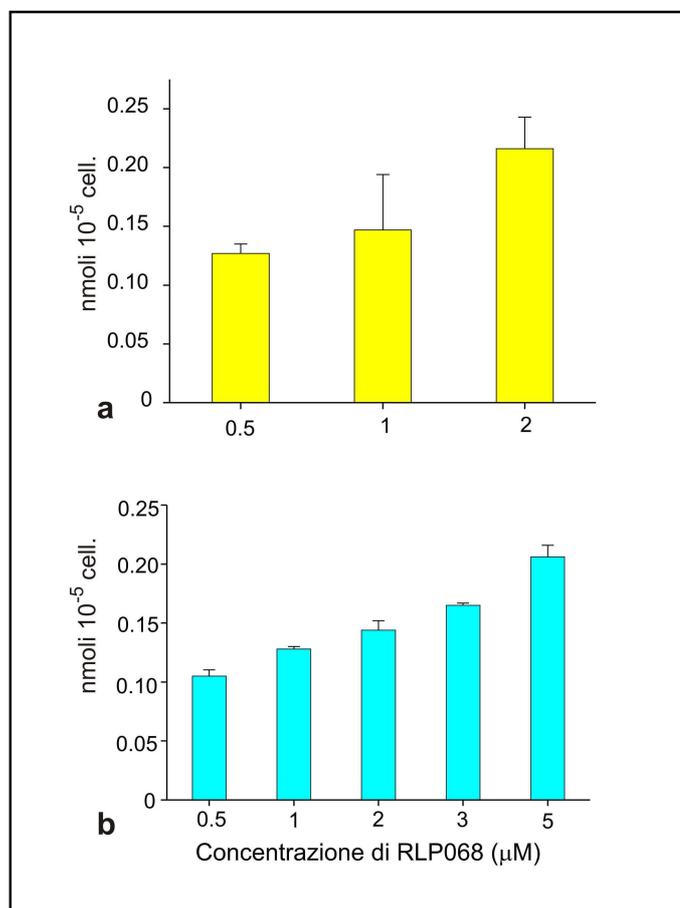


Fig. 13: Accumulo di RLP068 in trofozoiti (a) e cisti (b) di *Acanthamoeba palestinensis* dopo 1 h d'incubazione in funzione della concentrazione di ftalocianina nel mezzo d'incubazione.

6. Fotoinattivazione di microorganismi

➤ Cellule batteriche

Dopo aver quantificato la concentrazione di fotosensibilizzatore a livello cellulare in specifiche condizioni di incubazione, le cellule di MRSA sono state irradiate per vari intervalli di tempo con luce bianca (400–600 nm) alla velocità di fluena di 100 mW/cm^2 per valutare la sopravvivenza cellulare. I tre fotosensibilizzatori (HP, Chl, TDPyP) in soluzione omogenea, dopo 30 minuti d'incubazione, mostrano una diversa efficacia citocida (Fig.14).

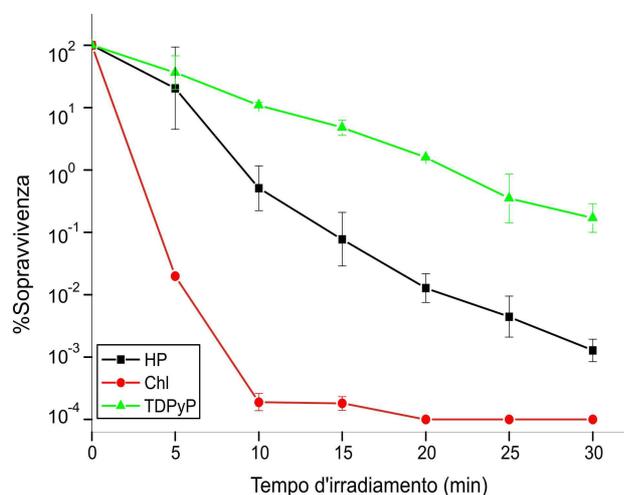


Fig. 14: Fotoinattivazione di cellule di *S. aureus* MRSA dopo 30 min d'incubazione con HP, Chl e TDPyP aggiunte alla sospensione cellulare in soluzione omogenea per una concentrazione finale pari a $10 \mu\text{M}$ e irradiazione con velocità di fluena di 100 mW/cm^2 (400–600 nm).

In particolare, le due porfirine (HP e TDPyP) mostrano un'attività relativamente bassa (3-4 log di calo nella sopravvivenza batterica dopo 20 min d'irradiazione), mentre la clorofilla risulta particolarmente efficace già dopo 10 minuti d'irradiazione (6 log di calo). La somministrazione della clorofilla mediante vescicole liposomiali è accompagnata da una drastica riduzione della sua attività fotosensibilizzatrice (Fig.15).

Indipendentemente dalla natura del liposoma, la diminuzione della sopravvivenza cellulare è al massimo dell'ordine di 1-2 log dopo 30 min di esposizione alla luce.

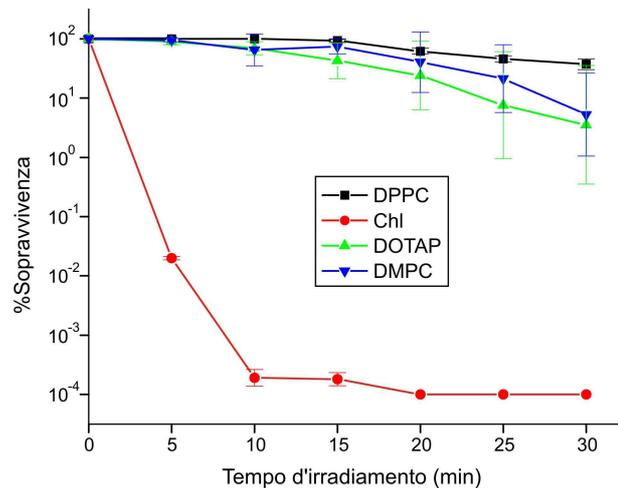


Fig 15: Sopravvivenza di cellule di *S. aureus* MRSA irradiate per diversi intervalli di tempo con luce bianca (100 mW/cm²) dopo incubazione per 2 h con Chl 10 μ M incorporata in diversi tipi di liposomi e per 30 min con Chl libera.

D'altra parte, nel caso della HP (Fig.16), l'incorporazione in liposomi neutri, sia fluidi (DMPC) che solidi (DPPC), non provoca una significativa variazione nell'attività fotosensibilizzatrice, mentre l'utilizzazione di liposomi cationici (DOTAP) risulta in un sensibile incremento dell'efficacia del fotoprocesso.

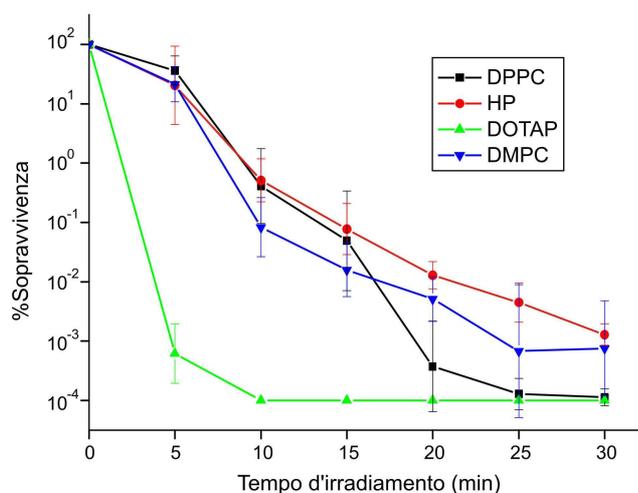


Fig 16: Sopravvivenza di cellule di *S. aureus* MRSA irradiate per diversi intervalli di tempo con luce bianca (100 mW/cm²) dopo incubazione di 2 h con HP 10 µM incorporata in diversi tipi di liposomi e 30 min con HP libera.

L'esaltazione dell'attività di fotosensibilizzazione dell'MRSA da parte di liposomi DOTAP è stata osservata (Fig.17) anche nel caso di TDPyP; tuttavia, in questo caso, la somministrazione della porfirina mediante liposomi DMPC e DPPC comporta una brusca caduta nella fotoattività anche rispetto alla porfirina libera.

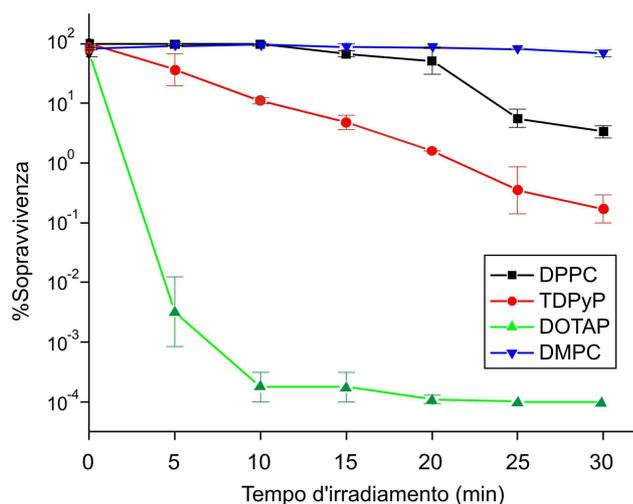


Fig. 17: Sopravvivenza di cellule di *S. aureus* MRSA irradiate per diversi intervalli di tempo con luce bianca (100 mW/cm²) dopo incubazione per 2 h con

TDPyP 10 μM incorporata in diversi tipi di liposomi e per 30 min con TDPyP libera.

Ulteriori studi di fotoinattivazione sono stati condotti utilizzando i liposomi DOTAP contenenti TDPyP; diminuendo il tempo d'incubazione (Fig.18a) prima dell'irradiamento fino a 5 minuti, la cinetica di inattivazione delle cellule di MRSA non subisce significative variazioni.

Dimezzando, inoltre, concentrazione (5 μM) e velocità di fluensa (50 mW/cm^2) è sufficiente aumentare di 5 minuti (per un totale di 20 min) il tempo d'irradiamento per ottenere lo stesso calo nella sopravvivenza cellulare (Fig.18b).

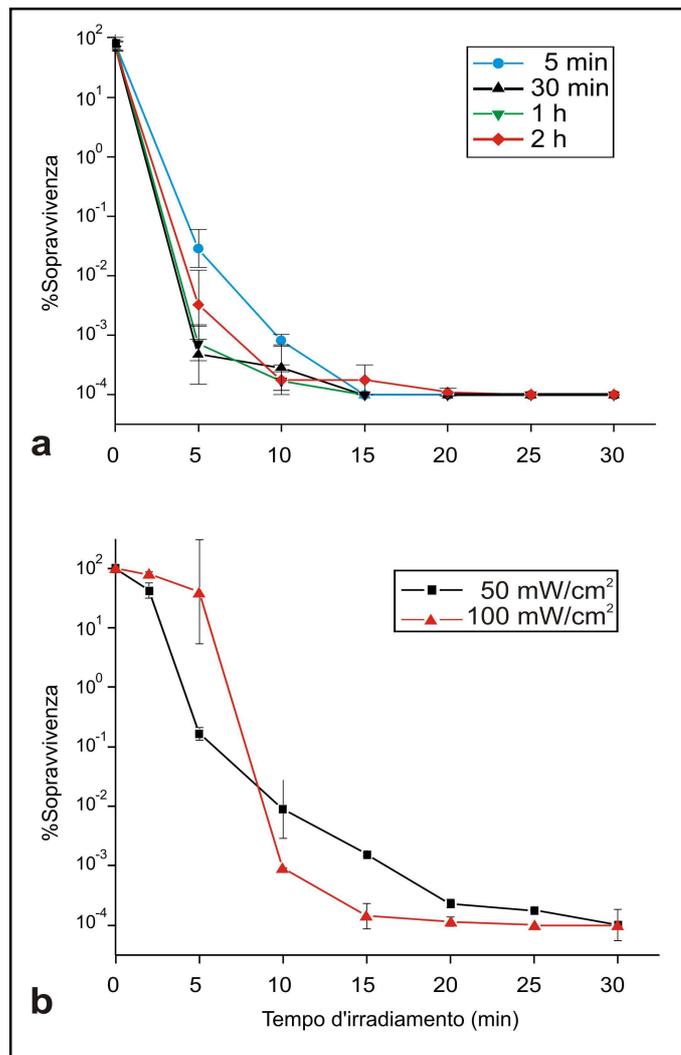


Fig. 18: Effetto del tempo d'irradiamento sulla sopravvivenza cellulare di *S. aureus* MRSA in funzione del tempo d'incubazione con TDPyP incorporata in

liposomi DOTAP, come pure in funzione della concentrazione e della velocità di fluena.

- a) le cellule sono state incubate per 5 min, 30 min, 1 h e 2 h con TDPyP 10 μM incorporata in DOTAP e irradiate con luce bianca (100 mW/cm^2) per diversi intervalli di tempo.
- b) le cellule sono incubate per 5 min con TDPyP 5 μM incorporata in liposomi DOTAP e irradiate con luce bianca con una velocità di fluena di 50 e 100 mW/cm^2 .

E' stata valutata l'attività citocida su cellule di MRSA, anche dopo somministrazione di TDPyP incorporata in complessi di ciclodestrine $\text{SC}_6\text{NH}_3\text{Cl}$. E' stato saggiato un intervallo di concentrazioni di TDPyP compreso tra 0.2 e 5 μM con un rapporto molare porfirina/ $\text{SC}_6\text{NH}_3\text{Cl}$ pari a 1:10.

Come si vede in Fig.19, dopo 30 min di incubazione, con una concentrazione di TDPyP incorporata in ciclodestrine pari a 0.5 μM si ha un calo della sopravvivenza pari a 4.5 log dopo 20 min di irradiazione ad una velocità di fluena di 100 mW/cm^2 (400-600 nm). La porfirina in forma libera è completamente inattiva alla concentrazione 5 μM anche se l'irradiazione è prolungato per 20 min.

Ciclodestrine contenenti TDPyP 5 μM sono molto efficaci nella fotoinattivazione batterica già dopo 2 min d'irradiazione nelle condizioni sperimentali dettagliate più sopra, con 5.5 log di calo nella crescita batterica, che diviene superiore a 6 log dopo 3 min d'irradiazione.

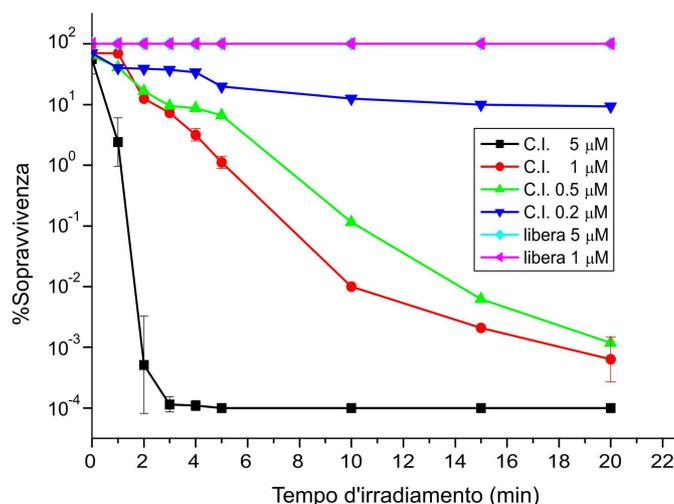


Fig. 19: Sopravvivenza di cellule di *S. aureus* MRSA dopo 30 min d'incubazione con TDPyP libera ed incorporata in complessi d'inclusione formati da ciclodestrine (C.I.) $\text{SC}_6\text{NH}_3\text{Cl}$ (1:10) a varie concentrazioni (0.2–0.5–1 e 5 μM) e dopo vari tempi d'irradiamento con luce bianca (100 mW/cm^2).

Per valutare l'effettiva efficacia di questo tipo di veicolante, è stata paragonata l'attività della porfirina incorporata in ciclodestrine rispetto alla stessa incorporata in liposomi cationici DOTAP alla concentrazione 1 μM dopo 30 min d'incubazione. Come si può notare in Fig.20 la maggiore efficacia del veicolante composto da ciclodestrine è visibile già dopo 2 min di irradiazione e rimane costante fino a 20 min di irradiazione dove il calo di sopravvivenza è di circa 5 log per le ciclodestrine e circa 4 log per i liposomi cationici.

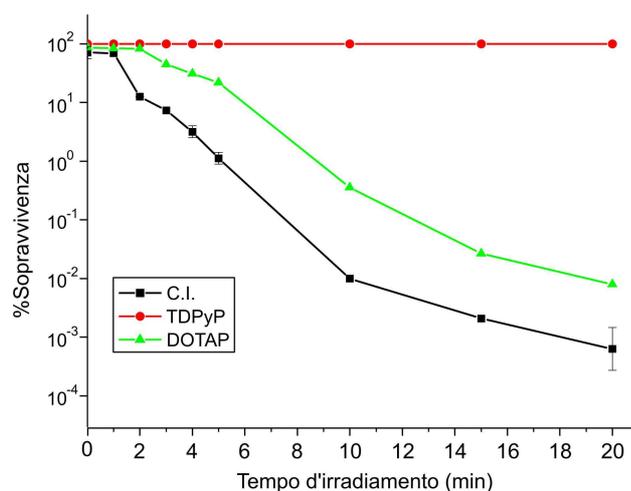


Fig. 20: Sopravvivenza di cellule di *S. aureus* MRSA dopo 30 min d'incubazione con TDPyP 1 μ M libera ed incorporata in complessi di ciclodestrine (C.I.) SC₆NH₃Cl (1:10) dopo vari tempi d'irradiazione con luce bianca (100 mW/cm²).

Vista la grande efficacia delle ciclodestrine nel promuovere la fotoinattivazione di batteri Gram-positivi da parete di TDPyP, si è testata la stessa formulazione su un ceppo Gram-negativo: *Escherichia coli* 04.

Sono state utilizzate due concentrazioni di TDPyP (5 e 10 μ M; 30 min di incubazione); dopo 10 min di irradiazione a 100 mW/cm² (Fig.21), si osserva un calo di 4.5 log nella crescita di questo batterio, calo che raggiunge i 6 log dopo 25 min di irradiazione.

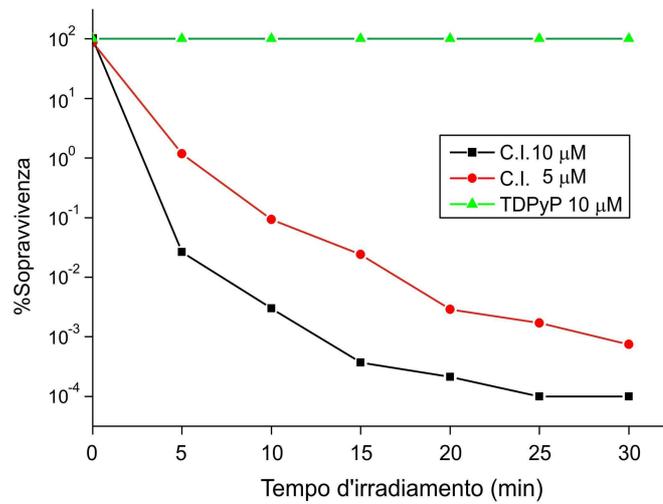


Fig. 21: Sopravvivenza di cellule di *E. coli* 04 dopo 30 min d'incubazione con TDPyP 5 e 10 μM libera ed incorporata in complessi d'inclusione formati da ciclodestrine (C.I.) $\text{SC}_6\text{NH}_3\text{Cl}$ (1:10) dopo vari tempi d'irradiamento con luce bianca (100 mW/cm^2).

Una diminuzione del tempo di incubazione da 30 a 5 min, in cellule di *S. aureus* MRSA, non comporta sostanziali cambiamenti nel calo della sopravvivenza batterica, mentre se la stessa variazione nel tempo d'incubazione è applicata nel caso del ceppo Gram-negativo, si osserva una diminuzione sensibile nella cinetica di morte cellulare (Fig.22).

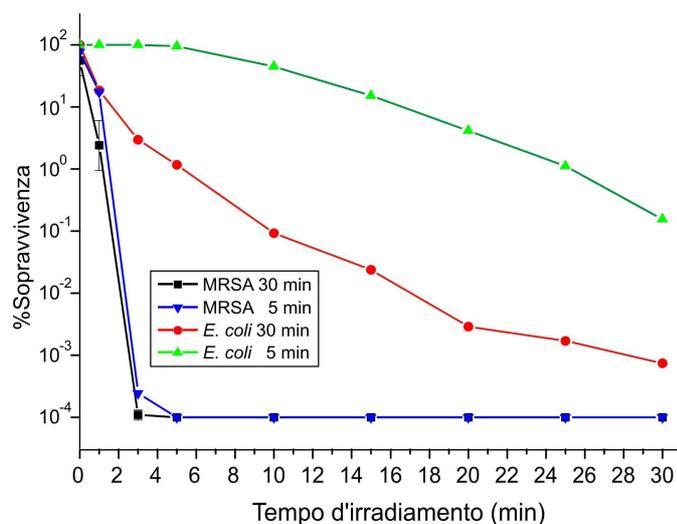


Fig. 22: Sopravvivenza di cellule di *E. coli* 04 e *S. aureus* MRSA dopo 5 e 30 min d'incubazione con TDPyP 5 μ M libera ed incorporata in complessi d'inclusione formati da ciclodestrine (C.I.) SC₆NH₃Cl (1:10) dopo vari tempi d'irradiazione con luce bianca (100 mW/cm²).

Sono state effettuate ulteriori indagini al microscopio elettronico per spiegare questo risultato. Dopo incubazione di TDPyP incorporata in ciclodestrine SC₆NH₃Cl per 30 e 5 min con *E. coli* e *S. aureus* MRSA, le cellule sono state incluse in resina per le successive osservazioni.

In TAV.1a-b si possono osservare cellule di *S. aureus* MRSA di controllo, che presentano la tipica morfologia di batteri Gram-positivi, dove è visibile la parete di peptidoglicano e la membrana interna. Le micrografie di TAV.1c-d mostrano cellule incubate per 5 min con TDPyP 5 μ M incorporata in complessi di ciclodestrine; è visibile al di fuori della parete un alone più scuro e frastagliato rispetto al controllo (a,b) che rappresenta le ciclodestrine adese in parete. Le foto di TAV.1e-f si riferiscono all'incubazione prolungata per un totale di 30 min; non vi sono sostanziali differenze ed in parete appare la medesima quantità di ciclodestrine adese. Per quanto riguarda, invece, cellule di *E. coli* (TAV.2), vi è una netta differenza tra le cellule incubate per solo 5 min (TAV.2c-d) dove la maggior parte dei complessi di ciclodestrine sono adesi alla membrana esterna

del batterio, che perde l'aspetto liscio tipico delle cellule di controllo (TAV.2a-b): sono chiaramente visibili la membrana esterna, lo strato di peptidoglicano e la membrana interna. Dopo 30 min d'incubazione, è possibile osservare la presenza delle ciclodestrine anche nella parte interna della membrana, il che dimostra un passaggio dei veicolanti attraverso membrana esterna e parete.

➤ *Acanthamoeba palestinensis*

Le cellule di *A. palestinensis* sono state irradiate con luce rossa (600–700 nm) ad una velocità di fluena di 50 mW/cm^2 , in quanto tale intervallo di lunghezze d'onda è assorbito con particolare efficienza dal fotosensibilizzatore ftalocianinico utilizzato per questi specifici esperimenti.

Come si osserva in Fig.23, in presenza di ftalocianina tetracationica RLP068, si ottiene nei trofozoiti una mortalità che è praticamente del 100% a 1 h di incubazione con una concentrazione di $2 \mu\text{M}$ dopo 10 min di irradiazione.

Per quanto riguarda la forma cistica, più resistente, è necessario aumentare la concentrazione di ftalocianina fino a $5 \mu\text{M}$ e il tempo d'irradiazione fino a 20 min, al fine di ottenere analoghi livelli di mortalità.

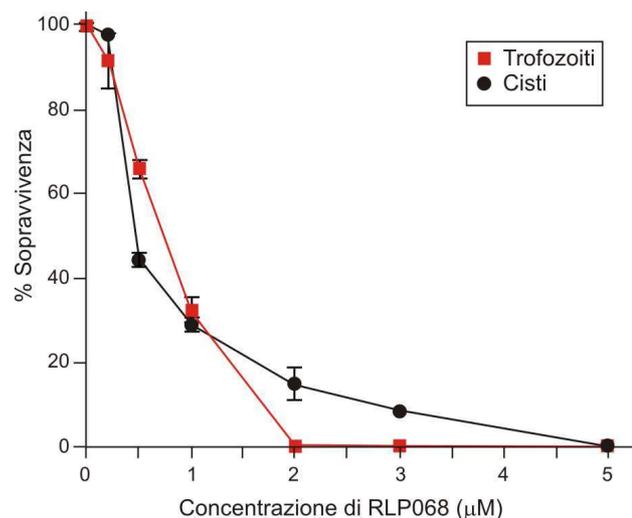


Fig. 23: Sopravvivenza di trofozoiti e cisti di *A. palestinensis* dopo 1 h d'incubazione con RLP068 a varie concentrazioni e irradiazione di 10 min (trofozoiti) e 20 min (cisti) con velocità di fluena di 50 mW/cm^2 (600–700 nm).

Alla concentrazione di RLP068 pari a 2 μM e dopo 10 min d'irradiamento (Fig.24), infatti, la sopravvivenza risulta essere del 50% (IC_{50}).

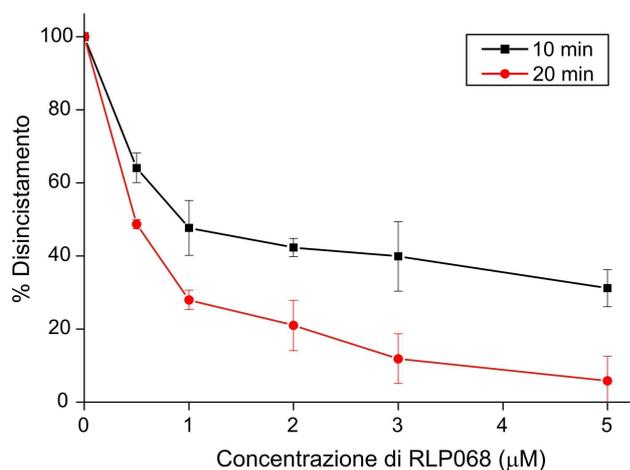


Fig. 24: Sopravvivenza di cisti di *A. palestinensis* dopo 1 h d'incubazione con RLP068 a varie concentrazioni e irradiazione di 10 min e 20 min (50 mW/cm^2 ; 600–700 nm).

Per valutare il danno cellulare dopo irradiazione, le cellule dei protozoi sono state osservate al microscopio ottico ed elettronico. Sfruttando l'emissione della ftalocianina nella regione rossa dello spettro sono stati determinati i siti di accumulo in trofozoiti e cisti. Dopo 1 h di incubazione con RLP068 5 μM in cellule allo stato vegetativo, si può notare che il fotosensibilizzatore è maggiormente localizzato a livello del vacuolo contrattile (TAV.3a); mentre nelle cellule irradiate la fluorescenza appare diffusa in tutto il citoplasma (TAV.3b). La ftalocianina tetracationica appare anche in grado di attraversare la parete cistica ed è accumulata in diversi siti subcellulari tra cui la doppia parete (TAV.3c); dopo irradiazione delle cisti l'intensità della fluorescenza appare notevolmente ridotta.

E' stata effettuata una serie di osservazioni al microscopio ottico a contrasto interferenziale a 5 giorni dal trattamento delle cisti e dopo aggiunta di terreno fresco. Si è potuto notare (TAV.4) come, a differenza delle cisti di controllo, che non riportavano alcun tipo di danno e lasciavano emergere il trofozoite dal guscio cistico (TAV.4a-b), così come cisti trattate a basse concentrazioni (0.5 μM) di ftalocianina, (TAV.4c-d); cisti trattate con ftalocianina 1 μM (TAV.4e-f) o 2 μM (TAV.4g-h) apparivano danneggiate e non vi era presenza nella coltura di trofozoiti, che indicava il loro mancato disincistamento. Per valutare ulteriormente il danno alla parete, le cisti sono state sottoposte a colorazione con rosso congo, colorante specifico per la cellulosa. Dopo trattamento con ftalocianina 0.5 μM , si può notare (TAV.5b) il danno di parete che diventa sempre più marcato all'aumentare della concentrazione di ftalocianina (3-5 μM) (TAV.5c-f). Nessun danno è rilevabile, invece, in cellule di controllo (a), dove è presente una popolazione eterogenea composta da: cisti mature con doppia parete ben definita e cisti immature più piccole con parete meno evidente.

L'indagine al TEM ha permesso di valutare i danni all'ultrastruttura cellulare dopo inclusione in resina Polybed.

In cellule di controllo (TAV.6a-b), sono visibili gli organelli della cellula, in particolare complesso di Golgi, vacuolo contrattile, mitocondri e membrane nucleare e plasmatica. In TAV.6c-d sono mostrate due micrografie, ottenute dopo la sola incubazione al buio con RLP068 2 μM dove si può vedere (c) il vacuolo contrattile formato dalla fusione di varie vescicole e (d) l'intera cellula con membrana frastagliata, per la presenza di pseudopodi, tipica del protozoo, che non sembra aver subito modificazioni dopo la sola incubazione al buio con la ftalocianina. Dopo 10 min d'incubazione e 10 min d'irradiazione a 50 mW/cm^2 (600-700 nm) si può notare (f) una vacuolizzazione del citoplasma con formazione di vere e proprie vescicole circondate da membrana; non si osserva, invece, danno alla membrana citoplasmatica e nucleare. Aumentando di 10 min il tempo d'incubazione (20 min) e tenendo invariate le altre condizioni, si può notare (g-h) un ulteriore aumento della vacuolizzazione citoplasmatica senza perdita della continuità della membrana plasmatica. Non sembra esserci, invece, danno importante ai mitocondri che appaiono solo leggermente rigonfi.

Ulteriori indagini sul tipo di danno, utilizzando il test delle caspasi-3, enzima altamente conservato, hanno fatto escludere l'insorgere di un fenomeno di tipo apoptotico in trofozoiti di *A. palestinensis*.

7. Attivita' enzimatiche

➤ *Staphylococcus aureus* MRSA

Per valutare ulteriormente il danno cellulare in cellule di MRSA sottoposte ad incubazione con TDPyP 10 μ M libera od incorporata in liposomi DOTAP dopo 5 min d'incubazione e 5 min d'irradiamento, sono state testate le attività di due diversi enzimi, tipici marker di membrana: succinico deidrogenasi e lattico deidrogenasi NAD-indipendente.

In molti batteri, tra cui *S. aureus*, è presente questo tipo di lattico deidrogenasi che non prevede il NAD/NADH come coenzima. A differenza della lattico deidrogenasi NAD-dipendente, quest'enzima non ha sede citoplasmatica ma è un tipico enzima di membrana (Garvie, 1980).

E' un enzima importante per gli organismi catalasi-positivi, incapaci di usare il lattato come fonte di carbonio. La sua funzione prevede la catalizzazione della reazione che da lattato forma piruvato e spesso non è noto l'accettore finale degli elettroni, anche se sembra essere una proteina flavinica.

Come si vede in Fig.25, se si procede all'incubazione e al successivo irradiamento con la porfirina libera, gli enzimi mantengono un'attività pari al 70% per quanto riguarda la SDH, e pari al 80% per la LDH, rispetto al controllo. Se la porfirina è somministrata, invece, via veicolante DOTAP si ha un calo dell'attività dell'SDH pari al 75% e della LDH pari al 85% rispetto a cellule di controllo.

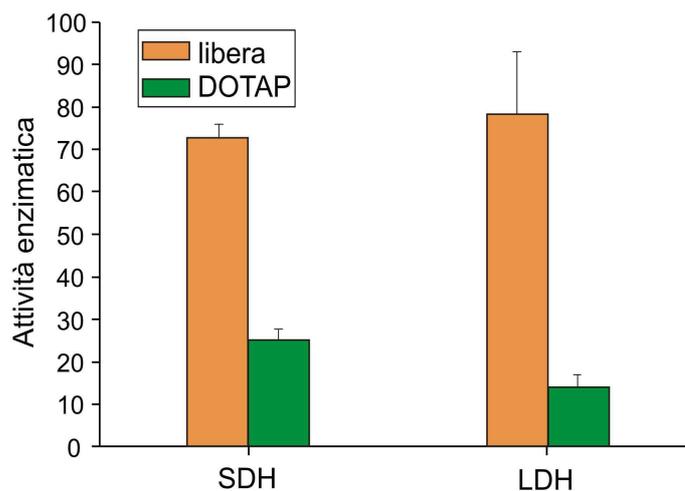


Fig. 25: Effetto dell'irradiamento su succinico e lattico deidrogenasi di cellule di *S. aureus*.

Le attività enzimatiche di cellule di *S. aureus* MRSA sono state determinate dopo 5 min d'incubazione con TDPyP 10 μM libera ed incorporata in liposomi cationici DOTAP e 5 min d'irradiamento con luce bianca ad una velocità di fluenza di 100 mW/cm^2

➤ *Acanthamoeba palestinensis*

Per individuare il danno cellulare, anche nel caso dei trofozoiti di *A. palestinensis* sono state valutate, dopo irradiamento, le attività di tre diversi enzimi, due a sede mitocondriale (succinico deidrogenasi e NADH deidrogenasi) e uno a sede citoplasmatica (lattico deidrogenasi).

Come si vede in Fig.26 le attività degli enzimi con sede mitocondriale non viene per nulla intaccata (100% di attività) dopo 20 min d'incubazione con RLP068 2 μM e 10 min d'irradiamento (600-700 nm; 50 mW/cm^2); mentre per quanto riguarda l'enzima citoplasmatico lattico deidrogenasi, si ha una calo del 30-35% nell'attività enzimatica.

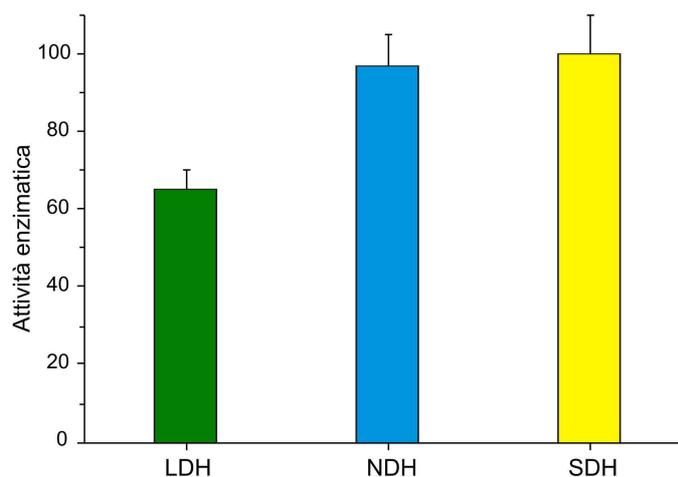


Fig. 26: Effetto dell'irradiamento su succinico, lattico e NADH deidrogenasi di trofozoiti di *A. palestinensis*.

Le attività enzimatiche dei trofozoiti sono state determinate dopo 20 min d'incubazione con RLP068 2 μ M e 20 min d'irradiamento con luce rossa ad una velocità di fluenza di 50 mW/cm².

Discussione

Come indicato nello scopo della tesi, le ricerche sviluppate si sono concentrate sulla possibilità di ottimizzare l'efficacia della terapia fotodinamica antimicrobica attraverso l'associazione dell'agente fotosensibilizzante con opportuni veicolanti. Era, infatti, stato accertato che il trasporto e la successiva internalizzazione degli agenti fotosensibilizzanti da parte delle cellule microbiche può essere modulato associando il fotosensibilizzatore con specifici trasportatori come peptidi, polilisina e antibiotici (Hamblin *et al.*, 2001). L'uso di liposomi, sinora sperimentato per la somministrazione di agenti fotodinamici antitumorali (Reddi *et al.*, 1990), rappresenta un'innovazione in campo antimicrobico. I risultati ottenuti nel caso delle ricerche riferite a questa tesi dimostrano che, per il batterio Gram-positivo *Staphylococcus aureus* meticillina-resistente (MRSA), l'efficienza del processo d'interazione delle cellule con il fotosensibilizzatore e del processo di fotoinattivazione sono molto influenzati dalle proprietà del liposoma e dalla natura del fotosensibilizzatore incorporato. E' stato, sinora, studiato un limitato numero di veicolanti: tuttavia un'analisi complessiva dei dati sperimentali suggerisce che i migliori risultati si raggiungano utilizzando vescicole con elevato grado di fluidità (a temperatura fisiologica) e dotate di carica positiva, come nel caso dei liposomi DOTAP e delle ciclodestrine SC₆NH₃Cl.

Da esperimenti di accumulo (Fig.11) si può notare come la quantità di fotosensibilizzatore, recuperata nel caso di incubazione delle cellule batteriche con Chl incorporata in liposomi di varia natura, sia paragonabile alla quantità recuperata dalle medesime cellule in caso d'incubazione con la stessa sostanza in forma libera. In ogni caso, i fotosensibilizzatori incorporati in liposomi cationici DOTAP, soprattutto l'HP, risultano essere più saldamente legati alla cellula, dato che non sono facilmente rimossi da successivi lavaggi in PBS. Liposomi neutri, sia fluidi come i DMPC che solidi come i DPPC, non inducono un legame altrettanto stabile tra fotosensibilizzatore e cellula ed, in effetti, i fotosensibilizzatori veicolati per mezzo di questi liposomi sono rimossi

facilmente mediante lavaggi in PBS. Il maggior accumulo di fotosensibilizzatori indotto dall'uso di liposomi cationici DOTAP nelle cellule di MRSA potrebbe essere dovuto ad una interazione di tipo elettrostatico tra la carica positiva del veicolante ed i numerosi gruppi carichi negativamente presenti alla superficie della cellula batterica, in conseguenza dell'elevato contenuto in acidi teicoici e teicuronici. Non necessariamente vi è una correlazione tra la quantità di fotosensibilizzatore legata alle cellule ed il grado di fotosensibilizzazione. Le cellule di MRSA, infatti, incubate con Chl incorporata in liposomi DOTAP, nonostante un buon accumulo, non presentano un'apprezzabile diminuzione nella sopravvivenza batterica (Fig15), anche adottando drastici protocolli di irradiazione. Questo risultato potrebbe essere imputabile ad una bassa produzione delle specie reattive quali $^1\text{O}_2$, che, anche in campo antimicrobico, risulta essere il principale intermedio fotoreattivo (Berg, 1996). Tuttavia, le cellule di MRSA vengono fotosensibilizzate in maniera estesa quando la clorina è incubata in forma libera allo stato monomero, il che indica o l'insorgere di meccanismi di fotosensibilizzazione di tipo I (che non coinvolgono l'intervento della specie $^1\text{O}_2$) o una localizzazione della Chl in siti critici per la sopravvivenza delle cellule di MRSA: in questo modo, pur in presenza di una resa quantica di $^1\text{O}_2$ relativamente bassa (dell'ordine di 0.1), si può giustificare l'efficienza del fotoprocesso sulla base di un'elevata probabilità di reazione tra $^1\text{O}_2$ ed i costituenti di tali siti. La bassa fotoattività riscontrata dopo incubazione in liposomi DOTAP non sembra dovuta all'alterazione delle sue proprietà chimico-fisiche dopo incorporazione, come il grado di aggregazione, in quanto gli studi spettroscopici mostrano chiaramente la presenza della Chl nei liposomi in forma monomera. E' dimostrato, infatti, che le proprietà fotofisiche come la resa quantica di formazione dell' $^1\text{O}_2$ sia minore in caso di aggregazione (Berg, 1996), fenomeno favorito in caso di compartimentazione (Whitten, 1978).

Una spiegazione del calo di fotoattività è suggerita da studi di anisotropia di fluorescenza (Fig.9). Abbiamo potuto evincere come la presenza di Chl sia causa di profonde alterazioni nell'architettura tridimensionale delle vescicole lipidiche, fatto che si traduce in un drastico aumento della loro rigidità. Questo cambiamento può interferire con l'interazione Chl-cellula prevenendo il

trasferimento del fotosensibilizzatore dal liposoma ai siti critici per la sopravvivenza cellulare.

Al contrario l'HP appare essere efficacemente internalizzata nelle cellule batteriche, anche nel caso della sua incorporazione in liposomi DOTAP, e la struttura di questi ultimi non appare modificata dalla presenza della porfirina. L'HP può orientarsi attraverso siti polari nella membrana liposomiale, in accordo con il suo basso coefficiente di partizione n-ottanolo/acqua (Kessel, 1986). La modulazione dell'efficienza di fotosensibilizzazione da parte delle proprietà di partizionamento nel veicolante è particolarmente evidente nel caso dell'HP. In Fig.16 si può vedere come l'HP legata ai DOTAP sia più attiva rispetto alla porfirina libera e a quella legata ai DPPC o DMPC. La bassa efficienza di inattivazione osservata per l'HP in forma libera è facilmente spiegata dall'aggregazione di quest'ultima in ambiente acquoso, come mostrato dallo spettro della porfirina in PBS. L'HP all'interno di liposomi tende a localizzarsi nell'interfaccia più interna lipide/acqua e non mostra tendenza a diffondere nei domini lipidici (Ricchelli *et al.*, 1991; Campbell *et al.*, 2001). Nei liposomi DPPC è stata osservata una localizzazione nel monostrato esterno solo nel caso di aumento significativo della fluidità del sistema. Nel caso dei liposomi DMPC, l'HP si va a posizionare principalmente nel foglietto esterno, ipotesi in accordo con il maggior rilascio della sostanza incorporata alle cellule. I liposomi DOTAP oltre ad un elevato grado di fluidità sono dotati di carica positiva che permette loro un forte legame alle cellule batteriche. I DOTAP con HP incorporata sembrano giocare due ruoli nei sistemi studiati, garantire, cioè, un importante e durevole accumulo del fotosensibilizzatore alla cellula e indurre un maggior grado di fotosensibilizzazione se paragonato ad altre modalità di trasporto dell'HP. Questi risultati suggeriscono che l'uso di vescicole liposomiali, come trasportatori di fotosensibilizzatori per la PDT in campo antimicrobico, possa essere utile al fine di utilizzare fotosensibilizzatori anche non-cationici con elevata resa quantica intrinseca di formazione di $^1\text{O}_2$ ma con scarsa efficienza d'accumulo. La sinergia tra carica positiva e alto grado di fluidità del trasportatore lipofilo ottimizza quindi l'accumulo nelle cellule batteriche e la successiva fotoattività. In particolare, il fotosensibilizzatore deve essere

localizzato nel dominio esterno polare della vescicola al fine di facilitarne il rilascio alle cellule (Ferro *et al.*, 2006 A).

Il fotosensibilizzatore cationico TDPyP è derivato dalla meso-trifenil-piridil-porfina in cui l'atomo di azoto piridilico è stato quaternizzato con l'aggiunta di una catena di 12 atomi di carbonio (Ferro *et al.*, 2007). Gli studi fotofisici iniziali hanno dimostrato un'efficiente produzione di $^1\text{O}_2$ (ϕ_{Δ} : 0.95), che riesce a garantire una buona attività fotosensibilizzatrice. Nonostante l'alto valore di resa quantica di formazione di $^1\text{O}_2$, molto maggiore rispetto alle altre porfirine usate in campo antimicrobico (Reddi *et al.*, 2002), la TDPyP in soluzione acquosa mostra una bassissima attività fotosensibilizzatrice, (Fig.14) di molto inferiore rispetto a quella di HP e di Chl. Irradiamenti di cellule di MRSA fino a 30 min in presenza di TDPyP 10 μM provocano un calo di soli 3 log nella sopravvivenza microbica. Questo risultato potrebbe essere spiegato da un veloce fotodegradazione della porfirina dopo irradiazione con luce bianca (Fig.8a), la concentrazione del fotosensibilizzatore è ridotta del 37% dopo i primi 5 min d'irradiazione. Il processo di fotodegradazione, tuttavia, non è accompagnato dalla comparsa di nuove bande di assorbimento nel visibile, il che indica che non vi è formazione di fotoprodotto che potrebbero modificare l'attività della porfirina oppure agire a loro volta da fotosensibilizzatori. L'incorporazione della porfirina monocationica nelle vescicole liposomiali neutre sia allo stato fluido (DMPC) che solido (DPPC) a temperatura fisiologica di 37°C, non induce un apprezzabile cambiamento nell'attività fotosensibilizzatrice della TDPyP (Fig.17). Questi risultati sono in accordo con quelli ottenuti precedentemente utilizzando HP e Chl (Ferro *et al.*, 2006 A) e dimostrano come i liposomi neutri agiscano da barriera prevenendo l'interazione iniziale tra i gruppi funzionali cationici della porfirina e le cariche negative presenti sulla superficie batterica.

La TDPyP è incorporata in maniera efficiente anche in liposomi cationici, nonostante la sua carica positiva, questo è visibile dallo spettro della porfirina che dimostra la sua forma monomera nella banda di Soret a 420 nm (Reddi e Jori, 1988). Probabilmente le proprietà idrofobiche dovute al macrociclo

aromatico prevalgono sull'eventuale repulsione elettrostatica indotta dalla presenza di cariche positive sia nel fotosensibilizzatore che nel fosfolipide.

Quando i lipidi DOTAP sono utilizzati come veicolanti della TDPyP è possibile apprezzare un potenziamento della sua attività fotocida (Fig.17). Dopo 5 e 10 min d'irradiazione vi è un calo nella sopravvivenza batterica, rispettivamente di 4.5 e 6 log. La diminuzione del tempo d'incubazione fino a 5 min (Fig.18a) o la diminuzione della concentrazione di porfirina nel mezzo d'incubazione fino a 5 μ M (Fig.18b) provocano un trascurabile cambiamento nella cinetica di fotoinattivazione batterica. Questo dimostra come la sostanza incorporata nei liposomi DOTAP si leghi alle cellule con alta velocità. Il recupero di TDPyP da cellule di MRSA, incubate con la porfirina libera od incorporata in DOTAP, risulta maggiore nell'ultimo caso, anche se la differenza non è così importante da spiegare la grande differenza nell'efficacia di fotosensibilizzazione (Fig.12a). Nel caso della TDPyP incorporata in liposomi cationici non si osserva una veloce fotodegradazione nel picco massimo (Fig.8b) rispetto alla forma libera in PBS (Fig.8a), ma è osservabile, invece, un aumento del rumore di fondo (scattering) dovuto probabilmente alla formazione di materiale aggregato. Studi di assorbimento ed emissione di fluorescenza mostrano come la TDPyP legata alle cellule di MRSA dopo incubazione con il fotosensibilizzatore incorporato in liposomi DOTAP sia in uno stato monomero, mentre se la stessa porfirina è incubata in soluzione omogenea rimanga parzialmente aggregata, il che è visibile sempre dalla forma della banda di Soret. L'aggregazione della porfirina in queste ultime condizioni potrebbe contribuire alla riduzione dell'attività fotocida; è, infatti, dimostrato che le porfirine in forma oligomero abbiano tempi di vita del tripletto più corti e quindi una minor probabilità di generare intermedi reattivi in processi controllati dalla diffusione (Reddi *et al.*, 2002)

E' probabile che i liposomi cationici, anche in questo caso, abbiano un comportamento simile ad altri sistemi costituiti da policationi come la polilisina (Hamblin *et al.*, 2002), che, in un primo momento, agiscono disorganizzando l'architettura tridimensionale della parete batterica, probabilmente aumentando la permeabilità ad agenti chimici esterni, rendendo raggiungibile, quindi, la membrana citoplasmatica sede di molti bersagli dei processi fotosensibilizzati

(Polo *et al.*, 2000). Quest'ipotesi è supportata dai risultati ottenuti nel frazionamento delle cellule batteriche dopo incubazione di TDPyP. Come si vede in Fig.12b, la porfirina è recuperata in quantità significativamente maggiori dal protoplasto quando incubata incorporata in DOTAP, piuttosto che in forma libera; il che suggerisce come la membrana citoplasmatica rappresenti un bersaglio primario in questo processo. In accordo con questa ipotesi sono anche i risultati sulle attività di due enzimi che sono tipici marker di membrana, la lattico e la succinico deidrogenasi che sono rapidamente inattivate durante i primi stadi del processo fotosensibilizzato (Fig.25) e che risultano invece, non modificate se cellule di MRSA sono irradiate in presenza della porfirina libera. Questi risultati dimostrano come l'associazione del fotosensibilizzatore con un veicolante che promuova il suo partizionamento nella membrana citoplasmatica attraverso la disorganizzazione della parete esterna aumenti fortemente l'attività antibatterica su cellule di MRSA, tipico ceppo antibiotico-resistente e con diminuita sensibilità all'azione fotodinamica (Jori e Brown, 2004). Una volta internalizzata dalle cellule la TDPyP diventa molto fotoattiva perchè dotata di precise proprietà: l'opportuno rapporto carica/idrofobicità permette alla sostanza di penetrare fino alla membrana citoplasmatica così che l'alta produzione di 1O_2 possa causare danni profondi ai bersagli nell'intorno della membrana citoplasmatica, come si evince dalla perdita di attività di enzimi di membrana. Il sinergismo tra fotosensibilizzatore debolmente cationico e liposomi cationici sembra essere una buona soluzione per realizzare un'efficace fotoinattivazione batterica.

Data l'ottima attività fotosensibilizzatrice della sostanza abbiamo provato ad incorporarla in un veicolante cationico con diversa struttura come le ciclodestrine. L'efficienza d'incorporazione in quest'ultime è molto elevata e l'attività fotocida della TDPyP è significativa anche a concentrazioni molto basse. La TDPyP incorporata in ciclodestrine è attiva alla concentrazione 1 μ M (Fig.19) dove è completamente inattiva in forma libera e vi è un incremento di mortalità di 1 log rispetto a quella incorporata in liposomi DOTAP (Fig.20). La differenza maggiore sta nella sua attività anche nei confronti di un ceppo Gram-negativo *E. coli*. Alla concentrazione 10 μ M dopo 30 min d'incubazione e 30 min

d'irradiamento vi è un calo di 6 log nella sopravvivenza batterica che si riduce di un solo log dimezzando la concentrazione a 5 μM (Fig.21). La porfirina libera, nei confronti dei Gram-negativi, è totalmente inattiva anche alla concentrazione 10 μM . Diminuendo il tempo d'incubazione (Fig.22) da 30 a 5 min nel ceppo Gram-positivo non si apprezzano sostanziali differenze, mentre nel Gram-negativo vi è una netta caduta nella cinetica di fotoinattivazione. Sembra, quindi, essere necessario un più lungo tempo d'incubazione affinché la sostanza riesca a penetrare nella più spessa e complicata architettura della parete che circonda i batteri Gram-negativi. Osservazioni al TEM hanno confermato quest'ipotesi. Cellule Gram-positive (TAV.1) non mostrano alcuna differenza dopo i due diversi tempi d'incubazione, mentre in cellule di *E. coli* (TAV.2) si può apprezzare la differenza di accumulo dei complessi d'inclusione costituiti dalle ciclodestrine dopo i diversi tempi d'incubazione. A 5 min (TAV.2c-d) sono accumulati in grande quantità nella parete esterna del batterio ma dopo 30 min (TAV.2e-f) si possono notare le ciclodestrine nella parte più interna della cellula, il che indica necessariamente un attraversamento della parete stessa. Evidentemente tale processo richiede, in questo caso, un tempo maggiore, ma porta a buoni risultati dopo irradiazione della TDPyP, che raggiunti i siti vitali può produrre specie attive che risultano, a questo punto, efficaci.

Fotosensibilizzatori con maggior numero di cariche positive, come la ftalocianina tetracationica RLP068, sono, invece, molto efficaci in forma libera. La loro incorporazione in liposomi cationici è, oltretutto, poco efficiente. La ftalocianina RLP068 è stata scelta per uno studio su un protozoo patogeno, *Acanthamoeba palestinensis*, responsabile nell'uomo di cheratiti, poichè è risultata essere molto attiva nei confronti di batteri Gram-positivi e negativi (Soncin *et al.*, 2002). Nella forma vegetativa del protozoo (Fig.23) vi è un calo nella sopravvivenza cellulare dell'80% dopo 10 min d'irradiazione (50 mW/cm^2) alla concentrazione 1 μM , che diventa pari al 100% alla concentrazione 2 μM . Anche nella forma cistica vi è una diminuzione nella sopravvivenza cellulare; aumentando il tempo d'irradiazione a 20 min e la concentrazione d'incubazione a 5 μM si ottiene un calo nella sopravvivenza del 100%. L'efficace fotoinattivazione del patogeno è, probabilmente, dovuta al forte legame che si

viene a creare con la ftalocianina. Studi di accumulo (Fig.13) dimostrano, infatti, che dopo 1 h d'incubazione con RLP068 alla concentrazione 2 μM sia possibile recuperare dai trofozoiti 0.2 nmoli per 10^5 cellule (Fig.13a) Per quanto riguarda la forma cistica (Fig.13b), lo stesso quantitativo di RLP068 è recuperato aumentando la concentrazione d'incubazione fino a 5 μM , quantità sufficiente, evidentemente, a provocare, dopo opportuno irradiazione, una mortalità pari al 100% in entrambi gli stadi cellulari. Studi al microscopio ottico a fluorescenza mostrano come nel caso dei trofozoiti, ci sia un sito preferenziale di accumulo (TAV.3a-b): il vacuolo contrattile. La fluorescenza della ftalocianina in corrispondenza di questo sito è netta e circoscritta per diventare più debole e diffusa dopo irradiazione, fatto probabilmente imputabile a fenomeni di fotodegradazione della ftalocianina, come pure ad una sua redistribuzione o ad un rilascio del materiale citoplasmatico nel mezzo esterno (TAV.3c).

L'accumulo al buio nel vacuolo contrattile, sede dell'osmoregolazione cellulare, non sembra provocare nessun cambiamento nella morfologia e nella vitalità dell'ameba. RLP068 è in grado anche di attraversare la parete cistica, come si può dedurre dalla fotoinattivazione delle cisti, ma anche da osservazioni al microscopio ottico a fluorescenza (TAV.3c-d) dove la fluorescenza risulta abbastanza disomogenea, fatto probabilmente dovuto all'asincronia della popolazione cistica, composta da cisti immature con parete incompleta e cisti mature dotate di doppia parete. La fluorescenza appare, comunque, molto concentrata a livello di parete ma, dopo irradiazione, risulta essere più intensa e diffusa, fatto probabilmente dovuto alla disaggregazione della sostanza con conseguente aumento della fluorescenza. La sopravvivenza cistica è valutata dopo 5 giorni dall'aggiunta di terreno fresco, tempo necessario al completo disincistamento di una popolazione cistica non danneggiata. In queste condizioni sperimentali sono state effettuate delle osservazioni al microscopio ottico a contrasto interferenziale. La popolazione di controllo (TAV.4a-b) appare quasi completamente disincistata ed i trofozoiti emersi dai gusci cistici appaiono in buono stato; si possono notare gli pseudopodi sviluppati, nucleo, nucleolo e vacuolo contrattile. Dopo trattamento (TAV.4c-d) con basse dosi di RLP068 (0.5 μM), vi è la presenza di una popolazione mista composta da trofozoiti e cisti. A

maggiori concentrazioni di RLP068 (TAV.4e-f) si possono notare cisti con parete danneggiata che presenta veri e propri buchi e un certo grado di condensazione citoplasmatica, fenomeni visibili anche a concentrazioni maggiori (TAV.4g-h).

Il danno alla parete cistica è particolarmente visibile dopo colorazione con rosso congo, colorante affine all'elemento maggiormente presente in parete: la cellulosa. La popolazione cistica di controllo (TAV.5a-b) appare, anche in questo caso, disomogenea, ma le cisti appaiono intatte e colorate di un rosso vivo, il che indica una parete non danneggiata e che ha mantenuto la sua contiguità. Dopo trattamento con RLP068 0.5 μM (TAV.5c-d), la densità della popolazione è notevolmente ridotta e vi è la presenza di detriti cellulari nel mezzo di coltura. A 3 e 5 μM , la popolazione è ulteriormente ridotta e le cisti presenti sono seriamente danneggiate a livello di parete e citoplasma (Ferro *et al.*, 2006 B).

Per quanto riguarda lo stadio vegetativo sono state fatte ulteriori indagini al microscopio elettronico a trasmissione sul danno ultrastrutturale dovuto alla PDT. In TAV.6a-b è possibile apprezzare la struttura di trofozoiti di controllo con membrana citoplasmatica e organelli interni quali mitocondri, vacuolo contrattile, nucleo, nucleolo, gocce di lipidi e glicogeno. Dopo incubazione di 20 min al buio (TAV.6c-d) alla concentrazione 2 μM le cellule non appaiono danneggiate. Dopo irradiazione (TAV.6e-f) compare a livello del citoplasma una massiccia vacuolizzazione che interessa l'intera superficie citoplasmatica. Le vescicole appaiono di varie dimensioni e sono circondate da membrana. E', inoltre, visibile un leggero rigonfiamento dei mitocondri, che tuttavia non riflette una perdita di attività di quest'ultimi. I test enzimatici sulle attività della NADH e succinico deidrogenasi, infatti, non riportano alcun danno a questi sistemi, mentre l'attività della lattico deidrogenasi, tipico marker citoplasmatico, risulta ridotta del 30-35% (Fig.26). Nucleo e nucleolo non appaiono danneggiati e membrana citoplasmatica e nucleare non sembrano perdere continuità. Il test per verificare un possibile evento apoptotico è risultato negativo, il che probabilmente indica una morte per necrosi.

Conclusioni

La ricerca e lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per il trattamento d'infezioni di origine microbica risultano essere sempre più urgenti in conseguenza della crescente diffusione del fenomeno dell'antibiotico-resistenza a livello mondiale, compresi i paesi più sviluppati. In questa prospettiva, la PDT sembra rappresentare un'efficace e promettente alternativa terapeutica, soprattutto nel caso d'infezioni microbiche o parassitarie localizzate, dove l'agente fotosensibilizzante può essere somministrato *in situ* mediante deposizione topica.

I principali vantaggi di questa terapia innovativa possono essere così delineati:

- ▶ ampio spettro d'azione degli agenti fotosensibilizzanti, in quanto, come anche dimostrato in questa tesi, l'azione fotocida si esplica in maniera efficace su batteri, lieviti, funghi e protozoi;
- ▶ bassa tendenza a selezionare ceppi fotoresistenti soprattutto per il carattere multi-bersaglio del processo fotodinamico che comporta la simultanea modifica di un vasto numero di componenti subcellulari rendendo improbabile lo sviluppo di processi di riparo e di inibizione del fotoprocesso (ad es. la sovraespressione di "stress proteins" o di fattori ad azione antiossidante);
- ▶ assenza di effetti mutageni dato il non coinvolgimento del materiale genetico almeno negli stadi iniziali del processo, ove avviene la maggior parte degli eventi responsabili della morte cellulare;
- ▶ efficacia d'azione indipendente dallo spettro di resistenza del patogeno agli antibiotici, questo aspetto è chiaramente esemplificato dai nostri studi su MRSA.

I dati disponibili in letteratura indicano concordemente che la massima efficienza fotosensibilizzatrice antimicrobica è caratteristica di derivati cationici, in quanto questi composti sono in grado di legarsi in tempi assai brevi con le cariche negative presenti sulla superficie delle cellule microbiche. Di conseguenza, la loro eccitazione induce un processo localizzato di modifica della

parete esterna, con successivo aumento della permeabilità e conseguente penetrazione del fotosensibilizzatore a siti più interni, la cui integrità è critica per la sopravvivenza cellulare. Fotosensibilizzatori con eguali caratteristiche fotofisiche, ma privi di cariche positive, non vengono accumulati nelle cellule in concentrazioni significative e non esplicano, quindi, la loro azione fototossica in misura importante.

Tuttavia, è possibile estendere il numero e il tipo di fotosensibilizzatori utilizzati per la PDT antimicrobica mediante la loro incorporazione in veicolanti cationici di natura idrofobica, come liposomi o ciclodestrine. Tali veicolanti consentono la localizzazione del fotosensibilizzatore nell'immediata prossimità della membrana citoplasmatica delle cellule microbiche, favorendo l'interazione tra le specie reattive fotogenerate (es. ossigeno di singoletto) ed i siti bersaglio della membrana. Allo stesso tempo, l'incorporazione dei fotosensibilizzatori carichi positivamente all'interno dei veicolanti cationici consente di esaltarne l'attività fotocida, probabilmente a causa dell'azione disorganizzante dell'architettura tridimensionale della parete esterna svolta da tali veicolanti.

Dagli studi effettuati è emerso che il sinergismo tra carica positiva e fluidità del veicolante rappresenta una condizione ottimale per l'accumulo cellulare ed il successivo trattamento mediante terapia fotodinamica.

Tavole

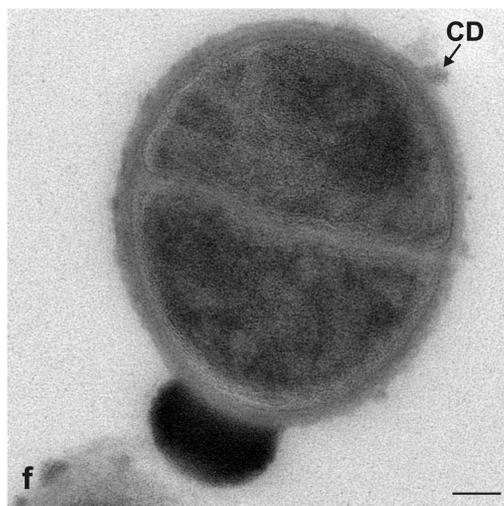
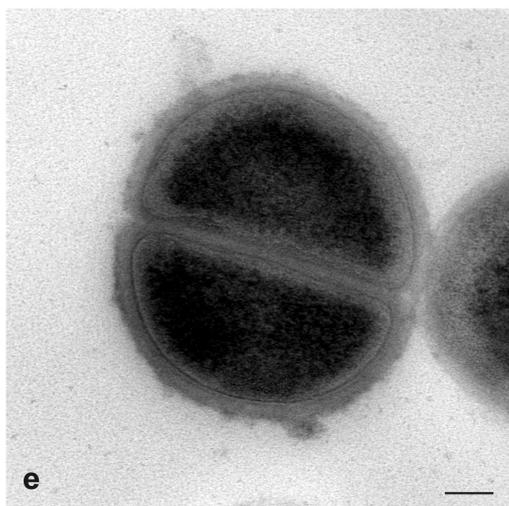
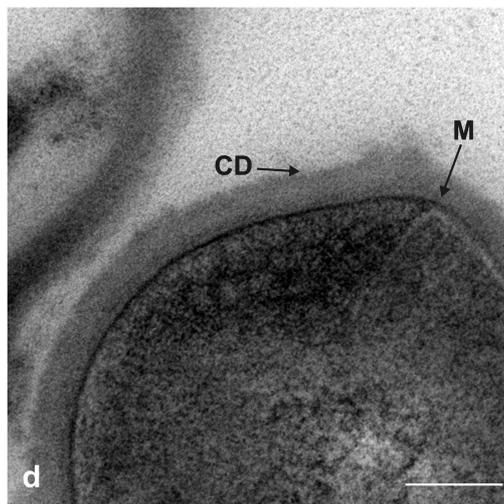
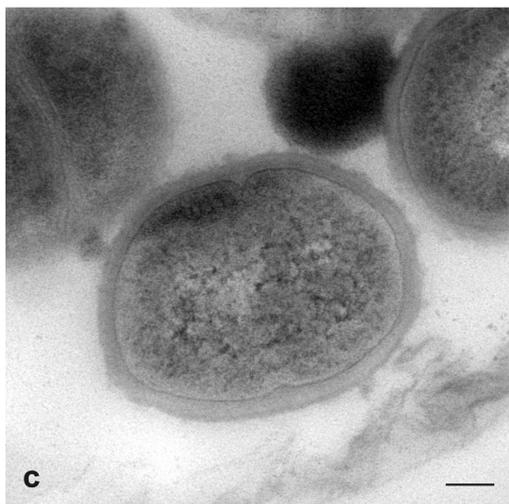
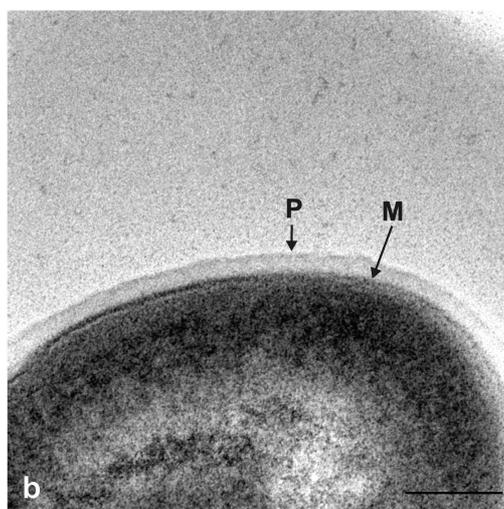
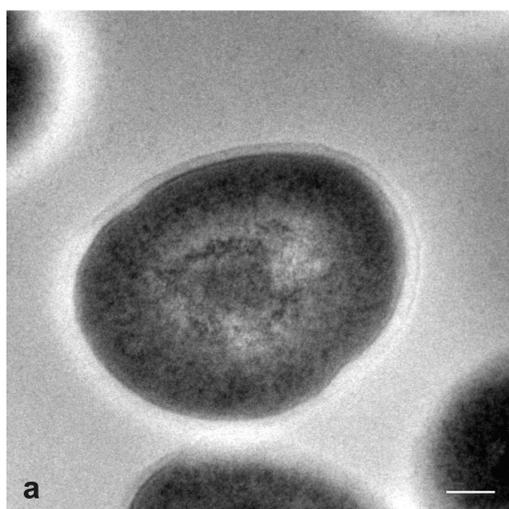
TAV.1: Immagini al microscopio elettronico a trasmissione di cellule di *Staphylococcus aureus* MRSA

a,b) cellule di controllo (P: parete; M: membrana citoplasmatica);

c,d) cellule incubate per 5 min con TDPyP 10 μ M incorporata in complessi di ciclodestrine SC₆NH₃Cl (1:10) (M: membrana citoplasmatica; CD: ciclodestrine);

e,f) cellule incubate per 30 min con TDPyP 10 μ M incorporata in complessi di ciclodestrine SC₆NH₃Cl (1:10) (CD: ciclodestrine).

barra = 100 nm



TAV.2: Immagini al microscopio elettronico a trasmissione di cellule di
Escherichia coli

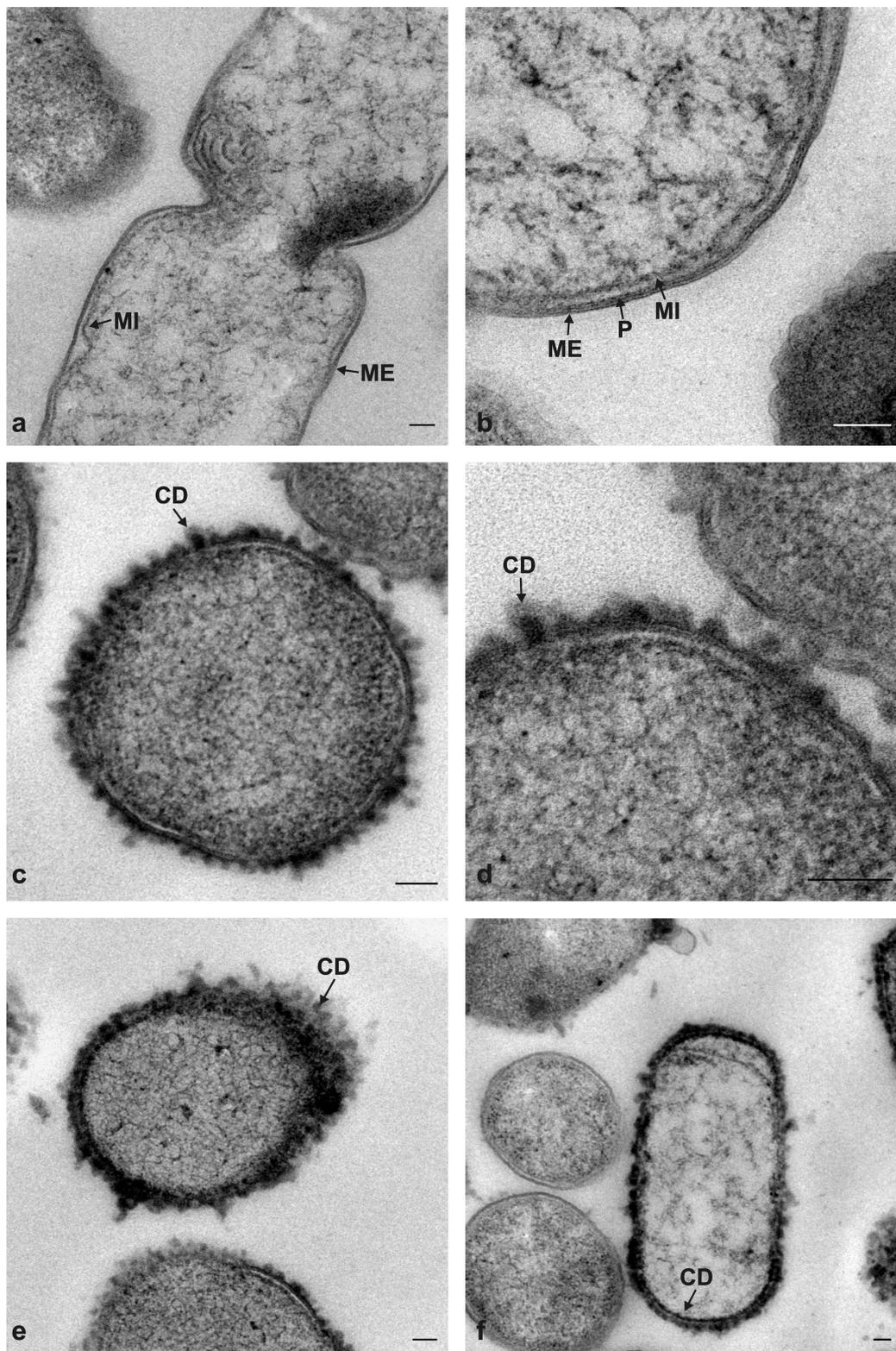
a,b) cellule di controllo

(ME: membrana esterna; P: parete; MI: membrana citoplasmatica
interna);

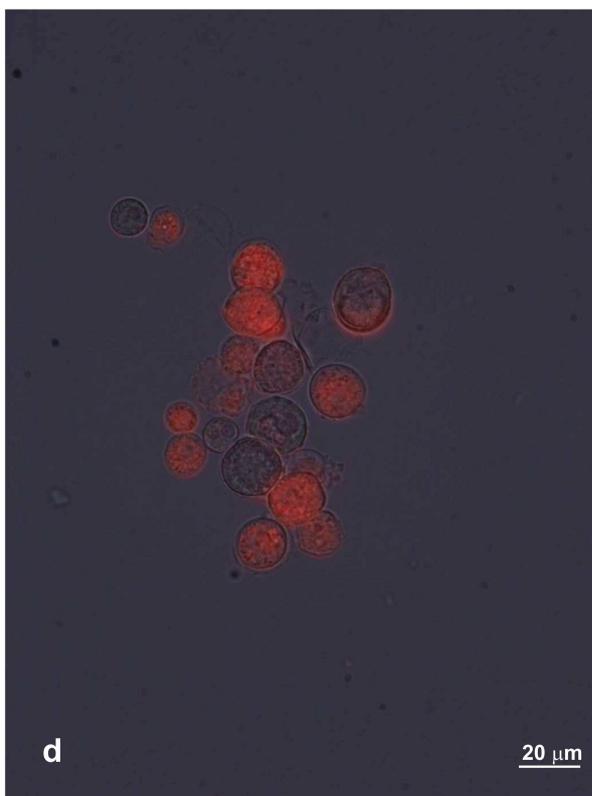
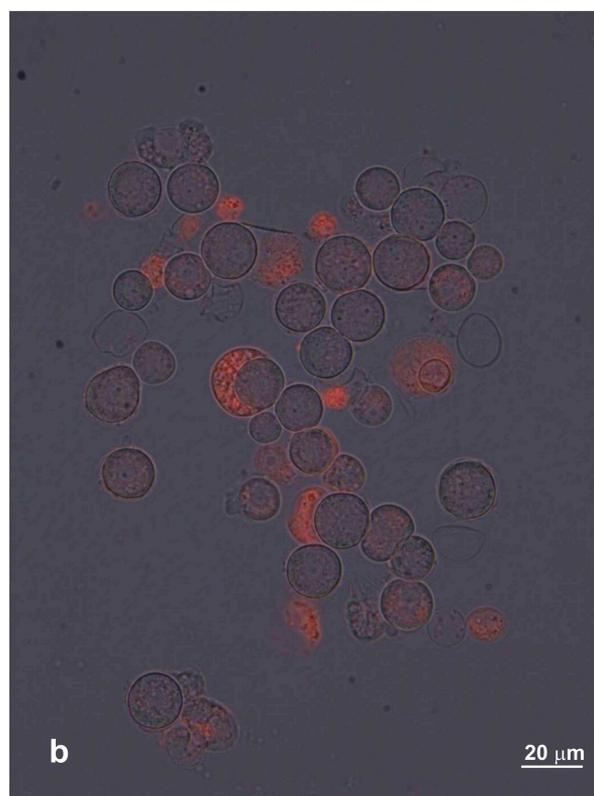
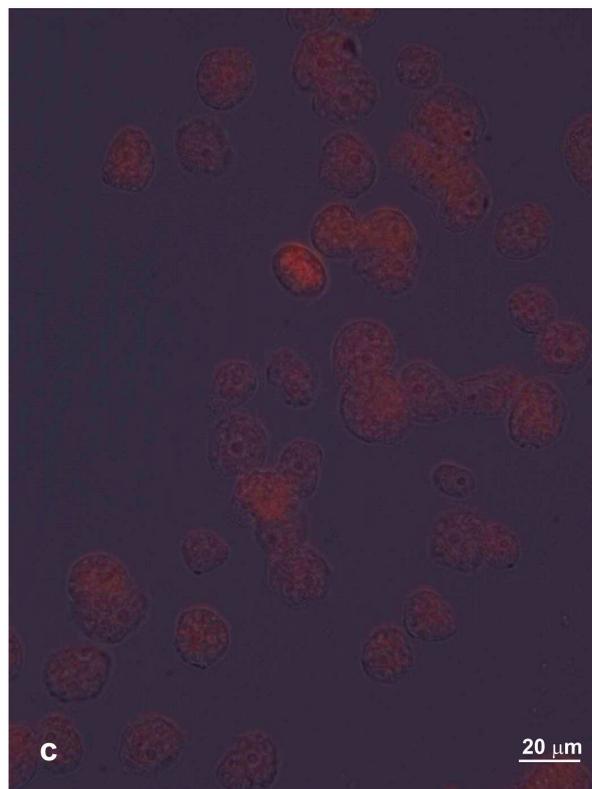
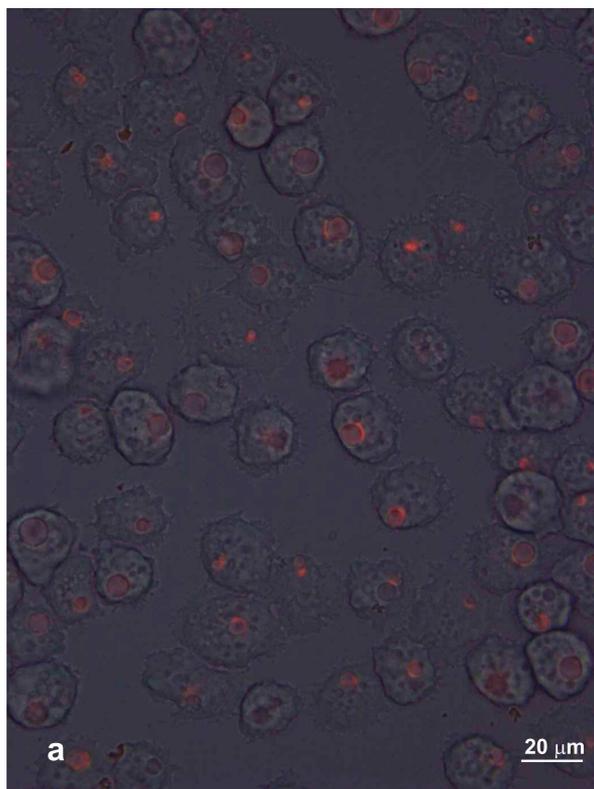
c,d) cellule incubate per 5 min con TDPyP 10 μ M incorporata in complessi
di ciclodestrine SC₆NH₃Cl (1:10) (CD: ciclodestrine);

e,f) cellule incubate per 30 min con TDPyP 10 μ M incorporata in complessi
di ciclodestrine SC₆NH₃Cl (1:10) (CD: ciclodestrine).

barra = 100 nm



TAV.3: Trofozoiti (a-c) e cisti (b-d) di *A. palestinensis* incubate con RLP068 10 μ M per 1 h (a-b) e irradiate per 10 min (c-d); 50 mW/cm²; 600-700 nm. Sovrapposizione di immagini di fluorescenza (filtro di eccitazione a 620-660 nm e filtro di emissione a 700-775 nm) e in campo chiaro.



TAV. 4: Immagini al microscopio ottico a contrasto interferenziale di una coltura cistica di *A. palestinensis* a 5 giorni dal trattamento e dall'aggiunta di terreno fresco.

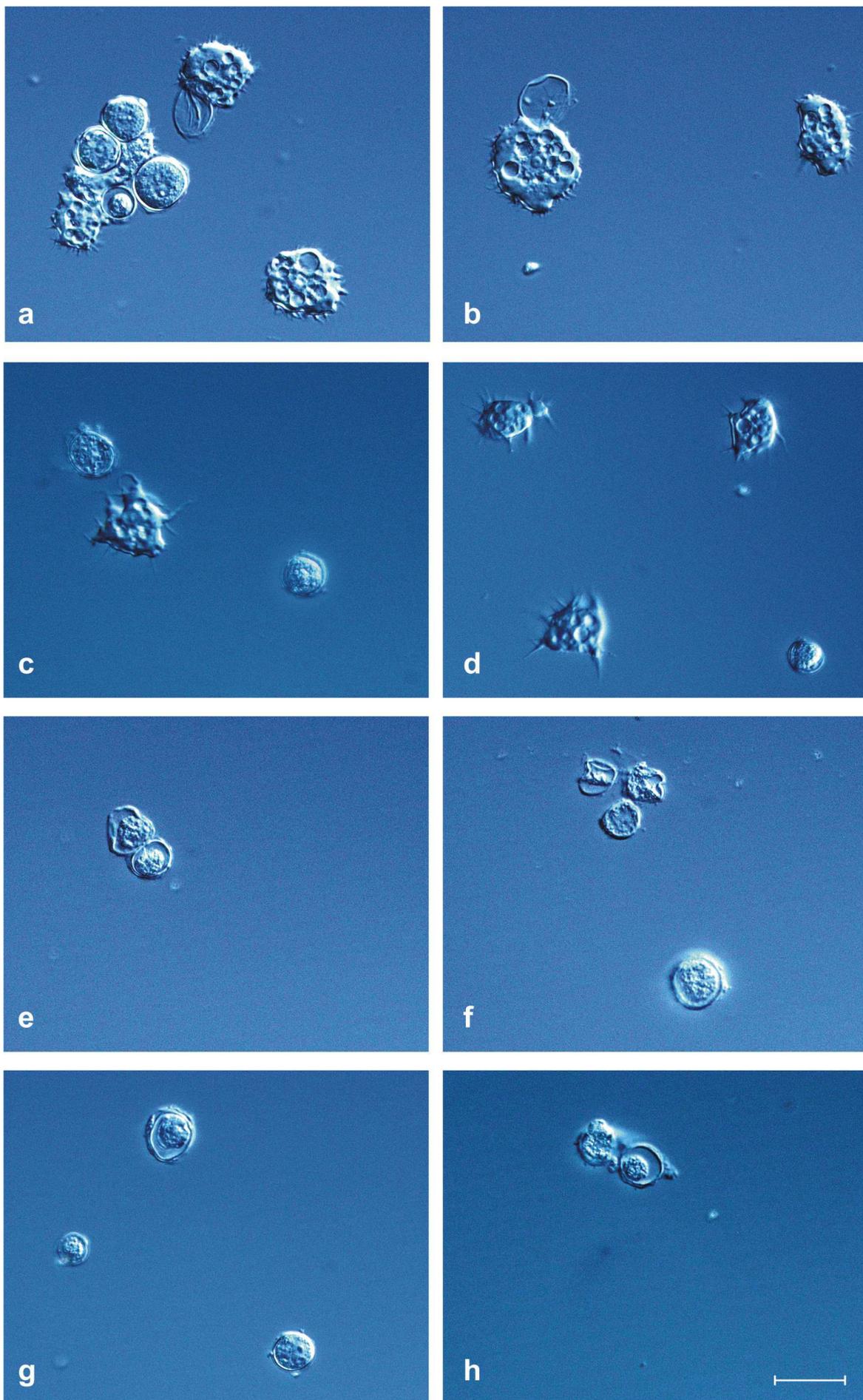
a,b) cisti di controllo;

c,d) cisti dopo trattamento con RLP068 0.5 μM e irradiate per 10 min a 50 mW/cm^2 ;

e,f) cisti dopo trattamento con RLP068 1 μM e irradiate per 10 min a 50 mW/cm^2 ;

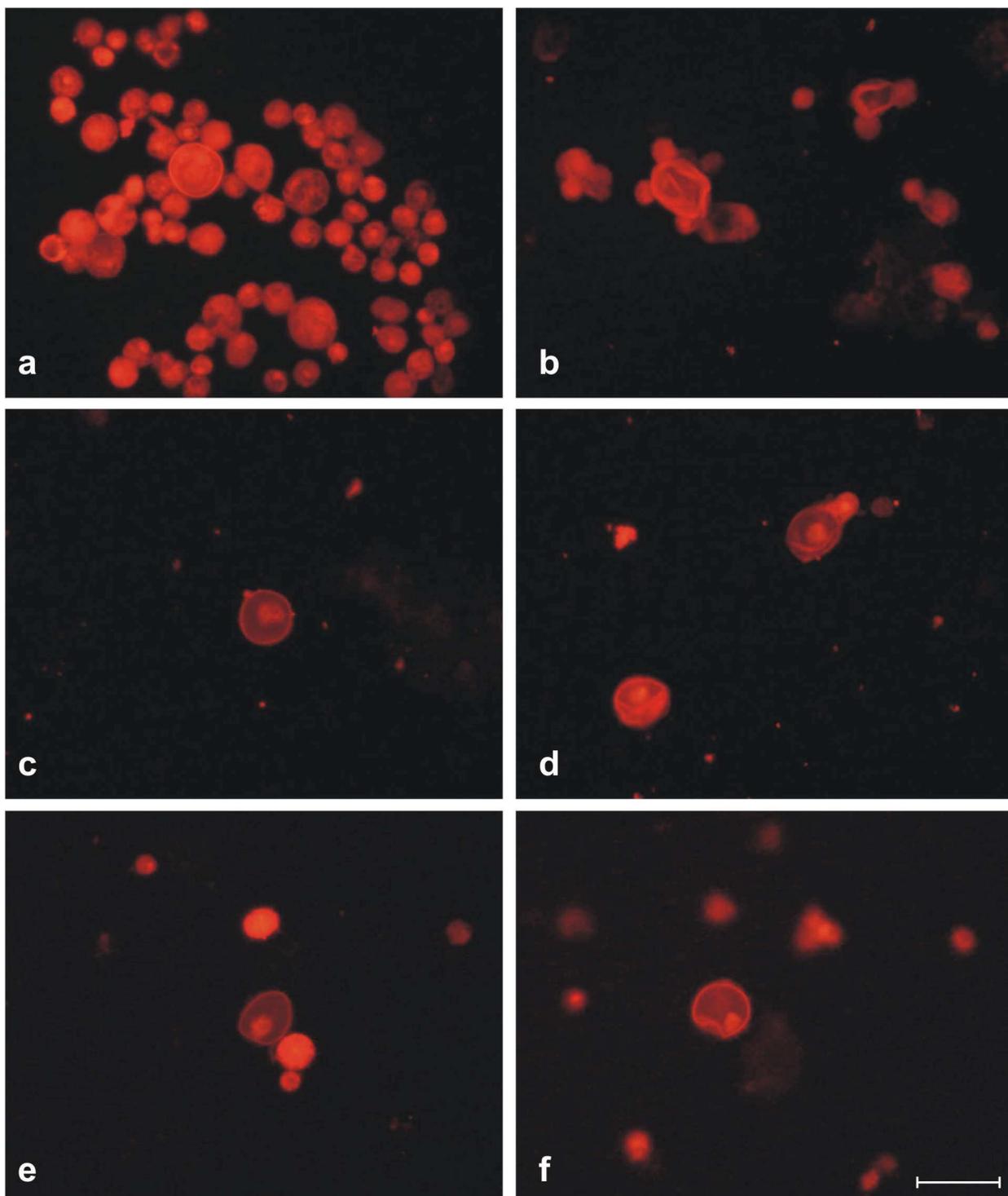
g,h) cisti dopo trattamento con RLP068 2 μM e irradiate per 10 min a 50 mW/cm^2 .

barra= 20 μm



TAV. 5: Immagini di microscopia a fluorescenza di cisti di *A. palestinensis* dopo fissazione e colorazione con rosso congo

- a) cisti di controllo;
- b) cisti trattate con RLP068 0.5 μM e irradiate per 20 min (600–700 nm; 50 mW/cm^2);
- c,d) cisti trattate con RLP068 3 μM e irradiate per 20 min (600–700 nm; 50 mW/cm^2);
- e,f) cisti trattate con RLP068 5 μM e irradiate per 20 min (600–700 nm; 50 mW/cm^2).



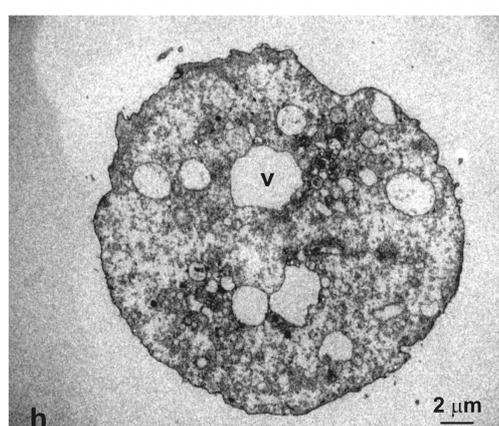
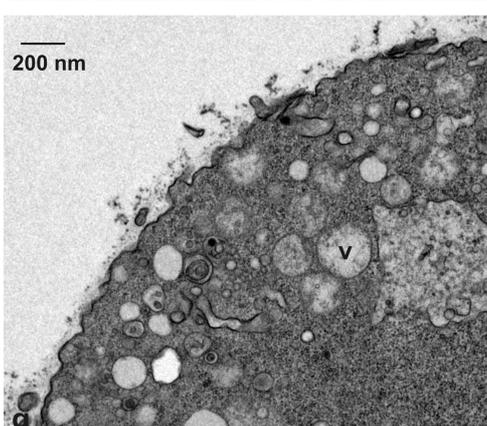
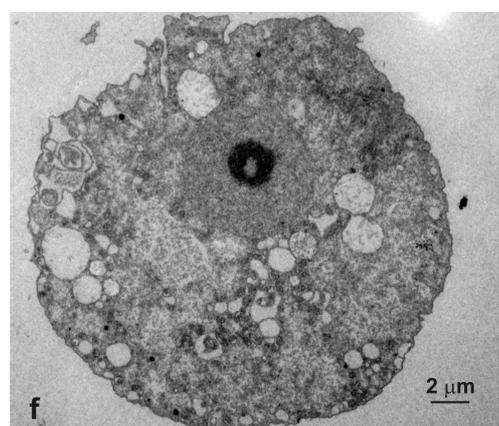
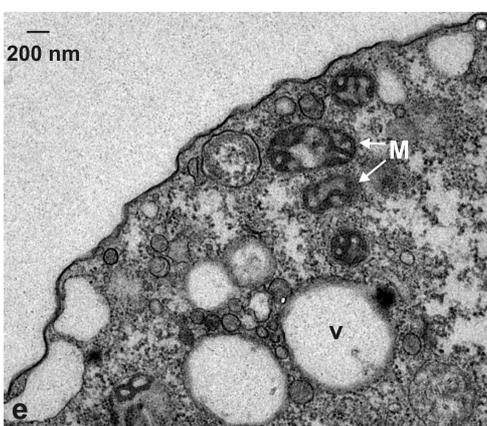
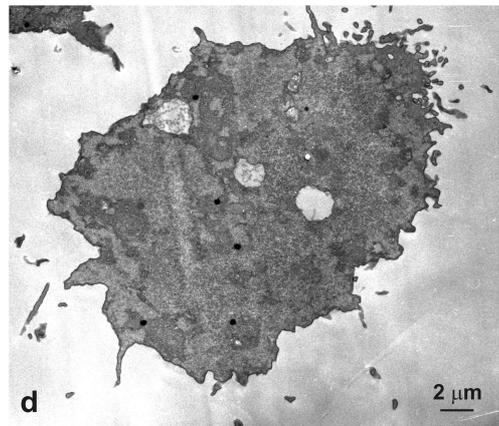
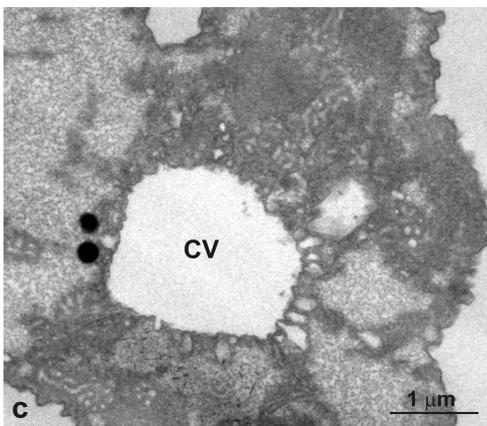
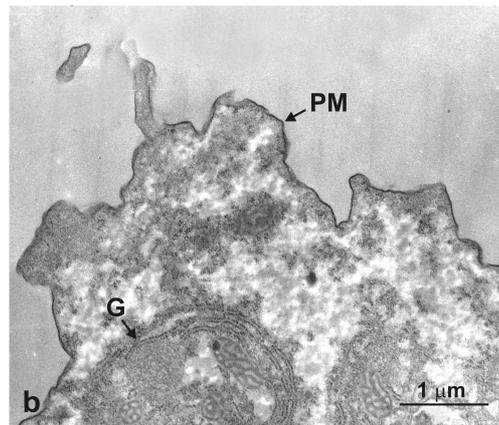
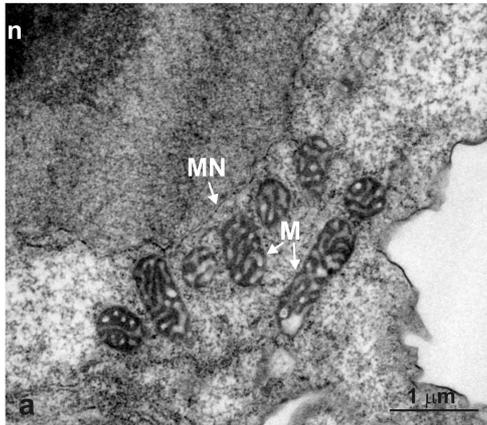
TAV. 6: Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione di trofozoiti di *A. palestinensis*

a,b) trofozoiti di controllo dove è visibile la membrana plasmatica (PM), numerosi mitocondri (M), il complesso di Golgi (G), la membrana nucleare (MN) e il nucleolo (n);

c,d) trofozoiti incubati al buio per 20 min con RLP068 2 μ M (CV: vacuolo contrattile);

e,f) trofozoiti incubati al buio per 10 min con RLP068 2 μ M e irradiati per 10 min (600–700 nm; 50 mW/cm²) (v: vescicole);

g,h) trofozoiti incubati al buio per 20 min con RLP068 2 μ M e irradiati per 20 min (600–700 nm; 50 mW/cm²) (v: vescicole).



Bibliografia

- Allison, B.A., Pritchard, P.H. e Levy, J.G. 1994. Evidence for low-density lipoprotein receptor-mediated uptake of benzoporphyrin derivative. *Br. J. Cancer* 69: 833-839.
- Allison, B.A., Pritchard, P.H., Richter, A.M. e Levy, J.G. 1990. The plasma distribution of benzoporphyrin derivative and the effects of plasma lipoproteins on its distribution. *Photochem. Photobiol.* 52: 501-507.
- Allison, B.A., Waterfield, E., Richter, A.M. e Levy, J.G. 1991. The effects of plasma lipoproteins on in vitro tumor cell killing and in vivo tumor photosensitization with benzoporphyrin derivative. *Photochem. Photobiol.* 54: 709-715.
- Arroy-Begovich, A., Càrabez-Trejo, A. e Ruíz-Herrera, J. 1980. Identification of the structural component in the cyst wall of *Entamoeba invadens*. *J. Parasitol.* 66: 735-741.
- Arroy-Begovich, A., Martínez-Palomo, A. e Sánchez-Pares, M.A. 1978. Formación de la pared celular durante el enquistamiento de *Entamoeba invadens*. *Arch. Invest. Med. (Mex)* 9: 105-112.
- Asilian, A., Sadeghinia, A., Faghihi, G., e Momeni, A. 1991. Comparative study of the efficacy of combined cryotherapy and intralesional meglumine antimoniate (Glucantime) vs. cryotherapy and intralesional meglumine antimoniate (Glucantime) alone for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Int. J. Dermatol.* 43: 281-283.
- Atlante, A., Passarella, S., Quagliariello, E., Moreno, G. e Salet, G. 1989. Hematoporphyrin derivative (Photofrin II) photosensitization of isolated mitochondria: inhibition of ADP/ATP translocation. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* 4: 35-36.
- Ben Hur, E. e Rosenthal, I. 1986. Photohemolysis of human erythrocytes induced by aluminum phthalocyanine tetrasulfonate. *Cancer Lett.* 30: 321-327.

- Benchimo, M. 2004. The release of secretory vesicle in encysting *Giardia lamblia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 235: 81–87.
- Bender, M.L. e Komiyama, M. 1978. Cyclodextrin Chemistry. Springer-Verlag. Berlin. Berg, K. 1996. Mechanisms of cell damage in photodynamic therapy. In: *Fundamental Basis of Phototherapy*, H. Honigsmann, G. Jori, A.E. Young (Eds.), OEMF, Milan, pp. 181–207.
- Bertoloni, G., Rossi, F., Valduga, G. e Jori, G. 1992. Photosensitizing activity of water- and lipid- soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells. *Microbiol.* 71: 33–46.
- Bertoloni, G., Salvato, B., Dall'Acqua, M., Vazzoler, M. e Jori, G. 1984. Haematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Streptococcus faecalis*. *Photochem. Photobiol.* 39: 811–816.
- Blanton, W.E. e Villemez, C.L. 1978. Molecular size and chain length distribution in *Acanthamoeba* cellulose. *J. Protozool.* 25: 264–267.
- Bonnet, R., Lambert, C., Land, E.J., Scourides, P.A., Sinclair, R.S. e Truscott, T.G. 1983. The triplet and radical species of hematoporphyrin and some of its derivatives. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* 1: 93–101.
- Brewster M.E. e Loftsson, T. 2007. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59: 645–666.
- Campbell, R.B., Balasubramanian, S.V. e Straubinger, R.M. 2001. Phospholipid-cationic lipid interactions: influences on membrane and vesicles properties, *Biochim. Biophys. Acta.* 1512: 27–39.
- Chambers, J.A. e Tompson, J.E. 1972. A scanning electron microscopy study of excystment process of *Acanthamoeba castellanii*. *Exp. Cell Res.* 73: 415–421.
- Chàvez-Munguía, B., Cristòbal-Ramos, A.R., González-Robles, A., Tetsumi, V. e Martínez-Palomo, A. 2003. Ultrastructural study of *Entamoeba invadens* encystation and excystation. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol* 35: 235–243.
- Chàvez-Munguía, B., Omana-Molina, M., González-Làzaro, M., González-Robles, A., Bonilla, P. e Martínez-Palomo, A. 2005. *Acanthamoeba*

- castellanii* encystation and excystation. *J Eukariot. Microbiol.* 52: 153-158.
- Clare, N.T. 1956. Photodynamic action and its pathological effects. In: *Radiation Biology*. Hollaender, A. (Ed.) McGraw-Hill, New York, pp. 693-723.
 - Clark, I.A., Chaudhri, G. e Cowden, W.B. 1989. Some roles of free radicals in malaria. *Free Rad. Biol. Med.* 6: 315.
 - Coppi, A. e Eichenger, D. 1999. Regulation of *Entamoeba invadens* encystations and gene expression with galactose and N-acetylglucosamine. *Mol. Biochem. Parasitol.* 102: 67-77.
 - Darwent, J.R., Douglas, P., Harriman, A., Porter, G. e Richoux, M.C. 1982. Metal phthalocyanines and porphyrins as photosensitizers for reduction of water to hydrogen. *Coord. Chem. Rev.* 44: 83-126.
 - Das, S. e Gill, F.D. 1991. Chitin syntase in encysting *Entamoeba invadens*. *Biochem. J.* 280: 641-647.
 - Donohue, R. Mazzaglia, A., Ravoo, B.J. e Darcy, R. 2002. Cationic β -cyclodextrin bilayer vesicles. *Chem. Commun.* 2864-2865.
 - Dougherty, T.J. 1987. Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. *Photochem. Photobiol.* 45: 879-889.
 - Dutta, S., Ray, D., Kolli, B.K. e Chang, K. 2005. Photodynamic sensitization of *Leishmania amazonensis* in extracellular and intracellular stages with aluminium phthalocyanine chloride for photolysis in vitro. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* 49: 4474-4484.
 - Ehrenberg, B., Malik, Z. e Nitzan, Y. 1985. Fluorescence spectral changes of haematoporphyrin derivative upon binding to lipid vesicles, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* cells. *Photochem. Photobiol.* 41: 429-435.
 - Ferro, S. A.A. 2000-2001. Strategie per ottimizzare l'efficienza e la selettività di fotoinattivazione di *Staphylococcus aureus* sensibilizzato da ftalocianine. Tesi di laurea.
 - Ferro, S., Ricchelli, F., Mancini, G., Tognon, G. e Jori, G. 2006 A. Inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by

- liposome-delivered photosensitising agents. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* 83: 98-104.
- Ferro, S., Coppellotti, O., Roncucci, G., Ben Amor, T. e Jori, G. 2006 B. Photosensitised inactivation of *Acanthamoeba palestinensis* in the cystic stage. *J. Appl. Microbiol.* 101: 206-212.
 - Ferro, S., Ricchelli, F., Monti, D., Mancini, G. e Jori, G. 2007. Efficient photoinactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a novel porphyrin incorporated into a poly-cationic liposome. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 1026-1034.
 - Frisardi, M., Ghosh, S.K., Field, J., Van Dellen, K., Rogers, R., Robins, P. e Samuelson, J. 2000. The most abundant glycoprotein of amoebic cyst walls (Jacob) is a lectin with five Cys-rich, chitin-binding domains. *Infect. Immun.* 68: 4217-4224.
 - Galante, Y.M. e Hatefy, Y. 1978. Resolution of complex I and isolation of NADH dehydrogenase and an iron-sulfur protein. *Methods Enzymol.* Fleischer S. e Packer L. (Eds) Academic Press, New York, vol III, pp. 15-21.
 - Gardlo, K., Horska, Z., Enk, C.D., Rauch, L., Megahed, M., Ruzicka, T. e Fritsch, C. 2003. Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. *J. Am. Acad. Dermatol.* 48: 893-896.
 - Garvie, E.I: 1980. Bacterial lactate dehydrogenase. *Microbiol. Rev.* 44: 106-139.
 - Gross, E., Ehrenberg, B. e Johnson, F.M. 1992. Singlet oxygen generation by porphyrins and the kinetics of 9,10-dimethylanthracene photosensitization in liposomes. *Photochem. Photobiol.* 57: 808-813.
 - Grossweiner, L.I. e Smith, K.C. 1989. Photochemistry. In: *The Science of Photobiology* Smith K.C. (Ed) Plenum Press, New York, pp. 47-78.
 - Hamblin, M.R. e Ortel, B. 2001. Future directions-photosensitizer targeting and new disease indications. In: *Therapy and Fluorescent Diagnosis in Dermatology*, Elsevier, Amsterdam, pp. 339-366.
 - Hamblin, M. R., O'Donnell, D. A., Rajagopalan, K., Michaud, N., Sherwood, M. E. e Hasan, T. 2002. Polycationic photosensitizer conjugates: effects

- of chain length and gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 49: 941–951.
- Ho, Y.K., Pandey, R.K., Missertand, J.R. e Dougherty, T.J. 1990. Some components of the tumor-localizing fraction of hematoporphyrin derivative. *Photochem. Photobiol.* 52: 1085–1088.
 - Ishimaru, A. 1978. Wave propagation and scattering in random media. Academic Press, New York.
 - Jori, G. e Spikes, J.D. 1984. Photobiochemistry of porphyrins. In: *Topics in Photomedicine*. Smith, K.C. (Ed.) Plenum Press, New York, pp. 183–318.
 - Jori, G. 1987. Photodynamic therapy of solid tumours. *Radiat. Phys. Chem.* 30: 375–380.
 - Jori, G. e Brown, S.B. 2004. Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3: 403–405.
 - Jori, G., Fabris, C., Soncin, M., Ferro, S., Coppellotti, O., Dei, D., Fantetti, L., Chiti, G. e Roncucci, G. 2006. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg. Med.* 38: 468–481.
 - Kassab, K., Dei, D., Roncucci, G., Jori, G. e Coppellotti, O. 2003. Phthalocyanine-photosensitized inactivation of the pathogenic protozoa, *Acanthamoeba palestinensis*. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2: 668–672.
 - Kessel, D. 1977. Effects on photoactivated porphyrins at the cells surface of leukemia L1210 cells. *Biochem.* 16: 3443–3493.
 - Kessel, D. 1986. Sites of photosensitization by derivatives of hematoporphyrin, *Photochem. Photobiol.* 44: 489–494.
 - Khan, N.A. 2003. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microb. Pathogen.* 34: 277–285.
 - Kremer, J.M., Esker, M.W., Pathmamanoharan, C. e Wiersema, P.H. 1977. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. *Biochem.* 16: 3932–3935.
 - Krinsky, N.I. 1968. The protective function of carotenoid pigments. In: *Photophysiology*, Giese A.C., (Ed) Academic Press, New York, 3: 123–139.

- Krinsky, N.I. 1982. Photobiology of carotenoid protection. In: *The Science of Photomedicine*. J.D. Regan e J.A. Parrish (Eds) Plenum Press, New York, pp. 397-407.
- Lambert, C.R., Reddi, E., Spikes, J.D., Rodgers, M.A. e Jori, G. 1986. The effects of porphyrin structure and aggregation state on photosensitized processes in aqueous and micellar media. *Photochem. Photobiol.* 44: 595-601.
- Lanfredi-Rangel, A., Attias, M.M., Reiner, D.S., Gillin, F.D. e De Souza, W. 2003. Structure of the biogenesis of *Giardia lamblia* encystation secretory vesicles. *J. Struct. Biol.* 143: 153-163,
- Leòn, G., Fiori, C., Das, S., Moreno, M., Tovar, R., Sánchez-Salas, J.L. e Munoz, M.L. 1997. Electron probe analysis of electron-dense granules secreted by *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 85: 233-242.
- Maeda, H. e Ispida, N. 1967. Specificity of binding of hexopyranosyl polysaccharides with fluorescent brightener. *J. Biochem. (Tokyo)* 62: 276-278.
- Malik, Z., Gozhansky, S. e Nitzan, Y. 1982. Effects of photoactivated HPD on bacteria and antibiotic resistance. *Microbiol. Lett.* 21: 103-112.
- Malik, Z., Ladan, H. e Nitzan, Y. 1988. Mesosomal-structures and antimicrobial-induced by hemin-oxidation or porphyrin photodynamic sensitization in *Staphylococci*. *Curr. Microbiol.* 16: 321-328.
- Malik, Z., Ladan, H. e Nitzan, Y. 1992. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria. Problems and possible solutions. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* 14: 262-266.
- Marciano-Cabral, F. e Cabral, G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 273-307.
- Martinez, A. J e Visvesvara, J. S. 1997. Free-living, amphizoic, and opportunistic amoebas. *Brain. Pathol.* 70: 583-598.
- Martínez-Palomo, A., Meza, I., Chàvez, B., Rosales-Encina, J.L., Munoz, M.L., González-Robles, A. e Rojkind, M. 1987. *Entamoeba histolytica*: activation and release of membrane dense bodies. In: *Host-parasite cellular and molecular interactions in protozoal infections*. Chang, K.P. e

Snary, D. (Ed.), NATO ASI Series. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. H11: 371-376.

- Merchat, M., Spikes, J.D., Bertoloni, G. e Jori, G. 1996. Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* 35: 149-157.
- Minnock, A., Vernon, D., Schofield, J., Parish, J.H. e Brown, S.B. 1996. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* 32: 159-164.
- Moan, J. e Sommer, S. 1985. Oxygen dependence of photosensitizing effect of haematoporphyrin derivative in NHIK 3025 cells. *Cancer Res.* 45: 1608-1610.
- Neff, R.J. e Neff, R.H. 1969. The biochemistry of amoebic encystment. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 23: 51-81.
- Nikaido, H. 1989. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1831-1836.
- Nitzan, Y., Gozhansky, S. e Malik, Z. 1983. Effect of photoactivated haematoporphyrin derivative on the viability of *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.* 8: 279-284.
- Olvera, A., Pèrez-Casas, S. e Costas, M. 2007. Heat capacity contributions to the formation of inclusion complexes. *J Phys. Chem., B: Biol.* 111: 11497-11505.
- Osborn, M.J., Gander, J.E., Parisi, E. e Carson, J. 1972. Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 247: 3962-3972.
- Polo, L., Segalla, A., Bertoloni, G., Schaffer, K. e Reddi, E. 2000. Polylysine-porphycene conjugates as efficient photosensitiser for the inactivation of microbial pathogens. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* 59: 152-158.
- Reddi, E., Jori, G., Rodgers, M.A.J. e Spikes, J.D. 1983. Flash photolysis studies of hemato- and copro-porphyrin in homogeneous and microheterogeneous aqueous dispersions. *Photochem. Photobiol.* 38: 639-645.

- Reddi, E. e Jori, G. 1988. Steady-state and time-resolved spectroscopic studies of photodynamic sensitizers: porphyrins and phthalocyanines *Rev. Chem. Interm.* 10: 241-268.
- Reddi, E., Zhou, C., Biolo, R., Menegaldo, E. e Jori, G. 1990. Liposome- or LDL-administred Zn(II)-phthalocyanine as a photodynamic agent for tumors. I. Pharmacokinetic properties and phototherapeutic efficiency. *Br. J. Cancer* 61: 407-411.
- Reddi, E., Ceccon, M., Valduga, G., Jori, G., Bommer, J. C. e Elisei, F. 2002. Photophysical properties and antibacterial activity of meso-substituted cationic porphyrins. *Photochem. Photobiol.* 75: 462-470.
- Reeves, W.J. e Fimognari, G.M. 1966. L-lactic dehydrogenase: heart (H4). *Methods Enzymol.* Wood W.A. (Ed.), Academic Press, New York, vol IX, pp. 288-294.
- Reithinger, R.M., Mohsen, M., Wahid, M., Bismullah, R.J. Quinnel, C.R. Davies, J. Kolaczinsky e David, J. R. 2005. Efficacy of termotherapy to treat cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Kabul, Afghanistan: a randomized controlled trial. *Clin. Infect. Dis.* 40: 1148-1155.
- Ricchelli, F., Jori, G., Gobbo, S. e Tronchin, M. 1991. Liposomes as models to study the distribution of porphyrins in cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1065: 42-48.
- Robberecht, R. 1989. Environmental Photobiology. In: *The Science of Photobiology*. Smith K.C (Ed) Plenum Press, New York, pp. 135-153.
- Rodanelli, E.G., Osculati, F., Gerna, G. e Fiori, G.P. 1965. Ricerche microelettroniche su *Entamoeba invadens*. *Boll. Inst. Sieroter.* Milan. 44: 218-239.
- Rodgers, M.A.J. 1985. Activated oxygen. In: *Primary Photoprocesses in Biology and Medicine*. Bensasson, R.V., Jori, G., Land, E.J. e Truscott, T.G. (Eds) NATO ASI Series, Plenum Press, New York, pp.181-195.
- Raab O. 1900. Uber die wirkung fluorizierender stoffe auf infusorien. *Zeit Biol.* 39: 524-546.
- Saenger, W. 1980. Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 19: 344-362.

- Santos, E. e Kaback, H.R. 1986. Monoclonal affinity purification of D-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 126: 370-377.
- Sgota, A. 1985. Subplasmalemmal calcium-binding micro-regions in *Acanthamoeba*. *J Cell Sci.* 79: 217-235.
- Schardinger, F. 1903. Über thermophile bakterien aus verschiedenen Speisen und milch, sowie über einige Umsetzungsprodukte derselben in kohlenhydrathaltigen Nährlösungen, darunter kristallisierte polysaccharide (dextrine) aus stärke. *Z. Untersuch. Nahr. u. Genussm.* 6: 865-880.
- Schardinger, F. 1911. Bildung kristallisierter polysaccharide (dextrine) aus stärkekleister durch microben. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Abt. II* 29: 188-197.
- Segalla, A., Fedeli, F., Reddi, E., Jori, G. e Cross, A. 1997. Effect of chemical structure and hydrophobicity on the pharmacokinetic properties of porphycenes in tumour-bearing mice. *Int. J. Cancer* 72: 329-336.
- Selman, S.H., Kreimer-Birnbaum, M. e Chandhuri, K. 1986. Photodynamic treatment of trasplantable bladder tumors in rodents after pretreatment with chloroaluminium tetrasulfophthalocyanine. *J. Urol.* 136: 141-145.
- Slavin, I., Saura, A., Carranza, P.G., Touz, M.G., Nores, M.J. e Lujàn, H.D. 2002. Dephosphorylation of cyst wall proteins by a secreted lysosomal acid phosphatase is essential for excystation of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 122: 95-98.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gortener, F.H., Provengano, M.D., Fijimoto, E.K., Goeke, N.M. Olson, B.J. e Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
- Smith, O.M., Dolan, S.A., Dvorak, J.A., Wellemes, T.E. e Sieber, F. 1992. Merocyanine 540-sensitized photoinactivation of human erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum*. *Blood* 1: 21-24.
- Soncin, M., Polo, L., Reddi, E., Jori, G., Kenney, M.E. Cheng, G. e Rodgers, M.A. 1995. Effect of axial ligation and delivery system on the

- tumour-localising and -photosensitising properties of Ge(IV)-octabutoxy-phthalocyanines. *Br. J. Cancer* 71: 727-732.
- Soncin, M., Fabris, C., Busetti, A., Dei, D., Nistri, D., Roncucci, G. e Jori, G. 2002. Approaches to selectivity in the Zn(II)-phthalocyanine-photosensitized inactivation of wild-type and antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *Photochem. Photobiol. Sci.* 10: 815-819.
 - Spikes, J.D. 1986. Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 43: 691-699.
 - Spikes, J.D. 1989. Photosensitization. In: *The Science of Photobiology*. Smith K.C. (Ed) Plenum Press, New York, pp. 79-110.
 - Spikes, J.D. e Bommer, J.C. 1986. Zinc-tetrasulphophthalocyanine as a photodynamic sensitizer for biomolecules. *Int. J. Radiat. Biol.* 50: 41-45.
 - Szöllősi, J. 1994. Fluidity/viscosity of Biological Membranes, in: *Mobility and Proximity in Biological Membranes*, Damjanovich, S., Szöllősi, J., Tròn, J, Edidin, M. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, 137-208.
 - Tomlinson, G. e Jones, E.A. 1962. Isolation of cellulose from the cyst wall of a soil amoeba. *Biochim. Biophys. Acta* 63: 194-200.
 - Turro, N.J. 1978. Modern Molecular Photochemistry. The Benjamin/Cummings Publishing Co., Menlo Park, California.
 - Tyrrel, R.M. e Keyse, S.M. 1990. The interaction of UV-A radiation with cultured cells. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* 4: 349-361.
 - Valduga, G., Nonell, S., Reddi, E., Jori, G. e Braslavsky, S. 1988. The production of singlet molecular oxygen by Zinc(II)-phthalocyanine in ethanol and in unilamellar vesicles. Chemical quenching and phosphorescence studies. *Photochem. Photobiol.* 48: 1-5
 - Valduga, G., Reddi, E., Jori, G., Cubeddu, R., Taroni, P. e Valentini, G. 1992. Steady state and time-resolved spectroscopic studies on zinc(II)-phthalocyanine in liposomes. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* 16: 331-340.
 - von Tappeiner H. 1904. Zur kenntis der lichtwirkenden (fluoreszierenden) stoffe. *Dtsch Med Wochen.* 1: 579-580.
 - Villiers, A. 1891. Sur la fermentation de la fècule par l'action du ferment butyrique. *Comp. Rend. Acad. Sci.* 112: 536-538.

- Wagner, J.R., Ali, H., Langlois, R., Brasseur, N. e Van Lier, J. 1987. Biological activities of phthalocyanines–VI. Photooxidation of L-tryptophan by selectively sulfonated gallium phthalocyanines: singlet oxygen yields and effect of aggregation. *Photochem. Photobiol.* 45: 587–594.
- Whitten, D.G. 1978. Photochemistry of porphyrins and their metal complexes in solution and organized media, *Rev. Chem. Intermed.* 2: 107–138.

Pubblicazioni

- “Inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by liposome-delivered photosensitising agents”

Stefania Ferro, Fernanda Ricchelli, Giovanna Mancini, Giuseppe Tognon e Giulio Jori. 2006. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* 83: 98–104.

- “Photosensitised inactivation of *Acanthamoeba palestinensis* in the cystic stage”

Stefania Ferro, Olimpia Coppellotti, Gabrio Roncucci, Tameur Ben Amor e Giulio Jori. 2006. *J. Appl. Microbiol.* 101: 206–212.

- “Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications.”

Giulio Jori, Clara Fabris, Marina Soncin, Stefania Ferro, Olimpia Coppellotti, Donata Dei, Lia Fantetti, Giacomo Chiti e Gabrio Roncucci. 2006. *Lasers Surg. Med.* 38: 468–481.

- “Efficient photoinactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a novel porphyrin incorporated into a poly-cationic liposome.”

Stefania Ferro, Fernanda Ricchelli, Donato Monti, Giovanna Mancini e Giulio Jori. 2007. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 1026–1034.

- “Porphyrins and related compounds in photodynamic treatment of parasitic protozoa.”

Olimpia Coppellotti Krupa, Stefania Ferro, Kawser Kassab, Gabrio Roncucci and Giulio Jori. 2007. *Biomedical Engineering. Aspects of Photodynamic Medicine* I. H. Podbielska, A. Sieroń, W. Stręk (Eds.) 2: 115–121.