

*1. a*

***RIASSUNTO***

La terapia fotodinamica (PDT) è una modalità terapeutica minimamente invasiva utilizzata prevalentemente in campo oncologico per il trattamento di vari tipi di tumori solidi. La PDT è basata sulla somministrazione di un agente fotosensibilizzante (PS) in grado di localizzarsi preferenzialmente nei tessuti neoplastici e di generare specie altamente reattive dell'ossigeno (ROS) dopo attivazione con luce visibile di opportune lunghezze d'onda. Tali specie, in particolare l'ossigeno di singoletto ( $^1\text{O}_2$ ), innescano una cascata di reazioni portando a danno ossidativo e morte cellulare. Una limitazione della PDT è dovuta alla natura idrofobica di molti PS che, favorendo la sua aggregazione nel mezzo acquoso, ne diminuisce fortemente l'efficacia terapeutica. Per superare tale problema e migliorare l'efficacia e la selettività della PDT, limitando gli effetti citotossici nei tessuti sani circostanti, si può trarre vantaggio dalle potenzialità fornite dalle emergenti nanotecnologie. In oncologia, infatti, le nanostrutture stanno ricevendo particolare attenzione come nanovettori iniettabili per la veicolazione selettiva di farmaci alle cellule tumorali e come agenti per l'imaging e la diagnostica delle neoplasie. Il mio progetto di Dottorato di Ricerca è stato mirato sull'utilizzo di nanosistemi idrofilici per la veicolazione della *meta*-tetra(idrossifenil)clorina (mTHPC, nome commerciale Foscan<sup>®</sup>, fornita dalla Biolitec), un PS idrofobico di seconda generazione con un'elevata attività antitumorale ed approvato in Europa per il trattamento palliativo di tumori della testa e del collo in stadio avanzato. In particolare, nanoparticelle di silice organicamente modificata (ORMOSIL NP, ORganically MODified SILica nanoparticles; sintetizzate presso il Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Padova) e liposomi rivestiti di poli(etilene glicole) (PEG) (Fospeg; forniti dalla Biolitec) sono stati studiati come sistemi di veicolazione della mTHPC. L'incorporazione della mTHPC in NP non modifica le sue proprietà fotofisiche e la sua efficienza di produzione dell' $^1\text{O}_2$  dopo irradiazione. Sono stati valutati gli effetti biologici indotti da questi nanoveicoli in cellule umane tumorali e normali confrontando la citotossicità al buio, l'efficacia fotodinamica, l'internalizzazione e la distribuzione subcellulare della mTHPC incorporata in NP rispetto alla mTHPC veicolata nel solvente standard, costituito da etanolo/PEG 400/acqua (20:30:50, v/v/v). In primo luogo, sono stati condotti studi *in vitro* con cellule di carcinoma esofageo umano KYSE 510, che sono state esposte a ORMOSIL NP nude, non caricate e caricate non covalentemente con la mTHPC. La citotossicità indotta al buio dalla mTHPC è stata diminuita dall'incorporazione in NP nude. La veicolazione della mTHPC in NP nude riduce l'accumulo cellulare del PS di circa il 50% rispetto al veicolo standard, ma ciò inaspettatamente non va ad influire sul grado di foto citotossicità. Infatti, le curve dose-risposta relative alla fototossicità (0.12 J/cm<sup>2</sup> di luce rossa) della mTHPC nella forma libera e incorporata in NP sono perfettamente sovrapponibili. Inoltre, la mTHPC veicolata in entrambe le formulazioni viene internalizzata rapidamente dalle cellule KYSE 510 e si localizza preferenzialmente nell'apparato del Golgi e nel reticolo endoplasmatico.

Vista la similarità dei risultati ottenuti veicolando la mTHPC in NP nude o nel solvente standard, è stata indagata la possibilità che tale PS potesse essere rilasciato dalle NP mediante due metodi: a) esperimenti di FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) condotti con NP caricate non covalentemente con la mTHPC (donatore) e con un derivato di una cianina (accettore) covalentemente legato alla matrice silanica della NP, e b) esperimenti di ultracentrifugazione con NP disciolte in diversi solventi. Solventi con polarità più bassa dell'acqua, come anche la presenza di proteine del siero, provocano il rapido e quasi totale rilascio della mTHPC dalle NP nude. Studi sulle cinetiche di monomerizzazione della mTHPC in terreno di coltura cellulare contenente siero hanno dimostrato che la mTHPC aggrega quando si trova nel veicolo standard, a differenza di quanto avviene nelle NP. Questo diverso comportamento potrebbe fornire una spiegazione della simile efficienza di fotoinattivazione, nonostante il minore accumulo della mTHPC veicolata in NP rispetto al solvente standard. Una strategia che è stata usata per cercare di evitare la fuoriuscita della mTHPC dalle NP è il rivestimento della superficie della NP con un appropriato strato di PEG. Queste "stealthy particles" sono caratterizzate da un ridotto adsorbimento di proteine sulla superficie, un lungo tempo di circolazione nei vasi sanguigni ed una minima cattura da parte dei macrofagi del sistema reticolo-endoteliale. I risultati hanno dimostrato che la PEGilazione di ORMOSIL NP riduce fortemente, ma non inibisce completamente, il rilascio della mTHPC incorporata fisicamente. Per questo motivo sono state quindi preparate delle ORMOSIL NP PEGilate caricate con la mTHPC legata covalentemente alla matrice silanica. La citotossicità al buio, l'accumulo e la distribuzione intracellulare delle NP PEGilate, non caricate e caricate fisicamente o covalentemente con la mTHPC, sono stati determinati *in vitro* nelle cellule A549, derivanti da un carcinoma polmonare umano, e nei fibroblasti polmonari normali umani CCD-34Lu. La linea cellulare A549 è stata selezionata in quanto è negativa per la sovraespressione del recettore del folato, e potrà essere utilizzata, in associazione con le cellule KB, che invece sovraesprimono tale recettore, in futuri esperimenti con nanoveicoli funzionalizzati con l'acido folico come ligando per l'indirizzamento specifico alle cellule tumorali. In entrambe le linee cellulari la citotossicità, al buio e dopo irradiazione, della mTHPC veicolata in NP PEGilate è in generale molto più bassa rispetto a quella della mTHPC nel solvente standard, in accordo col minore accumulo del farmaco. Nelle cellule tumorali, ma non nei fibroblasti, la riduzione della vitalità causata dall'esposizione a dosi crescenti di mTHPC incorporata in NP PEGilate è dovuta in parte alla citotossicità del nanoveicolo PEGilato non caricato. Questa differente risposta potrebbe dipendere dalla presenza di efficienti meccanismi di protezione dallo stress ossidativo nelle cellule CCD-34Lu, come suggerito dall'elevata produzione endogena di ROS in tale linea cellulare. In questo progetto sono state studiate anche varie tipologie di formulazioni liposomiali unilamellari PEGilate (Fospeg), come nanoveicoli per la mTHPC, che viene incorporata all'interno del doppio strato fosfolipidico. I liposomi utilizzati in questo lavoro differiscono per densità (2-8 mol% dei lipidi totali) e lunghezza (750, 2000, 5000) delle

catene di PEG. Sono state utilizzate le cellule A549 e CCD-34Lu per valutare la tossicità al buio della mTHPC veicolata in Fospeg, confrontandola con la sua veicolazione nel solvente standard. E' stata analizzata anche l'influenza della densità e della lunghezza della catena di PEG sull'accumulo cellulare e sull'efficacia della PDT nelle cellule *in vitro*. L'incorporazione della mTHPC in liposomi PEGilati diminuisce la citotossicità al buio del farmaco in entrambe le linee cellulari. L'efficienza di fotosensibilizzazione della mTHPC sulle cellule tumorali *in vitro* viene leggermente ridotta veicolandola in Fospeg, rispetto al solvente standard, e ciò è correlabile con l'accumulo leggermente inferiore. La microscopia di fluorescenza ha evidenziato una rapida internalizzazione della mTHPC ed una localizzazione citoplasmatica, prevalente nell'apparato del Golgi e nel reticolo endoplasmatico, in entrambe le linee cellulari, ed indipendente dalla modalità di veicolazione utilizzata (Fospeg o solvente standard). Per dimostrare se il PS venga rilasciato dai liposomi prima dell'internalizzazione cellulare, sono stati utilizzati dei liposomi PEGilati marcati con un lipide fluorescente. E' stata osservata una localizzazione lisosomiale per la sonda Rodamina-lipide liposomiale suggerendo che la mTHPC veniva rilasciata dai liposomi.

I risultati hanno dimostrato che le ORMOSIL NP ed i liposomi PEGilati possono costituire degli utili nanosistemi per la veicolazione di farmaci idrofobici e che la fuoriuscita del farmaco dai nanoveicoli può essere evitata tramite il legame covalente del farmaco. Studi futuri per migliorare l'accumulo intracellulare del PS e la selettività della terapia saranno rivolti alla funzionalizzazione superficiale di questi nanoveicoli con ligandi specificamente riconosciuti da recettori sovraespressi dalle cellule tumorali.

*1. b*

*ABSTRACT*

Photodynamic therapy (PDT) is a minimally invasive therapeutic modality mainly used in the oncological field for treating various types of solid tumours. PDT is based on the administration of a photosensitizing agent (PS), that preferentially localizes in neoplastic tissues and generates highly reactive oxygen species (ROS), after activation with appropriate wavelengths of visible light. These species, in particular singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ), trigger a cascade of reactions leading to oxidative damage and cell death. One limitation of PDT is represented by the hydrophobic nature of many PS that, favouring aggregation in aqueous medium, strongly depresses the therapeutic efficiency. To overcome this problem and to enhance the efficacy and selectivity of PDT, confining the cytotoxic effects to the surrounding healthy tissues, one can take advantage of the potentialities offered by the emerging nanotechnologies. In oncology, in fact, nanostructures are receiving considerable attention as injectable nanovectors for the selective delivery of drugs to cancer cells and as tumour diagnostic and imaging agents. My PhD project was focused on the use of hydrophilic nanosystems for the delivery of *meta*-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC, trade name Foscan<sup>®</sup>, provided by Biolitec), a hydrophobic second generation photosensitizer characterized by a high antitumoral activity and approved in Europe for the palliative treatment of advanced head and neck cancers. In particular, ORganically Modified SILica nanoparticles (ORMOSIL NP; synthesised in the Department of Chemical Sciences, University of Padova) and liposomes coated with poly(ethylene glycol) (PEG) (Fospeg; provided by Biolitec) were studied as mTHPC delivery systems. The entrapment of mTHPC in NP did not modify its photophysical properties and its efficiency of  $^1\text{O}_2$  production after irradiation. We evaluated the biological effects of these nanovehicles in human cancer and normal cells comparing dark cytotoxicity, photodynamic efficacy, internalization and subcellular distribution of mTHPC entrapped in NP with respect to mTHPC delivered in standard solvent ethanol/PEG 400/water (20:30:50, by vol.). At first, we performed *in vitro* studies with human oesophageal carcinoma cells KYSE 510, which were exposed to naked ORMOSIL NP, empty or loaded not covalently with mTHPC. The dark cytotoxicity of mTHPC was diminished by the entrapment in naked NP. The mTHPC delivery in naked NP reduced the cellular uptake of PS by about 50% in comparison to standard solvent, while surprisingly it did not affect the efficiency of cell photokilling. In fact, the dose-response curves for the phototoxicity ( $0.12 \text{ J/cm}^2$  of red light) of free and NP-entrapped mTHPC were perfectly superimposed. Furthermore, mTHPC delivered by both formulations was rapidly internalised by KYSE 510 cells and localized preferentially in the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum. Because of the very similar results obtained by delivering mTHPC by naked NP or standard solvent, we investigated the possible release of the PS from NP by two methods: a) FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) experiments performed with NP loaded not covalently with mTHPC (donor) and a cyanine derivative (acceptor) covalently bound to the NP silanic matrix, and b) ultracentrifugation experiment of the NP dissolved in different solvents. Solvents of polarity lower than water, as well as the

presence of serum proteins, caused the rapid and almost complete release of mTHPC from naked NPs. Studies on the monomerisation kinetics of mTHPC in the cell culture medium containing serum demonstrated an aggregation of mTHPC dissolved in standard vehicle, but not in NPs, that might explain the very similar efficiency of cell photoinactivation in spite of the lower cellular uptake of mTHPC delivered in NP with respect to the standard solvent. One strategy to avoid the leaking of the mTHPC from NP could be the coating of the NP surface with a suitable layer of PEG. These “stealthy particles” are characterized by a reduced protein adsorption on the surface, a long blood circulation time and minimum capture by the macrophages of the reticulo-endothelial system. The PEGylation of the ORMOSIL NPs strongly reduces, but not inhibit completely, the release of the physically entrapped mTHPC. For this reason PEGylated ORMOSIL NP loaded with mTHPC covalently bound to the silanic matrix were prepared. The dark cytotoxicity, intracellular uptake and distribution of PEGylated NP, empty and physically or covalently loaded with mTHPC, were determined *in vitro* in A549 cells, derived from human lung carcinoma, and normal human lung fibroblasts CCD-34Lu. The A549 cell line was selected because it is negative for the over-expression of folate receptor, and will be used in future experiments with nanovehicles functionalized with folic acid as ligand for specific targeting of tumour cells, together with KB cell line, which over-expresses the folate receptor. In both cell lines, the general lower dark and phototoxicity of mTHPC delivered by PEGylated NP, in comparison to the standard solvent, is very likely explained with the lower uptake of the drug. In cancer cells, but not in normal fibroblasts, reduction of viability caused by the exposure to increasing doses of mTHPC entrapped in PEGylated NP was partially due to the cytotoxicity of the empty PEGylated nanovehicle. This different response could depend from the presence in CCD-34Lu cells of efficient protection mechanisms against oxidative stress, as suggested from the high endogenous production of ROS in this cell line. In this project various types of unilamellar PEGylated liposomal formulations (Fospeg) were also studied as nanocarriers of mTHPC, which can be encapsulated in the phospholipidic bilayer. The liposomes used in this work were different for density (2-8 mol% of total lipids) and length (750, 2000, 5000) of PEG chains. We have used A549 and CCD-34Lu cells to evaluate the dark toxicity of mTHPC delivered by Fospeg in comparison to the delivery by standard solvent. We studied also how PEG chain density and length affect cellular uptake and PDT efficacy in cells *in vitro*. The encapsulation of mTHPC in PEGylated liposomes reduced drug cytotoxicity in the dark in both cell lines. The photosensitization efficiency of mTHPC toward the tumour cells *in vitro* was slightly reduced with the delivery by Fospeg in comparison to standard solvent and this correlated with the slightly lower uptake. Fluorescence microscopy revealed a rapid internalization of mTHPC and a cytoplasmic localization, mainly in the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum, in both cell lines and irrespective of the modality of delivery (Fospeg or standard vehicle). To demonstrate if the PS was released from liposomes before the cellular internalization,

we used the PEGylated liposomes labeled with a fluorescent lipid. A lysosomal localization was observed for liposomal probe Rhodamin-lipid suggesting that mTHPC was released from liposomes.

The results show that ORMOSIL NP and PEGylated liposomes can be used as nanosystems for the delivery of hydrophobic drugs and that the leaking of the drug from nanovehicles can be avoid by the covalent inclusion of the drug in the nanovehicles. Future studies for improving the intracellular uptake and the selectivity of cancer therapy are direct to the functionalization of nanocarrier surface with ligands specifically recognised by receptors over-expressed in cancer cells.

2

***INTRODUZIONE***

## 2.1 LA TERAPIA FOTODINAMICA (PDT)

### 2.1.1 Applicazioni e meccanismo d'azione della PDT

La terapia fotodinamica o PDT (PhotoDynamic Therapy), importante applicazione della fotochemioterapia studiata ormai da anni (Dougherty et al., 1998), è una modalità terapeutica utilizzata soprattutto in campo oncologico per il trattamento di vari tipi di tumori solidi, sia superficiali che profondi, a scopo curativo o palliativo rispettivamente per quelli in stadio precoce o avanzato. Paragonata alle tradizionali terapie antitumorali (chirurgia, radioterapia e chemioterapia), essa richiede tecniche solo minimamente invasive, può essere ripetuta diverse volte, permette una distruzione più selettiva del tessuto neoplastico, risparmiando il tessuto sano circostante (Scharman et al., 1999) e, a parte la prolungata fotosensibilità cutanea, non presenta effetti collaterali significativi (Schuitmaker et al., 1996). La PDT è stata approvata in diversi paesi per alcuni tipi di tumori, quali tumori di testa e collo, cervello, polmone, pancreas, cavità intraperitoneale, seno, prostata e cute (Dolmans et al., 2003). Essa però presenta anche una potenziale applicazione nella cura di condizioni patologiche non neoplastiche, come la psoriasi, la degenerazione maculare della retina associata all'età, le condizioni autoimmuni, l'artrite reumatoide e l'aterosclerosi (Dolmans et al., 2003; Levy, 1995).

La PDT si basa sulla somministrazione topica o sistemica di un cromoforo esogeno, detto fotosensibilizzatore (PS), in grado di innescare, dopo attivazione con luce di lunghezza d'onda compresa nel suo spettro di assorbimento, una serie di reazioni che, in presenza dell'ossigeno molecolare nel microintorno, portano alla formazione di specie altamente reattive dell'ossigeno (ROS). Tali specie, in particolare l'ossigeno di singoletto ed i radicali liberi, sono fortemente citotossiche, pertanto in grado di provocare danno e morte cellulare nel tessuto patologico in cui si è accumulato il PS (Fig. 1).

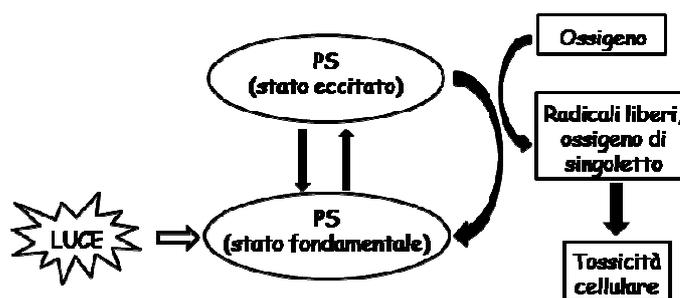


Fig. 1 Meccanismo d'azione della PDT.

Quando un PS assorbe un fotone di specifica lunghezza d'onda (Fig. 2) si ha la promozione di una transizione elettronica che lo porta dal suo stato fondamentale di singoletto a bassa energia ( $S_0$ ) ad uno stato eccitato di singoletto ( $S_1$ ) a più alto contenuto energetico, caratterizzato da un breve tempo di vita (dell'ordine del nanosecondo). Nello stato  $S_0$  gli elettroni, che si trovano nell'orbitale molecolare più esterno, presentano spin antiparalleli; stato di spin che viene mantenuto durante la

transizione, anche se nello stato eccitato  $S_1$  gli elettroni occupano orbitali molecolari a più alta energia. Da questo stato  $S_1$ , il PS può tornare allo stato  $S_0$  attraverso la via non radiativa (conversione dell'energia luminosa in termica) o la via radiativa (emissione di fluorescenza), oppure essere convertito nello stato di tripletto ( $T_1$ ) via intersystem crossing (ISC), che comporta l'inversione di spin dell'elettrone eccitato. Lo stato di tripletto, caratterizzato quindi dalla presenza di due elettroni spaiati con spin elettronici paralleli, può tornare allo stato fondamentale per via non radiativa o per via radiativa (emissione di fosforescenza). Esso possiede un tempo di vita più lungo (circa  $10^{-3}$  s) rispetto al singoletto eccitato (Moan e Sommer, 1985), poiché la transizione  $T_1 \rightarrow S_0$  implica un'inversione dello spin elettronico ed è proibita sulla base di leggi della meccanica quantistica. Proprio per questo motivo il tripletto è la specie direttamente coinvolta nei processi di fotosensibilizzazione in quanto può interagire con le molecole presenti nel suo microintorno (Jori, 1980).

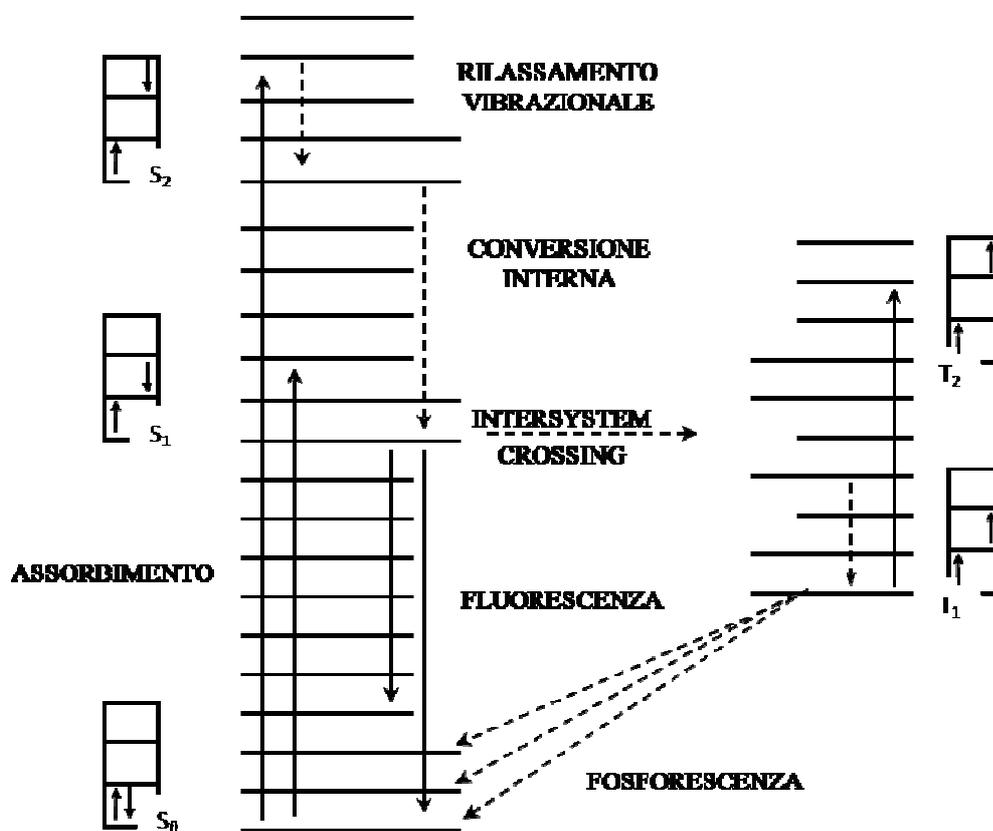


Fig. 2 Diagramma di Jablonski semplificato: principali eventi fotofisici conseguenti all'eccitazione elettronica di una molecola. I simboli  $S_0, S_1, S_2, T_1$  e  $T_2$  rappresentano gli stati elettronici di singoletto (S) e tripletto (T) a diversa energia con i rispettivi sottolivelli vibrazionali.

Le reazioni di fotosensibilizzazione possono essere innescate dallo stato di tripletto secondo due diversi meccanismi, definiti di tipo I e tipo II (Foote, 1976). Essi possono avvenire contemporaneamente, ma quello prevalente dipende dal tipo di PS usato, dalle concentrazioni relative di substrati ed ossigeno, come pure dall'affinità di legame del PS per il substrato (Dolmans et al., 2003). Il meccanismo di tipo I prevede una reazione

diretta del PS nello stato di tripletto con un substrato biologico ed il trasferimento di protoni e/o di elettroni a formare specie radicaliche, anioniche e/o cationiche rispettivamente, che possono reagire con l'ossigeno per produrre ROS (Robertson et al., 2009). Se il PS trasferisce elettroni all'ossigeno molecolare si ha la formazione dell'anione superossido  $O_2^{\cdot-}$ , il quale può dare origine ad altre specie reattive come  $H_2O_2$  e  $OH^{\cdot}$ . Il meccanismo di tipo II prevede un trasferimento di energia dallo stato di tripletto eccitato del PS allo stato fondamentale di tripletto dell'ossigeno molecolare con la formazione di ossigeno di singoletto ( $^1O_2$ ). Quest'ultima specie, estremamente reattiva e citotossica, è quella maggiormente prodotta dai PS usati in PDT e possiede un breve tempo di vita nei sistemi biologici ( $< 0.04 \mu s$ ) e quindi un piccolo raggio d'azione ( $< 0.02 \mu m$ ) (Moan e Berg, 1991). Proprio a causa del breve raggio d'azione i siti cellulari e tissutali colpiti direttamente dalla PDT, e quindi danneggiati, sono strettamente prossimali all'area di produzione dell'ossigeno di singoletto e pertanto ai siti di localizzazione del PS al momento dell'irradiamento (Peng et al., 1996; Dougherty et al., 1998). La PDT, di conseguenza, non può essere utilizzata per trattare malattie diffuse, non sufficientemente localizzate. Inoltre, dato che la fotoattivazione avviene solamente quando il PS è esposto alla luce, i tumori non superficiali non sono facilmente accessibili, a meno che la luce utilizzata possa essere in grado di penetrare in profondità (Palumbo, 2007). La luce infatti non penetra facilmente nei tessuti umani, poiché può venire deviata o assorbita in modo dipendente dalla tipologia del tessuto e dalla lunghezza d'onda di luce utilizzata (Robertson et al., 2009). L'assorbimento è ampiamente dovuto alla presenza di cromofori tissutali endogeni quali l'emoglobina, la mioglobina ed i citocromi (Juzeniene e Moan, 2007). Gli agenti fotosensibilizzanti utilizzati preferenzialmente nella PDT possiedono bande spettrali nel rosso (600-800 nm) proprio perché la luce rossa presenta un potere elevato di penetrazione tissutale e, essendo assorbita debolmente dai cromofori endogeni presenti (eccetto la melanina), favorisce la selettività del processo terapeutico, minimizzando gli effetti collaterali indesiderati a livello dei tessuti sani. Tale regione dello spettro elettromagnetico è definita "finestra terapeutica" proprio per la massima capacità che hanno tali lunghezze d'onda di penetrare attraverso i tessuti (Svaasand et al., 1990).

Le sorgenti luminose normalmente utilizzate per trattare i tumori superficiali sono sistemi laser accoppiati a fibre ottiche (Brancaleoni e Moselen, 2002). I laser possono offrire dei vantaggi in quanto emettono monocromaticamente e con un'elevata potenza di luce, permettendo così di ridurre i tempi di esposizione terapeutica. Nel caso di tumori situati in organi cavi la luce può essere invece indirizzata al sito di interesse attraverso l'uso di un endoscopio flessibile a fibre ottiche (Murrer et al., 1997). L'efficienza della PDT, oltre ad essere determinata dalla localizzazione tumorale del PS (Dolmans, 2003), dipende anche dalla dose totale di luce che viene indirizzata nel tessuto bersaglio, dall'intervallo di tempo che trascorre tra la somministrazione del PS e l'irradiamento, dallo stato di ossigenazione del tessuto e dal tipo di cellule coinvolte.

I meccanismi attraverso i quali la PDT può causare distruzione del tumore sono tre e possono influenzarsi l'un l'altro. L'importanza relativa di ognuno per la risposta tumorale complessiva deve essere ancora definita, ma comunque è chiaro che la combinazione di tutti è richiesta per il controllo a lungo termine del tumore (Dolmans et al., 2003). Il prevalere di un meccanismo rispetto ad un altro dipende comunque da molteplici fattori tra i quali il PS utilizzato, le condizioni di trattamento, il tipo di tumore e la dose di luce utilizzata. Essi sono:

- a. morte diretta delle cellule tumorali da parte delle specie reattive dell'ossigeno che si generano. Tale meccanismo da solo non permette però la completa eradicazione del tumore, poiché la distribuzione del PS al suo interno non è omogenea e la disponibilità di ossigeno nel tessuto bersaglio della PDT può essere scarsa;
- b. danno della vascolarizzazione associata alla massa tumorale; infatti la vitalità delle cellule neoplastiche dipende anche dalla quantità di ossigeno e nutrienti fornita dai vasi sanguigni, la cui formazione e sviluppo dipendono da fattori di crescita prodotti dalle cellule tumorali. Il trattamento fotodinamico causa una risposta bifasica costituita da una risposta acuta, che si osserva immediatamente dopo l'irradiazione, caratterizzata da vasocostrizione, e da una risposta a lungo termine, che si osserva a partire dalle 3 ore successive all'irradiazione, caratterizzata dalla formazione del trombo (Dolmans et al., 2002). L'ipossia/anossia del tessuto, dovute a collassi microvascolari, determinano degli effetti ritardanti la crescita del tumore (Chen et al., 1996);
- c. attivazione di una risposta immunitaria contro le cellule tumorali. Si verifica infatti un'infiltrazione di linfociti, leucociti e macrofagi nel tessuto trattato con PDT, ma soprattutto un accumulo di neutrofili, che rallentano la crescita tumorale. Il processo infiammatorio è mediato da sostanze vasoattive, componenti del complemento, proteine della fase acuta, proteinasi, perossidasi, ROS, citochine, fattori di crescita e altri immunoregolatori.

### **2.1.2 Bersagli cellulari della PDT**

I fattori che influiscono sull'accumulo e sulla distribuzione subcellulare del PS, determinando i siti primari del fotodanno, sono molteplici e comprendono la struttura chimica, lo stato di aggregazione, la carica elettrica, il grado di idro/lipoficità, il tempo di incubazione e la concentrazione del PS (Kessel et al., 1995; Gomer et al., 1990; Moor, 2000), come anche le condizioni sperimentali adottate, la tipologia di cellule bersaglio e la modalità di veicolazione del PS utilizzata (Palumbo, 2007). Gli agenti fotosensibilizzanti possono localizzarsi in diversi organelli e compartimenti cellulari quali i mitocondri, i lisosomi, il reticolo endoplasmatico, l'apparato del Golgi e la membrana plasmatica (Peng et al., 1996; Pass, 1993; Pazos e Nader, 2007). Poiché la maggior parte di essi non si accumula a livello nucleare, il trattamento fotodinamico ha generalmente basse probabilità di causare danno al DNA e mutazioni (Moan, 1986). Tra

le basi azotate del DNA, solamente la guanina presenta un'apprezzabile fotosensibilità per il trattamento con PDT ed è quindi un possibile bersaglio. In alcuni studi *in vitro* è stata tuttavia osservata una potenziale mutagenicità dipendente dalla presenza di meccanismi cellulari di riparazione del danno. Le biomolecole presenti a livello cellulare sono sensibili alla fotoossidazione in diversa misura: i carboidrati sono poco sensibili, mentre alcuni aminoacidi, il colesterolo, gli acidi grassi insaturi ed i nucleotidi (in particolare quelli con base purinica) sono molto sensibili.

La morte cellulare mediata dalla PDT può essere attuata mediante necrosi o apoptosi (Dougherty et al., 1998; Pass, 1993). Il fatto che un PS induca prevalentemente l'uno o l'altro tipo di morte cellulare dipende da una serie di fattori: il bersaglio subcellulare primario, il tipo di cellule trattate, il protocollo di incubazione applicato e la dose di luce applicata (McBride, 2002). Il fotodanno a livello di lisosomi e soprattutto di mitocondri produce una rapida risposta apoptotica, mentre quello a livello di membrana sembra ritardare o impedire una risposta apoptotica alla PDT (Kessel et al., 1997). In genere si pensava che basse dosi di PDT provocassero la morte cellulare mediante apoptosi, mentre alte dosi la causassero attraverso necrosi (Ketabchi et al., 1998). Alcuni recenti studi hanno indicato che anche l'autofagia potrebbe essere coinvolta nella morte cellulare indotta dalla PDT (Kessel e Oleinick, 2009).

I fotosensibilizzatori idrofobici si localizzano preferenzialmente nella membrana plasmatica, i cui costituenti (lipidi e proteine) sono un bersaglio dell'azione fotodinamica. Sulla membrana il fotodanno può essere osservato pochi minuti dopo l'irradiazione e possono essere innescate varie vie di trasduzione di segnali il cui ruolo non è completamente chiarito (Moor, 2000). Dal punto di vista chimico il danno indotto dalla PDT alla membrana plasmatica si traduce in: ossidazione di aminoacidi (metionina, triptofano, istidina, tirosina, cisteina) delle proteine di membrana ed enzimi specifici di membrana, tra cui ATPasi, e perossidazione lipidica, che può causare danni alle proteine di membrana attraverso la formazione di legami crociati lipide-proteina (Thomas e Girotti, 1989). Dal punto di vista morfologico e funzionale le alterazioni della membrana plasmatica si manifestano come: rigonfiamento cellulare ed aumento della permeabilità al cromato (Moan et al., 1983) e ad enzimi citosolici, come la lattato deidrogenasi; depolarizzazione del potenziale di membrana (Specht e Rodgers, 1990); aumento dell'accumulo intracellulare di PS (Moan e Christensen, 1981); alterazione del trasporto ionico attraverso la membrana, causato da inibizione dell'attività delle pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (Gibson et al., 1988) e danno a trasportatori di varie molecole; aumento di  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare (Joshi et al., 1994).

Anche i mitocondri rappresentano dei bersagli importanti del trattamento fotodinamico. Alcune porfirine, ad esempio, possiedono un'elevata affinità per i recettori periferici per le benzodiazepine della membrana mitocondriale esterna (Verma et al., 1995). Studi *in vitro* hanno dimostrato che i danni a livello mitocondriale riguardano: rigonfiamento e cambiamenti ultrastrutturali dei mitocondri (Coppola e Rasile, 1981); diminuzione dell'attività degli enzimi mitocondriali (Hilf et al., 1984) ed inibizione dei trasportatori

di  $\text{Ca}^{2+}$  (Salet et al., 1983), di elettroni (Salet e Moreno, 1995), di ATP/ADP (Atlante et al., 1989). Gli effetti indotti dall'irradiazione sui mitocondri comprendono il rilascio di citocromo c dallo spazio intermembrana al citosol delle cellule ed una rapida perdita del potenziale di membrana, a causa dell'apertura del poro di transizione di permeabilità mitocondriale (Kessel e Luo, 1999). L'apertura di questo poro causa il rilascio di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e molto probabilmente di citocromo c (Moor, 2000). Il rilascio di citocromo c ed altri fattori mitocondriali può scatenare una rapida risposta apoptotica caspasi-dipendente (Dougherty et al., 1998). Il rilascio di citocromo c può essere inibito da Bcl-2, una proteina localizzata nelle membrane mitocondriali con funzione anti-apoptotica (Yang et al., 1997); infatti linee cellulari con Bcl-2 sovraespressa manifestano resistenza alla PDT. Il fotodanno ai mitocondri, come anche al reticolo endoplasmatico, può inoltre determinare una perdita di funzionalità dei membri della famiglia Bcl-2, causando in genere il rilascio di proteine pro-apoptotiche, quali Bax e Bad che, legandosi alla membrana mitocondriale, determinano l'apertura dei pori ed il rilascio di citocromo c. Alcuni fotosensibilizzatori inibiscono enzimi coinvolti nella catena respiratoria, bloccando per esempio il trasporto di elettroni e l'attività del complesso I. La deplezione di ATP dopo fotodanno mitocondriale inibisce l'attuazione del programma apoptotico e favorisce il processo necrotico.

I lisosomi e gli endosomi rappresentano un altro sito di localizzazione preferenziale di molti fotosensibilizzatori, in particolare di quelli aggregati e/o idrofilici, che vengono accumulati mediante processi di endocitosi e/o pinocitosi. In seguito a fotoattivazione, tali fotosensibilizzatori possono causare morte cellulare attraverso il rilascio nel citosol di enzimi idrolitici lisosomiali in grado di degradare vari costituenti cellulari, oppure mediante rilocalizzazione, durante la fotoattivazione, in siti non lisosomiali che vengono quindi inattivati (Berg e Moan, 1997). In alcuni casi è stata descritta l'induzione di apoptosi mediata da fotosensibilizzatori localizzati nei lisosomi, ma questo risulta essere comunque un processo molto più lento rispetto a quello indotto dai fotosensibilizzatori mitocondriali. Il rilascio delle proteasi lisosomiali nel citosol provoca taglio proteolitico di alcune piccole proteine (Bid) fornendo una forma troncata (tBid), che è in grado di indurre apertura dei pori della membrana mitocondriale causando apoptosi. I lisosomi sono implicati in un meccanismo di morte cellulare mediato dalla produzione fotoindotta di ceramide (Sawai e Hannun, 1999).

Solamente pochi studi hanno dimostrato l'importanza del danno fotochimico a livello dell'apparato del Golgi e del reticolo endoplasmatico (ER), dove si accumulano fotosensibilizzatori idrofobici e privi di carica. Il danno al ER è stato proposto per spiegare l'eccezionale efficacia di un PS, la toliporfina, rispetto ad altri agenti fotosensibilizzanti (Morlière et al., 1998).

Anche alcune componenti del citoscheletro possono essere danneggiate dalla PDT; è stato dimostrato infatti che certi fotosensibilizzatori si legano alla tubulina e ne inibiscono la polimerizzazione, con conseguente accumulo di cellule in mitosi (Berg et al., 1992).

Il trattamento fotodinamico può innescare varie vie di trasduzione del segnale, alcune delle quali sono delle risposte allo stress mirate alla protezione cellulare (Oleinick e Evans, 1998). Un effetto della PDT utile per proteggere le cellule dagli effetti del fotodanno è l'aumentata fosforilazione dei residui di tirosina di proteine coinvolte nelle vie di trasduzione del segnale apoptotico (Xue et al., 1997). In cellule trattate, lo stress ossidativo mediato dalla PDT può essere un induttore trascrizionale di geni a risposta rapida, compresi quelli codificanti per proteine dello stress, agendo attraverso vie di trasduzione del segnale mediate da protein-chinasi (Luna et al., 1994; Luna et al., 2000). Le heat shock proteins (HSPs), una famiglia di proteine dello stress coinvolta nella risposta di riparo delle cellule al fotodanno, possono pertanto essere sovraesprese in seguito al trattamento fotodinamico. Per quanto riguarda l'induzione di HSP-70 dopo stress ossidativo sono determinanti i bersagli subcellulari specifici della PDT, in particolare essa è più efficace utilizzando fotosensibilizzatori che si localizzano preferenzialmente nei lisosomi (Gomer et al., 1996).

La PDT induce anche un'aumentata espressione di proteine glucosio-regolate, che svolgono la loro funzione nel ER e la cui traduzione sembra giocare un ruolo nella modulazione di effetti citotossici dello stress ossidativo.

Molti studi in linee cellulari neoplastiche hanno evidenziato che la PDT può indurre completa perdita di EGFR (epidermal growth factor receptor) nella membrana cellulare, inducendo così risposte anti-proliferative (Santonocito et al., 2005), come anche aumentarne la sovraespressione e la fosforilazione, inducendo apoptosi e quindi regressione della metastasi. La PDT può causare anche alterazioni nell'adesione delle cellule al loro substrato e ad altre cellule (Buytaert et al., 2007) in quanto possono venire danneggiate le molecole di adesione presenti nelle membrane. E' stato dimostrato da alcuni studi che una diminuzione dell'adesione cellulare può essere direttamente correlata ad una diminuzione del potenziale metastatico delle cellule neoplastiche. In molti casi dopo PDT si è notata una sovra- o sottoespressione di citochine, che spesso sono correlabili alla regressione tumorale (Roland et al., 2007).

### **2.1.3 I fotosensibilizzatori utilizzati nella PDT**

Esistono numerose molecole, di natura sia idrofobica che idrofilica, che possono funzionare come fotosensibilizzatori. Alcuni sono di origine naturale estratti da piante ed altri ottenuti per sintesi chimica, e possiedono una struttura più o meno complessa (Sharman et al., 1999). Dal punto di vista chimico si tratta solitamente di composti con struttura policiclica in cui una nuvola di elettroni  $\pi$ , più o meno delocalizzata, favorisce l'assorbimento di luce di lunghezze d'onda che si estendono fino alla regione del rosso o vicino infrarosso.

Le molecole di PS tendono ad accumularsi selettivamente e ad essere trattenute da cellule anormali ed iperproliferanti, in particolare se irrorate da una fitta neovascolarizzazione, come avviene nei tessuti neoplastici (Levy, 1995). Tale accumulo

preferenziale dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche del PS e dalle caratteristiche fisiologiche del tessuto tumorale bersaglio, come ad esempio l'assenza di vasi linfatici drenanti; tuttavia i meccanismi con cui avviene tale accumulo selettivo non sono ancora completamente definiti. Studi condotti con fotosensibilizzatori aventi diverso grado di idrofobicità hanno dimostrato che la loro affinità per i tessuti neoplastici cresce all'aumentare dell'idrofobicità (Dougherty et al., 1998). E' noto, infatti, che fotosensibilizzatori eccessivamente idrofilici, come l'uroporfirina, non penetrano all'interno delle cellule.

I PS idrofobici, quando vengono somministrati per via endovenosa, si associano con lipoproteine plasmatiche, in particolare con lipoproteine a bassa densità (LDL). Molti tipi di cellule tumorali esprimono un numero maggiore di recettori di membrana specifici per le LDL rispetto alle cellule normali (Allison et al., 1994) e tali recettori promuovono l'internalizzazione per vie endocitotiche dei fotosensibilizzatori veicolati dalle LDL. Questi, in seguito a fotoattivazione, inducono quindi un rapido danno diretto alle cellule tumorali, innescando processi sia apoptotici che necrotici (Zaidi et al., 1993).

I fotosensibilizzatori meno idrofobici, invece, vengono trasportati nel sangue preferenzialmente dall'albumina o da altre proteine sieriche e vanno ad accumularsi soprattutto negli spazi interstiziali e nello stroma vascolare del tessuto neoplastico, non diffondendo facilmente attraverso la membrana plasmatica. Una volta attivati dalla luce essi provocano un esteso danno al sistema vascolare promuovendo ischemia ed ipossia del tumore a causa di costrizione arteriolare, occlusione trombotica delle vene e stasi del flusso sanguigno al tumore.

Un altro fattore importante per l'accumulo di fotosensibilizzatori di tipo porfirinico è il pH. Rispetto ai tessuti normali, nei tessuti tumorali il pH del fluido interstiziale è più basso ed il contenuto di acido lattico più elevato (Tannock e Rotin, 1989). In genere, col diminuire del pH, aumenta la lipofilità e quindi l'accumulo cellulare di porfirine.

Finora i fotosensibilizzatori più estesamente studiati ed utilizzati nella PDT sperimentale e clinica sono i **fotosensibilizzatori di prima generazione**, ossia le porfirine. Tali composti, che comprendono l'ematoporfirina (Hp), il derivato dell'Hp (HpD) ed il Photofrin, possiedono una struttura porfinica, costituita da quattro anelli pirrolici legati da ponti metinici in una configurazione ciclica (Dolmans et al., 2003). L'HpD è una complessa miscela di monomeri, dimeri e oligomeri di porfirine legate mediante legami esterei ed eterei, sintetizzata originariamente mediante trattamento dell'ematoporfirina grezza. Il Photofrin, PS più comunemente utilizzato oggi in clinica come utile strumento contro il cancro ed altre condizioni patologiche, è un HpD parzialmente purificato ottenuto attraverso la rimozione dei monomeri di porfirine meno attivi dal punto di vista fotodinamico (Dougherty et al., 1998). La prima approvazione per la PDT clinica con Photofrin è stata ottenuta nel 1993 in Canada per il trattamento del cancro alla vescica e, successivamente, è stato approvato in diversi paesi Europei ed Americani per il trattamento di diversi tipi di tumore in stadio precoce o avanzato

(Dolmans et al., 2003). Il Photofrin, disponibile come preparazione acquosa iniettabile, possiede vari picchi di assorbimento tra 400 e 650 nm. Nonostante la sua banda di assorbimento a 630 nm sia debole, è quella utilizzata per attivarlo nei trattamenti clinici, in quanto tale lunghezza d'onda ha un maggior potere di penetrazione nei tessuti rispetto alle lunghezze d'onda assorbite con maggior efficienza dal Photofrin (Sharman et al., 1999). Tuttavia la luce a 630 nm è in grado di penetrare efficacemente i tessuti solo fino a 3-10 mm di profondità, limitando pertanto la dimensione e la profondità dei tumori che possono essere irradiati (Levy, 1995). Oltre a ciò, questo PS presenta svariate altre limitazioni: risulta difficile riprodurre la composizione chimica in quanto si tratta di una complessa miscela costituita da circa sessanta componenti; deve essere somministrato ad elevate dosi (2 mg/Kg di peso corporeo) e per la sua attivazione devono essere impiegate elevate dosi di luce, poiché il suo coefficiente di estinzione molare alla lunghezza d'onda di 630 nm è basso ( $1.170 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ); viene eliminato dall'organismo in modo relativamente lento e non è molto selettivo per il tessuto tumorale; causa fotosensibilità cutanea prolungata in quanto si localizza nella cute dove viene trattenuto. Proprio per quest'ultima ragione i pazienti trattati con Photofrin devono evitare l'esposizione a sorgenti luminose intense per le 4-6 settimane successive al trattamento (Sibata et al., 2001).

Per superare queste limitazioni sono in fase di studio e di sviluppo una serie di nuove molecole, definite nell'insieme **fotosensibilizzatori di seconda generazione**, che presentano alcune proprietà migliorate rispetto al Photofrin, quali: la purezza chimica, un più alto coefficiente di estinzione molare nella regione rossa dello spettro, la presenza di picchi di assorbimento della luce a lunghezze d'onda superiori di 630 nm per permettere una penetrazione maggiore nel tessuto, anche fino a 1 cm (Palumbo, 2007), ed una diminuita e meno persistente fotosensibilità cutanea (Gomer, 1991).

Ai fotosensibilizzatori di seconda generazione appartengono: la stagno etileziopurpurina (SnET2) e la n-aspartil clorin e6 (Npe6), attivate con luce di 664 nm; ftalocianine e naftalocianine, attivate rispettivamente con lunghezze d'onda di 670–680 nm e 750–780 nm; l'ipericina, una sostanza che si trova naturalmente nelle piante e che è un promettente agente fotodiagnostico ed antitumorale nella PDT soprattutto per la sua alta resa di ossigeno di singoletto (Pytel e Schmeller, 2002); il derivato monoacido della benzoporfirina (BPD-MA) che, attivato da luce di 689 nm, è stato associato a lipocomplessi per ridurre le dosi da utilizzare e migliorarne l'assorbimento e specificità nel tumore (Palumbo, 2007); l'acido aminolevulinico (ALA), che ha suscitato notevole interesse in particolare per il potenziale utilizzo nel trattamento e/o diagnosi di varie lesioni superficiali tumorali e non (Kennedy et al., 1996; Peng et al., 1997). La somministrazione di ALA, precursore naturale della via biosintetica della produzione dell'eme, induce nelle cellule, soprattutto quelle tumorali, la sintesi di porfirine, in particolare protoporfirina IX che è un efficace PS (Kennedy et al., 1990). La PDT con 5-ALA e 5-ALA metilestere, effettuata mediante applicazione topica seguita da

irradiazione rispettivamente con luce blu o rossa, è stata approvata per il trattamento della cheratosi actinica e di carcinomi basocellulari della pelle (Dolmans et al., 2003).

Un altro PS di seconda generazione è la **meta-tetra(idrossifenil)clorina o Temoporfin (mTHPC, nome commerciale Foscan<sup>®</sup>)**, PS utilizzato in questo lavoro di Dottorato di Ricerca. Si tratta di un composto con purezza al 98% e con un coefficiente di assorbimento elevato alla lunghezza d'onda alla quale viene attivato, ossia 650 nm. Esso induce fotosensibilità cutanea più breve rispetto ai fotosensibilizzanti di prima generazione ed è quello che possiede maggiore attività fototossica tra i fotosensibilizzatori finora studiati. Per il protocollo standard di trattamento delle neoplasie con mTHPC sono sufficienti infatti dosi molto basse (0.1-0.3 mg/kg di peso corporeo) combinate con basse dosi di luce rossa (8-12 J/cm<sup>2</sup>) (Sharman et al., 1999). Tale PS risulta circa 100-200 volte più fotoattivo rispetto al Photofrin (Hopkinson et al., 1999), il quale viene invece iniettato a dosi di 2-5 mg/Kg di peso corporeo ed irradiato con una dose di luce pari a 100-200 J/cm<sup>2</sup> (Dougherty et al., 1998). Le ragioni di questa attività eccezionalmente elevata a dosi relativamente basse non sono ancora completamente chiarite (Yow et al., 2000). Sebbene le proprietà ottiche e la resa quantica di ossigeno di singoletto possano in parte spiegare tale aumentata fototossicità, pare che il meccanismo di accumulo e localizzazione intratumorale e subcellulare del PS possa essere un fattore determinante. E' stato ipotizzato che dopo iniezione intravenosa la mTHPC possa complessarsi con una proteina plasmatica non nota, differente dall'albumina o dalle lipoproteine, e questa associazione potrebbe determinare le diverse localizzazioni subcellulari e fornire una spiegazione alla sua specifica farmacocinetica. La mTHPC, comunque, data la sua natura idrofobica possiede più alta affinità per le lipoproteine rispetto all'albumina (Hopkinson et al., 1999).

Nel 2001 la mTHPC è stata approvata dall'EMEA (European Medicines Evaluation Agency) per il trattamento palliativo di pazienti con tumori della testa e del collo in stadio avanzato, non responsivi alle tradizionali terapie antitumorali (Leung et al., 2002). In diversi studi clinici sono stati trattati anche tumori dell'esofago, carcinomi della prostata e del pancreas, tumori gastrointestinali, displasie della cervice e risultati molto incoraggianti sono stati ottenuti anche nel trattamento di tumori della cute.

La struttura chimica dell'mTHPC è analoga a quella della rispettiva porfirina, ma diversamente da questa possiede una parziale idrogenazione di uno degli anelli pirrolici. E' costituita pertanto da un insieme di quattro anelli pirrolici, di cui uno in forma ridotta, legati fra loro da quattro atomi di carbonio, ai quali si legano quattro fenili idrossilati in posizione *meta* (Fig. 3). Per le sue proprietà fisico-chimiche il veicolo standard utilizzato per la sua somministrazione sistemica è costituito da una miscela di poli(etilene glicole) (PEG) ed etanolo assoluto, ed il trattamento fotodinamico viene eseguito 24-48 ore dopo l'iniezione (Sharman et al., 1999). In solventi organici la mTHPC si trova in forma monomerica ed ha un tipico spettro di assorbimento caratterizzato da un picco massimo a 416 nm, detto banda di Soret, e da una serie di

picchi minori compresi tra 500 e 700 nm (520, 540, 600 e 650 nm), detti nell'insieme bande Q, tra i quali si ritrova un elevato picco a 650 nm sfruttato per l'irradiazione con luce rossa (Fig. 4). In ambiente acquoso, invece, questa clorina forma dimeri ed aggregati e di conseguenza subisce delle modificazioni spettroscopiche, che riguardano soprattutto una diminuzione di intensità dei picchi di assorbimento ed uno spostamento della banda di Soret a lunghezza d'onda maggiore. Tali aggregati sono inefficienti nella produzione di ossigeno di singoletto (Tanielian et al., 2001).

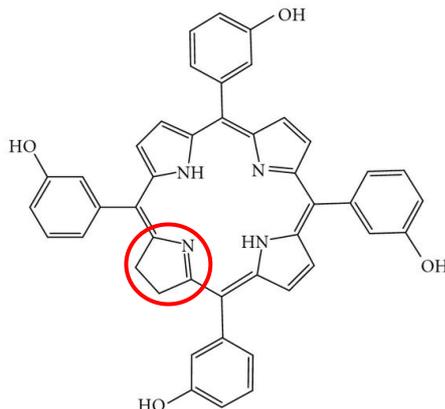


Fig. 3 Struttura chimica della mTHPC.

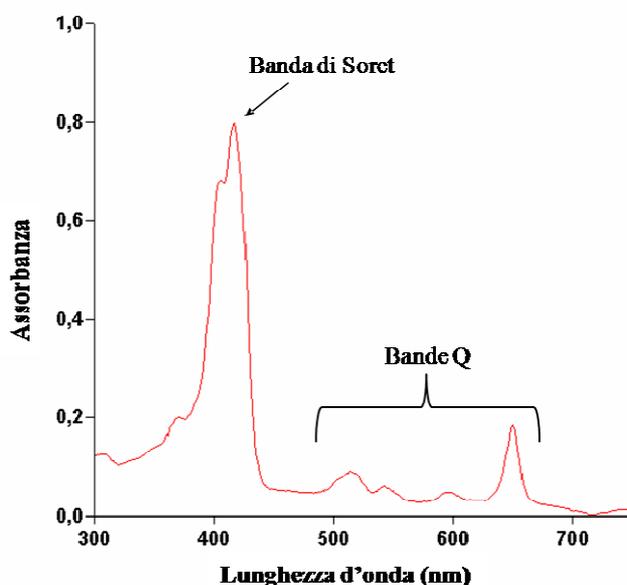


Fig. 4 Spettro d'assorbimento della mTHPC in etanolo assoluto.

Studi spettroscopici hanno dimostrato che la mTHPC disciolta in una soluzione contenente proteine risulta essere una miscela di monomeri ed aggregati (Sasnouski et al., 2005). La mTHPC, avendo vari siti di protonazione e deprotonazione, è molto sensibile a variazioni del pH, per cui modificazioni dello spettro d'assorbimento si possono verificare anche in seguito a protonazione dovuta a una diminuzione del pH. Anche l'intensità della fluorescenza emessa dalla clorina diminuisce significativamente per valori di pH inferiori a 6, mentre nell'intervallo di valori di pH fisiologici (6.5-7.2)

la fluorescenza emessa dalla mTHPC in etanolo è pH indipendente (Zimmermann et al., 2002).

Come menzionato da Leung et al. (2002), la localizzazione intracellulare dell'mTHPC sembra dipendere dal modello cellulare considerato e dai parametri utilizzati nel protocollo di incubazione. Due studi recenti hanno dimostrato che nelle linee cellulari HT29 e MCF-7 la mTHPC ha una distribuzione intracellulare diffusa nel citoplasma con un'intensa fluorescenza nella regione perinucleare dove sono localizzati l'apparato del Golgi ed il reticolo endoplasmatico (Melnikova et al., 1999; Teiten et al., 2001). Anche altri studi su linee cellulari diverse hanno evidenziato una medesima localizzazione subcellulare (Yow et al., 2000; Hornung et al., 1997). Il reticolo endoplasmatico e l'apparato del Golgi sono strettamente legati non solo per la loro localizzazione nella zona perinucleare del citoplasma, ma anche per la loro interazione nel processo di sintesi di proteine. Il reticolo endoplasmatico è noto giocare un ruolo essenziale nella biosintesi, segregazione e trasporto di proteine e lipidi, come anche nel rilascio di riserve di calcio intracellulare (Terasaki et al., 1984). L'apparato del Golgi riceve le proteine neosintetizzate dal reticolo e le modifica chimicamente, per esempio, mediante glicosilazione (Short e Barr, 2000). Altri studi hanno mostrato una localizzazione lisosomiale in cellule umane di adenocarcinoma del colon Colo201 (Leung et al., 2002) o mitocondriale in cellule di carcinoma nasofaringeo (Yow et al., 2000).

Savary et al. (1997) hanno condotto molti studi clinici per ottimizzare i protocolli di PDT con la mTHPC per il trattamento di carcinomi squamocellulari dell'esofago, dei bronchi e della bocca in stadio precoce. Delle 33 lesioni trattate in pazienti, 28 non hanno mostrato recidiva nei 14 mesi successivi. Nonostante questo risultato promettente ed i vantaggi che si hanno rispetto agli agenti fotosensibilizzanti di prima generazione, la mTHPC, come molti altri fotosensibilizzatori, presenta ancora alcune limitazioni, in particolare la scarsa selettività tumorale che potrebbe provocare fotodanno anche ai tessuti sani circostanti, la scarsa solubilità in mezzi acquosi, che ne limita la somministrazione sistemica in pazienti (Yan e Kopelman, 2003; Palumbo, 2007), e la tossicità al buio.

Per superare tali limitazioni sono stati e si stanno tuttora sintetizzando nuovi fotosensibilizzanti con proprietà che migliorino l'efficacia e la selettività della terapia. Allo scopo di migliorare l'efficacia terapeutica è stato proposto l'utilizzo della PDT in combinazione con altri tipi di terapie (chirurgia, radioterapia, immuno- e chemioterapia), e di tecnologie innovative di veicolazione ed indirizzamento degli agenti fotosensibilizzanti (Palumbo, 2007). Finora sono stati saggiati in studi preclinici diversi sistemi di trasporto per aumentare la selettività e la specificità della localizzazione del PS nel tessuto tumorale. Uno fra questi è il fotoimmunotargeting, in cui si fa uso di coniugati PS-anticorpi monoclonali, in grado di riconoscere specifici antigeni di superficie delle cellule tumorali (Pass, 1993). Ad esempio, la clorina e6-monoetilenodiamina monoamide (CMA) o la mTHPC possono essere legati a specifici

anticorpi monoclonali (Goff et al., 1991; Vrouenraets et al., 1999). Questo approccio ha tuttavia mostrato diverse problematiche che comprendono la difficoltà di sintesi chimica, la stabilità dell'immunoconjugato, le barriere fisiologiche che si incontrano nella veicolazione (Friedrich et al., 2002) e la potenziale tossicità. Un approccio alternativo di veicolazione è l'utilizzo di ligandi che vengono riconosciuti da recettori sovraespressi nelle cellule tumorali. Ad esempio, è stato dimostrato che PS coniugati con LDL vengono internalizzati da cellule neoplastiche esprimenti specifici recettori per le LDL. Un'altra strategia è quella di indirizzare il PS ai recettori periferici per la benzodiazepina (PBR) (Dougherty et al., 2002) o per l'estrogeno in tumori ormone-dipendenti (Swamy et al., 2002). Di recente si stanno facendo molti sforzi per produrre nanostrutture, tra cui liposomi ed immunoliposomi e nanoparticelle, ossia sistemi colloidali submicrometrici in genere costituiti da polimeri, come vettori per trasportare farmaci selettivamente e specificamente a siti bersaglio, aumentandone il tempo di vita plasmatica e la solubilità (Henderson e Dougherty, 1992; Richter et al., 1993; Leroux et al., 1996; Konan et al., 2002).

## 2.2 LE NANOTECNOLOGIE

### 2.2.1 Definizione ed applicazioni della nanotecnologia

Con il termine nanotecnologia si intendono il controllo, la manipolazione, lo studio, la realizzazione e la caratterizzazione di strutture e dispositivi su scala nanometrica, ossia con dimensioni inferiori ad 1  $\mu\text{m}$ ; talvolta però si restringe tale scala dimensionale a valori compresi tra 1 e 100 nm. I recenti progressi delle nanotecnologie hanno portato a promettenti applicazioni in diversi campi; per cui svariati nanomateriali sono presenti in prodotti commerciali anche di larga diffusione, quali alimenti, cosmetici, detergenti, tessuti per l'abbigliamento, sistemi informatici ed elettronici (Medina et al., 2007).

Le notevoli applicazioni che le nanotecnologie trovano in ambito biomedico vengono nell'insieme definite come **nanomedicina**, termine coniato dal National Institute of Health (USA), e riguardano il *drug delivery*, *gene delivery* non virale, l'*imaging*, la diagnostica e la rigenerazione tissutale. Utilizzando nanosistemi opportunamente ingegnerizzati, in particolare nanoparticelle con un *core* idrofobico, si potrebbe: ottenere una diagnosi precoce rilevando poche molecole di un marcatore tumorale prodotte da un esiguo numero di cellule anormali, sequenze di DNA alterate in specifici tumori; migliorare la farmacocinetica e la farmacodinamica di sostanze scarsamente solubili in acqua; indirizzare i farmaci in una cellula o tessuto in maniera specifica, aumentandone l'efficacia e riducendone la tossicità nelle cellule sane circostanti; minimizzare la degradazione enzimatica dei farmaci trasportati e permetterne la transitosi attraverso le barriere epiteliali ed endoteliali; co-veicolare due o più farmaci contemporaneamente per effettuare una terapia combinata; visualizzare i siti d'accumulo del farmaco veicolato combinando gli agenti terapeutici con molecole per

l'*imaging* (Liong et al., 2008) e poter monitorare in tempo reale l'efficacia di un farmaco *in vivo* (Ferrari, 2005).

Le nanoparticelle sono costrutti che possiedono proprietà fisico-chimiche innovative uniche, dipendenti dalle loro dimensioni nanometriche e soprattutto dall'elevato rapporto area superficiale/volume, che conferiscono una nuova reattività chimica e nuove proprietà ottiche, magnetiche, catalitiche ed elettrochimiche.

Le caratteristiche ideali di un nanosistema per il *drug delivery* sono: la lunga emivita nel circolo sanguigno, la bassa immunogenicità, la buona biocompatibilità e l'efficiente passaggio attraverso le barriere fisiologiche (Portney e Ozkan, 2006). Per sviluppare e creare tali nanoveicoli è necessario considerare tutta una serie di parametri, che comprendono: l'utilizzo di materiali biocompatibili che possono essere assemblati con processi semplici, la possibilità di ottimizzare quei parametri biofisicochimici dei nanoveicoli che possono influire sulle proprietà farmacocinetiche e sull'accumulo cellulare del farmaco veicolato, la produzione di grandi quantità di nanosistemi da poter utilizzare in clinica (Farokhzad e Langer, 2009). Per una veicolazione efficace del farmaco è molto importante che il nanoveicolo abbia un'appropriata dimensione. In genere, si considera che la dimensione ottimale possa essere quella compresa tra 10 e 100 nm. Se essa risulta invece inferiore ai 10 nm, i nanosistemi possono essere eliminati rapidamente attraverso escrezione renale; mentre per dimensioni superiori ai 100 nm aumenta la probabilità che vengano catturati dal sistema reticolo-endoteliale (RES) (Davis et al., 2008).

La biodistribuzione dei convenzionali *nanocarriers*, oltre a dipendere dalle proprietà fisicochimiche dei nanoveicoli (dimensione, carica e idrofilicità superficiale) e dal grado di angiogenesi del tumore bersaglio (Decuzzi et al. 2009; Allen e Cullis, 2004), è fortemente influenzata da interazioni indesiderabili con proteine plasmatiche, tramite opsonizzazione, oppure col sistema fagocitico mononucleare (MPS), costituito da monociti e macrofagi che catturano ed eliminano rapidamente dalla circolazione sanguigna i nanoveicoli riconoscendoli come estranei (Konan et al., 2002). Per questi motivi, per migliorare la veicolazione e permettere l'accumulo di un'adeguata concentrazione di farmaco nel tessuto bersaglio, i nanoveicoli possono essere rivestiti superficialmente con catene di poli(etilene glicole) (PEG), un polimero idrofilico e flessibile che ne aumenta l'emivita nel circolo sanguigno (Gref et al., 1994; Lewanski e Stewart, 1999; Owens e Peppas, 2006).

Le nanostrutture sfruttano strategie di veicolazione sia attiva che passiva (Fig. 5) ed offrono la possibilità di superare il problema della farmacoresistenza, evitando la pompa di efflusso (P-glicoproteina) coinvolta in questo meccanismo (Wang et al., 2009).

I nanosistemi si accumulano nel tessuto tumorale mediante un processo passivo detto EPR (Enhanced Permeability and Retention effect), determinato dalla presenza di caratteristiche fenestrazioni endoteliali nei vasi sanguigni costituenti la microvascolarizzazione tumorale (Jain, 1987; Cuenca et al., 2006). Quando i tumori si sviluppano e crescono, si ha rilascio di citochine ed altre molecole segnale che

determinano la formazione di nuovi vasi sanguigni con un processo definito angiogenesi. Tali vasi sono caratterizzati da delle fenestrazioni larghe 600-700 nm tra cellule endoteliali adiacenti, attraverso le quali i nanoveicoli possono uscire dalla circolazione per andare a localizzarsi nel tumore. Lo scarso drenaggio linfatico a livello neoplastico favorisce il processo EPR.

Quando i nanoveicoli escono dai vasi sanguigni, l'accumulo nelle cellule tumorali può essere favorito da un processo di indirizzamento attivo, basato sulla funzionalizzazione superficiale del nanoveicolo, ossia sull'aggiunta sulla sua superficie di ligandi o anticorpi specifici riconosciuti da recettori sovraespressi sulle cellule bersaglio ed assenti nelle cellule sane. Tramite un'endocitosi mediata da specifici recettori si può pertanto aumentare l'efficacia terapeutica e la specificità del farmaco veicolato. I ligandi utilizzati possono essere anticorpi, peptidi, fattori di crescita ed aptameri (Dhar et al., 2008); esempi sono la vitamina acido folico e l'EGF (Epidermal Growth Factor), i cui specifici recettori sono sovraespressi in diversi tipi di carcinomi (Hilgenbrink e Low, 2005; Khalil et al., 2003).

I nanoveicoli possono anche essere ingegnerizzati con ligandi specifici per recettori sovraespressi sulla superficie delle cellule endoteliali, permettendo così un indirizzamento attivo alla vascolarizzazione tumorale.

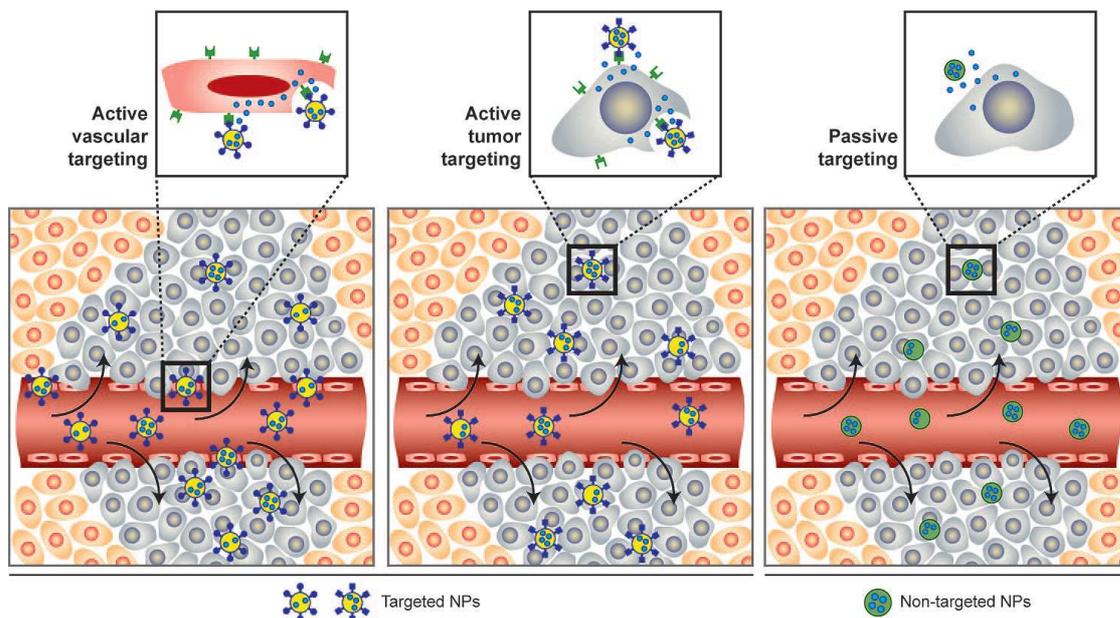


Fig. 5 Meccanismi di indirizzamento passivo ed attivo dei nanoveicoli nel tessuto tumorale (Farokhzad e Langer, 2009).

Recenti studi preclinici hanno dimostrato che nanoparticelle funzionalizzate possiedono attività antitumorale migliore rispetto a quelle non funzionalizzate (Farokhzad et al., 2006; Gu et al., 2008), soprattutto per tumori in fase precoce di sviluppo. Attualmente comunque solo poche nanoparticelle funzionalizzate sono in fase di sperimentazione clinica, come ad esempio le MCC-465, formulazione di immunoliposomi con la

doxorubicina incorporata (Matsumura et al., 2004), MBP-426, liposomi contenenti oxaliplatin (MedBiopharm, 2008), SGT-53, liposomi contenenti plasmidi codificanti per il soppressore tumorale p53 (SynerGene Therapeutics, 2008).

Un esempio di nanoparticelle multifunzionalizzate per l'imaging *in vivo* contemporaneamente alla veicolazione di farmaci è fornito dal lavoro di Jang et al. (2007), che hanno sviluppato nanosistemi contenenti l'agente chemioterapico doxorubicina, combinati con nanocristalli magnetici e con anticorpi. Un approccio simile è stato sfruttato per sviluppare nanoparticelle biocompatibili veicolanti specificamente docetaxel a tumori localizzati, facendo uso di aptameri che riconoscono antigeni di membrana prostata-specifici (Farokhzad et al., 2006).

### 2.2.2 Le nanostrutture

Le nanostrutture possono essere sintetizzate con polimeri organici (nanoparticelle organiche) e/o con elementi inorganici (nanoparticelle inorganiche). Quelle maggiormente utilizzate per il *drug delivery* sono i liposomi, le nanoparticelle e micelle polimeriche, i dendrimeri e le nanoparticelle ceramiche. Nanoparticelle magnetiche e metalliche, quantum dots e nanotubi di carbonio, oltre che per la veicolazione di farmaci, vengono soprattutto proposti per scopi diagnostici. Attualmente quasi tutti i nanosistemi per il *drug delivery* approvati dalla FDA (Food and Drug Administration) o in sperimentazione clinica sono quelli polimerici o liposomiali (Qiu e Bae, 2006).

I **liposomi**, primi nanosistemi studiati ed utilizzati per il *drug delivery*, sono vescicole sferiche delimitate da una membrana costituita da un doppio strato fosfolipidico, introdotte intorno al 1960 da Bangham (Bangham et al., 1965). Le loro dimensioni possono variare da 25 nm a 0.5  $\mu\text{m}$  di diametro a seconda del metodo di preparazione. I liposomi vengono classificati in base alle loro dimensioni e al numero di doppi strati fosfolipidici costituenti in multi-, oligo- o uni- lamellari. Per la loro natura anfifilica sono in grado di trasportare sia sostanze idrofiliche, nel loro spazio interno acquoso, che sostanze idrofobiche, intrappolate all'interno della membrana lipidica (Konan et al., 2002). Dopo somministrazione sistemica i liposomi convenzionali hanno un tempo di circolazione sanguigna limitato, soprattutto a causa della loro cattura ed eliminazione da parte dei macrofagi del sistema fagocitario mononucleare o sistema reticolo-endoteliale (RES) (Frank, 1993; Gabizon, 2001); per questo motivo i liposomi rivestiti con polimeri possono aumentare il tempo di circolazione da molti minuti fino a 3 giorni. I primi liposomi con lunga emivita nel circolo sanguigno, denominati "*stealth liposomes*" sono stati descritti nel 1987 (Allen e Chonn, 1987). La superficie dei liposomi può anche essere facilmente modificata con ligandi per aumentare la specificità di veicolazione (Torchilin, 2005) (Fig. 6). Varie formulazioni liposomiali di farmaci antitumorali sono state approvate per l'uso clinico e molte sono in stadio avanzato di studi clinici (Park et al., 2004). Ad esempio, sono stati approvati liposomi nudi (Myocet) e PEGilati (Doxil) per la veicolazione della doxorubicina e del cisplatino (Lipoplatin). Formulazioni

liposomiali di antracicline vengono utilizzate per il trattamento di tumori dell'ovario e del seno e del sarcoma di Kaposi in pazienti affetti da HIV. Di recente, una formulazione di liposomi PEGilati contenenti la mTHPC (Fospeg) è stata saggiata in un carcinoma squamocellulare felino, mostrando proprietà farmacocinetiche migliori rispetto alla mTHPC disciolta nella formulazione standard (Buchholz et al., 2005).

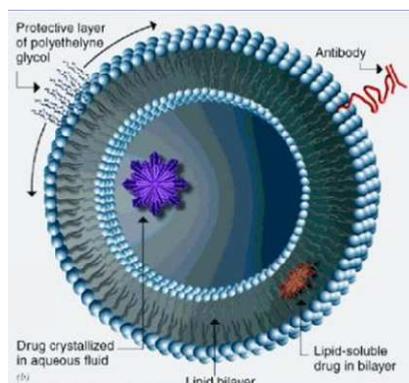


Fig. 6 Struttura schematica di un liposoma unilamellare.

Le **nanoparticelle polimeriche** sono particelle colloidali solide che possono essere preparate con polimeri naturali (eparina, destrano, collagene, chitosano) o polimeri sintetici (poli(etilene glicole), acido poliglutamico, acido polilattico). In base al metodo di sintesi possono essere distinte in nanocapsule, sistemi vescicolari nei quali un farmaco è confinato nella cavità circondata dalla membrana polimerica, e nanosfere, sistemi nei quali il farmaco è fisicamente ed uniformemente disperso nella matrice (Singh e Lillard, 2009) (Fig. 7). Le nanoparticelle polimeriche hanno ricevuto notevoli attenzioni per la loro stabilità, la biocompatibilità, la biodegradabilità e la facilità di funzionalizzazione (Tong e Cheng, 2007). Il farmaco può trovarsi incorporato fisicamente oppure legato chimicamente alla matrice della nanoparticella, ad esempio mediante un legame covalente polimero-farmaco. Tale coniugato polimero-farmaco deve essere molto stabile, altrimenti c'è il rischio che il farmaco venga rilasciato prima che la nanoparticella arrivi nel tumore. Sono stati sviluppati una serie di coniugati pH-sensibili, che sono stabili nella circolazione sanguigna a pH pari a 7, mentre si degradano, rilasciando il farmaco nel tumore dove il pH è tipicamente acido.



Fig. 7 Differenza strutturale tra nanocapsule e nanosfere.

Le **micelle polimeriche** sono composte da un *core* idrofobico, che serve a contenere il farmaco, ed un guscio (*shell*) idrofilico, costituito da catene polimeriche non

biodegradabili stabilizzanti la micella in ambiente acquoso (Fig. 8). Il *core* è formato da polimeri biodegradabili o solubili resi idrofobici per coniugazione con sostanze idrofobiche oppure da piccole catene idrofobiche, che possono essere attaccate ad un'estremità del polimero centrale (*Block Copolymer*) o distribuite casualmente nella struttura polimerica (*Random Copolymer*). Tali micelle sono più stabili termodinamicamente in soluzioni fisiologiche rispetto a micelle surfattanti; pertanto si dissociano meno facilmente *in vivo*. Un problema nel loro utilizzo rimane il possibile rilascio del farmaco da veicolare prima del raggiungimento del sito bersaglio (Jones e Leroux, 1999).

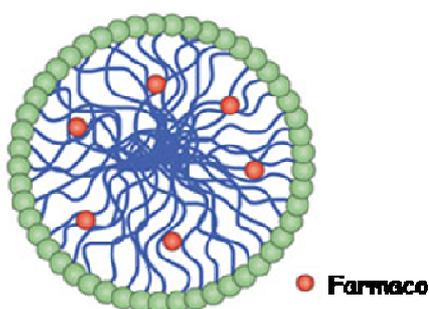


Fig. 8 Struttura di una micella (Orive et al., 2009).

I **dendrimeri** sono polimeri sintetici altamente ramificati, simmetrici e geometricamente ordinati, costituiti da un core centrale e numerosi gruppi terminali che ne determinano le particolari caratteristiche (Fig. 9). Essi sono molto importanti nelle applicazioni biologiche per il preciso controllo delle loro dimensioni e forma, per le proprietà fisiche non comuni e per la possibilità di funzionalizzazione. Ne esistono più di 50 tipi (Klajnert e Bryszewska, 2001).

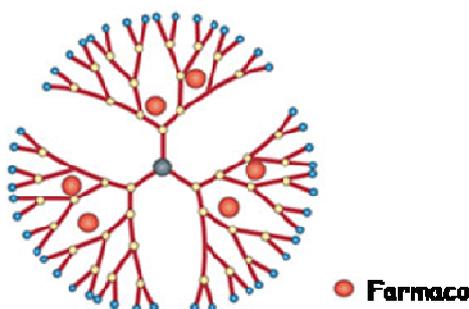


Fig. 9 Struttura di un dendrimero (Orive et al., 2009).

Le **nanoparticelle magnetiche e metalliche** in genere sono costituite da un *core* di materiale inorganico rivestito da polimeri, come il destrano. Le nanoparticelle paramagnetiche di ossido di ferro vengono utilizzate per l'*imaging* in combinazione con le tecniche di MRI (Magnetic Resonance Imaging). Sono già usate *in vivo* in modelli murini per diagnosticare metastasi di linfonodi in tumori prostatici e per visualizzare placche aterosclerotiche (Weissleder et al., 1990). Tali nanoparticelle possono essere trasportate al sito d'interesse applicando un campo magnetico esterno (Xu e Sun, 2007). E' stato anche dimostrato in studi *in vitro* che le nanoparticelle d'oro, stabilizzate con

un rivestimento di citrato di sodio, sono buoni veicolanti di farmaci antitumorali (Cheng et al., 2008). Nonostante sembri che l'oro sia inerte negli ambienti fisiologici, la tossicità a lungo termine delle particelle d'oro rimane una questione irrisolta. Le nanostrutture d'oro sono anche promettenti come potenziali agenti per la terapia fototermica, che si basa sulla distruzione selettiva del tumore indotta da un aumento locale della temperatura dopo irradiazione con laser che emette nell'infrarosso.

I **nanotubi di carbonio** sono formati da fogli di grafite arrotolati a formare una struttura cilindrica. Essi possono essere costituiti da un singolo foglio avvolto su sé stesso del diametro variabile da 0.7 a 1.5 nm (SWCNT, Single Walled Carbon Nanotubes) o da più fogli concentrici coassiali del diametro da 2 a 50 nm (MWCNT, Multi Walled Carbon Nanotubes) (Pagona e Tagmatarchis, 2006) (Fig. 10). Essi presentano ottime proprietà meccaniche ed elettriche e sono efficienti conduttori di calore; per questo vengono utilizzati nei campi dell'elettronica, come anche in medicina per la veicolazione di farmaci e come biosensori (Polizu et al., 2006).

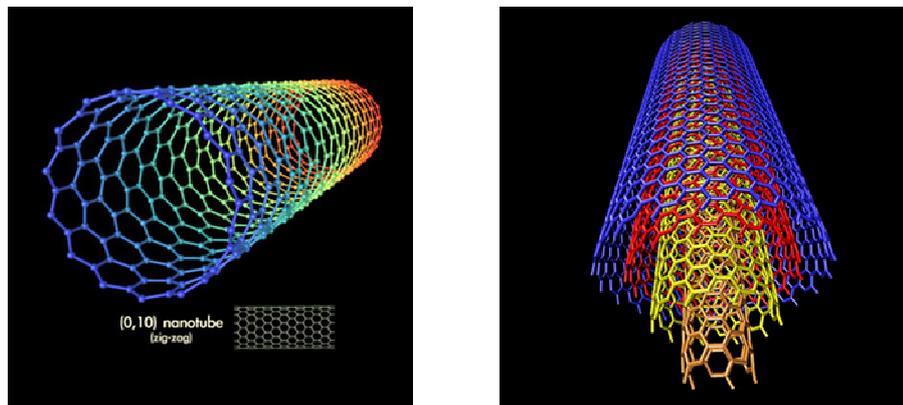


Fig. 10 Struttura di nanotubi di carbonio a parete singola (SWCNT, a sinistra) e multipla (MWCNT, a destra).

I **quantum dots** sono nanocristalli semiconduttori colloidali, in genere costituiti da seleniuro di cadmio, usati prevalentemente in campo diagnostico. Possiedono dimensioni molto ridotte (2-10 nm) e sono in grado di emettere fluorescenza quasi monocromatica intensa e modulabile (Fig. 11) se colpiti dalla luce. Sono resistenti al *photobleaching* e hanno un'eccezionale resistenza alla degradazione chimica. Sono ottimi agenti di contrasto per l'*imaging* e fluorofori ad elevata sensibilità per saggi biologici (Medintz et al., 2005).

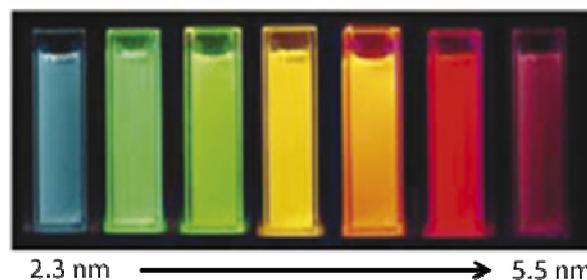


Fig. 11 Modulabilità dell'emissione di fluorescenza dei quantum dots in relazione alla dimensione (Sanvincens e Marco, 2008).

Le **nanoparticelle ceramiche** sono strutture inorganiche porose solitamente di silice, alluminio o titanio (Fig. 12). Presentano una serie di vantaggi rispetto alle particelle polimeriche organiche tra cui la semplice sintesi, l'estrema stabilità ed il poter essere preparate con dimensione, forma e porosità desiderate (Roy et al., 2003). Queste nanoparticelle proteggono efficacemente il farmaco incorporato dalla denaturazione indotta dal pH e dalla temperatura. La loro superficie può essere facilmente modificata con diversi gruppi funzionali ed anticorpi monoclonali o altri ligandi per indirizzarle al sito desiderato.

Le nanoparticelle di silice e le nanoparticelle di silice organicamente modificata ORMOSIL (ORganically MODified SILica), prodotte per condensazione di silicati e tetralcossilani, hanno straordinarie proprietà comprendenti la facilità di sintesi, la trasparenza, il costo di produzione relativamente basso, l'elevata idrofilicità e la facilità di modificazione superficiale. Esse vengono ampiamente studiate per il loro ampio spettro di applicazione in ambito biomedico e biotecnologico, tra cui l'utilizzo come biosensori per il DNA ed il pH endocellulare, come formulazioni iniettabili per la veicolazione di geni e farmaci, e, in ambito industriale, come additivi per polimeri, rivestimenti, detergenti, vernici per la loro capacità di migliorare le proprietà di resistenza, brillantezza ed adesione. Sono presenti anche in alcuni prodotti cosmetici già disponibili in commercio ed in alcuni prodotti alimentari (Lin et al., 2006). Analizzando la biodistribuzione e l'escrezione urinaria in topi *in vivo* di varie tipologie di nanoparticelle di silice modificate sulla superficie, si è notato come il tempo di eliminazione ed il conseguente deposito sugli organi dipendano dal tipo di modificazione. Ad esempio, rispetto a nanoparticelle modificate con gruppi OH e COOH, nanoparticelle rivestite con PEG hanno un tempo di circolazione nel sangue più lungo ed un'escrezione inferiore (He et al., 2008).

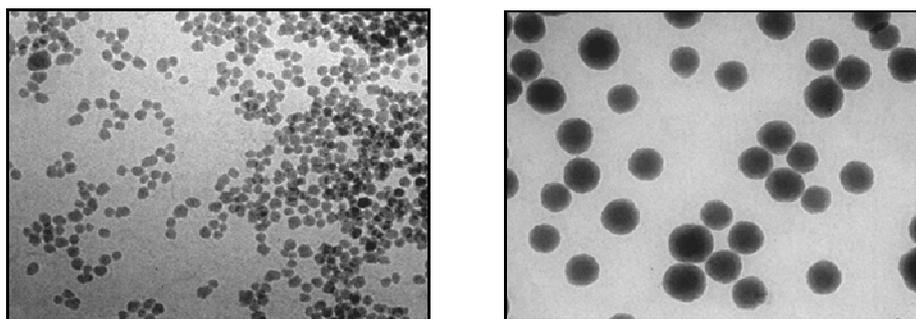


Fig. 12 Immagini al microscopio elettronico a trasmissione di sospensioni di nanoparticelle di silice del diametro di 20 (sinistra) e 70 (destra) nm.

In questo lavoro di Dottorato di Ricerca è stato condotto uno studio con cellule *in vitro* per valutare le potenzialità e le eventuali limitazioni e tossicità di nanoparticelle ORMOSIL, nude e PEGilate, e di formulazioni liposomiali, PEGilate con catene di diversa lunghezza e densità, per la veicolazione di un PS, la mTHPC, per la terapia fotodinamica. Per la veicolazione di un PS si possono utilizzare due diverse strategie:

nanoparticelle biodegradabili, costituite da polimeri, dalle quali il PS può essere rilasciato per produrre ROS dopo irradiazione, oppure nanoparticelle non biodegradabili, dalle quali il PS non deve essere necessariamente rilasciato in quanto è sufficiente che l'ossigeno di singoletto ed altre specie citotossiche possano diffondere liberamente fuori dal nanoveicolo attraverso la matrice porosa per produrre un effetto terapeutico (Bechet et al., 2008).

In letteratura sono già presenti alcuni studi *in vitro* sull'utilizzo di nanoparticelle PLGA (poly(lactic-co-glycolic) acid copolymer) biodegradabili per la veicolazione di agenti fotosensibilizzanti, tra cui ad esempio PLGA caricate con la meso-tetra(p-idrossifenil)porfirina (p-THPP) (Konan et al., 2003), come anche studi su nanoparticelle ORMOSIL per la veicolazione del blu di metilene (Tang et al., 2005) e di un pirofeoforbide (HPPD) (Roy et al., 2003). Un altro recente esempio è quello proposto dal gruppo di Kopelman che ha studiato la mTHPC incorporata in particelle idrogel di 2-3 nm, dimostrando che l'attività fotodinamica ne rimane inalterata (Gao et al., 2007). E' stato dimostrato che certi agenti fotosensibilizzanti, se incorporati in nanoparticelle di silice, possiedono una maggiore efficienza di produzione di ossigeno di singoletto (Yan e Kopelman, 2003).

### 2.3 LA NANOTOSSICOLOGIA

Le proprietà innovative uniche che rendono le nanostrutture così interessanti per l'industria e la biomedicina, come la loro piccola dimensione, l'estesa area superficiale, la composizione chimica, la solubilità e la geometria, possono contribuire al loro potenziale profilo tossicologico verso i sistemi biologici, l'organismo umano (consumatori, pazienti e lavoratori) e l'ambiente (Medina et al., 2007). Molto importante quindi è lo studio e l'analisi dell'eventuale pericolosità dei nanoveicoli per l'organismo umano, valutandone il rapporto rischi/benefici.

Dato che per le nanostrutture non sono più applicabili i convenzionali parametri della tossicologia tradizionale, è sorta una nuova disciplina, denominata **nanotossicologia**, che si occupa dello studio della sicurezza delle nanotecnologie ed ha lo scopo di determinare i rischi associati all'esposizione a nanomateriali, esplorare le vie di entrata delle nanostrutture nell'organismo umano ed indagare i meccanismi molecolari relativi alla tossicità.

Il corpo umano può venire a contatto con i nanomateriali di origine sintetica soprattutto mediante tre vie principali: l'inalazione attraverso le vie respiratorie, l'ingestione attraverso il tratto gastrointestinale e l'assorbimento attraverso la via cutanea (Oberdöster et al., 2005). Inoltre, nel caso di nanostrutture utilizzate per il *drug delivery*, un'altra via coinvolta è l'iniezione diretta nel circolo sanguigno. Le nanostrutture, una volta inalate, ingerite o somministrate topicamente possono giungere fino alla circolazione sanguigna ed essere quindi trasportate ed accumulate a livello di vari organi. Studi condotti *in vivo* su animali hanno messo in rilievo che le nanoparticelle

possono localizzarsi a livello della circolazione sanguigna e del sistema nervoso centrale (SNC), inducendo reazioni infiammatorie a livello polmonare e problemi a livello cardiocircolatorio (Dailey et al., 2006), oltre ad accumularsi in vari organi quali fegato, milza, linfonodi e midollo osseo.

In previsione delle potenziali applicazioni *in vivo* di nanoparticelle, sarà molto importante chiarirne le farmacocinetiche, il tempo di emivita nel circolo sanguigno, l'escrezione, la biodistribuzione e l'accumulo nei vari organi dopo la loro somministrazione sistemica. Una volta che le nanoparticelle hanno espletato la loro funzione nel sito bersaglio, è desiderabile che esse vengano escluse o degradate senza alcun effetto tossico. Un approccio per favorire ciò è che le nanoparticelle vengano preparate con materiali polimerici biodegradabili già in uso in biomedicina (Choi et al., 2007) o di creare nuovi nanosistemi con polimeri biodegradabili. Anche se molti gruppi hanno iniziato a studiare l'interazione delle nanoparticelle di silice con biomolecole e cellule e a valutarne la potenziale tossicità, non è stato ancora chiaramente definito se esse siano o non siano potenzialmente pericolose (Schvedova et al., 2003; Kipen e Laskin, 2005; Sanvicens e Marco, 2008). I risultati ottenuti sono ancora controversi e non definitivi, poiché mentre alcuni autori suggeriscono che le nanoparticelle agiscono a livello cellulare e subcellulare causando evidente citotossicità (McAteer et al., 2007; Akerman et al., 2002), altri affermano che esse sono materiali biologicamente inerti (Xue et al., 2006). Le nanoparticelle di silice potrebbero determinare degli effetti biologici *in vivo* leggermente differenti rispetto alle analoghe particelle di dimensioni micrometriche. Studi precedenti avevano evidenziato che l'inalazione di microparticelle di silice da parte dell'uomo provoca una pneumoconiosi determinante fibrosi polmonare, detta silicosi (Castranova et al., 2000), e che l'inalazione cronica di silice cristallina in ratti induce fibrosi polmonare e cancro (Saffiotti, 1992). Di recente alcuni gruppi hanno riportato che nanoparticelle di silice non sono tossiche alle cellule a basse dosi (Chang et al., 2007; Jin et al., 2007; He et al., 2006). Altri, viceversa, hanno riportato che l'esposizione a nanoparticelle di silice di 15 e 46 nm causa una tossicità dose-dipendente, strettamente correlata allo stress ossidativo, in cellule derivanti da un carcinoma broncoalveolare *in vitro* (Lin et al., 2006). Svitati studi riportano che c'è una relazione inversa tra dimensione di quantum dots ed i loro effetti tossici, in quanto al diminuire della dimensione diventano più citotossici (Zhang et al., 2007). Nanomateriali di carbonio con diversa geometria manifestano una diversa citotossicità *in vitro*; i nanotubi SWCNT sono i più tossici, mentre i fullereni sono i meno tossici (Jia et al., 2005). E' stato scoperto che nanotubi di carbonio SWCNT possono indurre stress ossidativo e risposta pro-infiammatoria in cheratinociti umani *in vitro* (Schvedova et al., 2003) e che sono in grado di causare aggregazione piastrinica *in vitro* (Radomski et al., 2005). Nanoparticelle di diossido di titanio e nanotubi di carbonio mostrano effetti pro-infiammatori su cellule epiteliali *in vitro* (Monteiller et al., 2007). In cellule epiteliali bronchiali di ratto esposte a nanoparticelle di silice è stata riscontrata necrosi ed un'acuta infiammazione polmonare (Kaewamatawong et al., 2006).

In letteratura si trovano numerosi studi sperimentali *in vitro* relativi ai meccanismi di internalizzazione cellulare delle diverse nanostrutture, mentre sono ancora scarsi gli studi *in vivo*. Quello che emerge in generale è che non esiste un meccanismo di internalizzazione specifico per le nanoparticelle (Unfried et al., 2007), bensì esso risulta dipendere da svariati fattori, quali le proprietà chimico-fisiche del nanosistema, dalle condizioni sperimentali adottate e dalle caratteristiche della linea cellulare considerata. La cellula talvolta può usare anche differenti meccanismi di internalizzazione contemporaneamente; ad esempio Lesniak et al. (1995) hanno dimostrato che sistemi dendrimerici d'argento possono essere accumulati sia mediante fagocitosi che diffusione semplice.

Analizzando le basi molecolari della tossicità si è visto che, in seguito all'internalizzazione cellulare di nanoparticelle, si innescano meccanismi di produzione di specie altamente reattive dell'ossigeno non ancora completamente chiariti, che giocano un ruolo chiave nel determinare la citotossicità (Nel et al., 2006). Nel caso dell'utilizzo di nanosistemi non biodegradabili per il *drug delivery* sarà pertanto estremamente importante valutare l'eventuale tossicità del nanoveicolo "vuoto", ossia non caricato col farmaco (Jong e Borm, 2008).

## **2.4 LINEE CELLULARI SELEZIONATE**

La linea cellulare utilizzata nella prima parte di questo lavoro di Dottorato di Ricerca è la linea cellulare KYSE 510, derivante da un carcinoma squamocellulare esofageo umano. Essa presenta alterazioni genetiche associate allo sviluppo di questo tipo di tumore, quali mutazioni del gene p53 e amplificazione dei geni c-myc, hst-1 e ciclina D1. La proteina codificata dal gene p53 gioca un ruolo importante nel controllo della crescita cellulare, nella riparazione del DNA danneggiato e nell'apoptosi (Hollstein et al., 1991). Mutazioni del gene p53 possono determinare un'espansione clonale delle cellule neoplastiche. L'amplificazione del gene c-myc svolge un ruolo critico nella normale proliferazione cellulare e, se sovraespresso, può causare proliferazione incontrollata. Vi è inoltre una mutazione nella via chinasi-ciclina dipendente (Cdk)-Rb che controlla il passaggio dalla fase G<sub>1</sub> alla fase S del ciclo cellulare, portando ad iperproliferazione cellulare (Kuwano et al., 2005). L'attivazione della Rb o proteina del retinoblastoma può essere causata da una sovraespressione della ciclina D1 che complessa con alcune Cdk.

Il tumore all'esofago, una delle neoplasie più letali, solitamente viene diagnosticato ad uno stadio avanzato incurabile vista la sua non evidente sintomatologia (Marcon, 1994). Le terapie più utilizzate per questo tipo di tumore è la rimozione chirurgica del tratto di organo interessato da neoplasia, associata a volte con radioterapia e/o chemioterapia (Radu et al., 2000). E' stata selezionata tale linea cellulare poiché, quando la neoplasia viene diagnosticata ad uno stadio precoce, la PDT può essere un'alternativa a trattamenti più aggressivi, può essere ripetuta più volte senza provocare effetti

collaterali significativi e può essere effettuata facilmente vista l'accessibilità all'irradiazione di tale sito; inoltre può essere utilizzata come trattamento palliativo in pazienti con patologia metastatica.

Nella seconda parte del lavoro invece sono state utilizzate due diverse linee cellulari: le A549, derivanti da un carcinoma polmonare, ed i fibroblasti polmonari normali CCD34-Lu. E' stata selezionata proprio la linea cellulare A549 in quanto, in previsione di futuri esperimenti con nanoveicoli funzionalizzati superficialmente con l'acido folico, essa risulta negativa per la sovraespressione del recettore del folato. I fibroblasti normali sono stati utilizzati per poter creare un confronto di risultati fra cellule tumorali e non, soprattutto per quanto concerne lo studio della potenziale citotossicità dei nanoveicoli "vuoti", ossia non caricati con l'agente fotosensibilizzante.



3

*SCOPO*

Lo scopo di questo progetto di Dottorato di Ricerca è stato di valutare gli effetti biologici indotti *in vitro* da nanosistemi veicolanti un agente fotosensibilizzante (PS), utilizzato nella terapia fotodinamica (PDT), e di verificare se l'incorporazione del PS in sistemi di dimensioni nanometriche ne incrementa l'efficacia terapeutica. Recentemente molta attenzione è stata rivolta al miglioramento della selettività e specificità di accumulo dei PS nel tumore, in modo tale che la PDT possa risultare più efficace con basse dosi di farmaco e minori effetti collaterali nei tessuti sani circostanti. Le emergenti nanotecnologie rappresentano un approccio promettente per il raggiungimento di questo obiettivo; infatti le nanostrutture presentano potenziali applicazioni nella veicolazione di farmaci e/o geni, oltre che nel bioimaging e nella diagnostica. L'utilizzo di nanostrutture idrofiliche per il *drug delivery*, inoltre, potrebbe migliorare la somministrazione *in vivo* di molti PS idrofobici tramite l'incorporazione nel loro ambiente idrofobico interno.

Nel corso di questo lavoro sono state studiate, in primo luogo, nanoparticelle idrofiliche di silice organicamente modificata (ORMOSIL NP, ORganically MODified SILica NanoParticles) per veicolare la *meta*-tetra(idrossifenil)clorina (mTHPC), un PS idrofobico di seconda generazione caratterizzato da un'elevata attività antitumorale. Sono stati condotti studi *in vitro* sulla linea cellulare KYSE 510, derivante da un carcinoma squamocellulare esofageo umano, per valutare gli effetti citotossici indotti, al buio e dopo irradiazione con luce rossa, da ORMOSIL NP nude, vuote o caricate con la mTHPC, per determinare l'accumulo e la localizzazione intracellulare della mTHPC, rispetto a quella veicolata nel solvente standard (etanolo/PEG 400/acqua; 20:30:50, v/v/v). Una tappa successiva ha riguardato il rivestimento superficiale delle ORMOSIL NP con uno strato di catene di poli(etilene glicole) (PEG), allo scopo di evitare l'adsorbimento di proteine sulla superficie e l'eventuale fuoriuscita della mTHPC dalle NP, di aumentare il tempo di circolazione delle NP nei vasi sanguigni e di evitarne la cattura da parte dei macrofagi del sistema reticolo-endoteliale. Un ulteriore obiettivo è stato la preparazione di ORMOSIL NP PEGilate con la mTHPC legata covalentemente alla matrice silanica per eliminare completamente la possibilità di fuoriuscita del PS dal nanosistema, precedentemente all'internalizzazione nel sito di interesse. La citotossicità al buio, l'accumulo e la localizzazione subcellulare di NP PEGilate, vuote e caricate fisicamente o covalentemente con la mTHPC, sono state valutate *in vitro* nelle cellule umane di carcinoma polmonare A549 e nei fibroblasti polmonari normali umani CCD-34Lu, in modo da poter effettuare dei confronti tra cellule neoplastiche e non. La linea A549 è stata scelta poiché, in previsione di futuri esperimenti con nanoveicoli funzionalizzati superficialmente con l'acido folico come ligando per l'indirizzamento selettivo alle cellule tumorali, essa non sovraesprime il recettore del folato, a differenza delle cellule KB che saranno utilizzate successivamente. La citotossicità delle ORMOSIL NP nude e PEGilate vuote, non irradiate o esposte alla luce, è stata determinata per saggiare la tossicità del materiale, dato che attualmente sono ancora scarse le informazioni sulla sua biocompatibilità, come anche per controllare che gli

effetti osservati dopo il trattamento fossero dovuti esclusivamente al PS veicolato. Oltre alle ORMOSIL NP sono state prese in analisi anche varie formulazioni liposomiali unilamellari PEGilate (Fospeg) contenenti la mTHPC, diverse tra loro per densità e lunghezza delle catene di PEG, con lo scopo di valutarne gli effetti biologici *in vitro* in termini di tossicità, efficienza di fotoinattivazione, internalizzazione ed accumulo intracellulare, effettuando dei confronti tra le diverse formulazioni, e tra queste e la mTHPC sciolta nel solvente standard.



**4**

***MATERIALI E METODI***

## 4.1 MATERIALI

mTHPC (*meta*-tetra(idrossifenil)clorina, Foscan<sup>®</sup>) e Fospeg (formulazioni liposomiali PEGilate contenenti mTHPC): fornite dalla Biolitec AG (Jena, Germania).

PBS (Phosphate Buffered Saline): soluzione acquosa di sali inorganici quali NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O.

PBS con Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>: PBS con aggiunta di CaCl<sub>2</sub> e MgCl<sub>2</sub>.

Versene: soluzione costituita da PBS contenente lo 0.2% di EDTA (acido etilendiammonio-tetracetico).

FBS (Foetal Bovine Serum): prodotto commerciale fornito dalla Gibco (Invitrogen, Milano, Italia).

RPMI 1640 1X (Roswell Park Memorial Institute 1640): terreno per colture cellulari in forma liquida, fornito dalla Gibco. E' costituito da sali inorganici, vitamine, aminoacidi ed altre sostanze, quali D-glucosio, glutatione ridotto e rosso fenolo, ed è addizionato con GlutaMAX<sup>®</sup> 0.2 M, che è il dipeptide L-Alanil-L-Glutammina precursore della L-Glutammina.

F-12K 1X (Nutrient Mixture Kaighn's modification): terreno per colture cellulari in forma liquida contenente L-Glutammina, fornito dalla Gibco.

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium): terreno liquido per colture cellulari contenente GlutaMAX<sup>®</sup> e 4.5 g/l di glucosio, fornito dalla Gibco.

Trypsine: tripsina liquida allo 0.25% con EDTA 1 mM, tripsina liquida allo 0.05% con EDTA 0.53 mM, tripsina allo 0.25%; fornite dalla Gibco.

CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Proliferation Assay: Kit per test 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS), prodotto commerciale fornito dalla ditta Promega utilizzato per valutare la vitalità cellulare.

ADPA (acido disodico 9,10-antracenedipropionico): sonda utilizzata per valutare la produzione di ossigeno di singoletto, fornita dalla Molecular Probes (Invitrogen).

Image-iT<sup>TM</sup> LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection Kit: Kit fornito dalla Molecular Probes, utilizzato per valutare la produzione cellulare di ROS.

R123 (Rodamina 123), NBD C<sub>6</sub>-ceramide (6-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino esanoil]sfiningosina), LysoTracker Green DND-26 e ER-Tracker Green (glibenclamide BODIPY<sup>®</sup> FL): sonde per microscopia di fluorescenza prodotte dalla Molecular Probes.

Trypan blue: colorante ad esclusione vitale in soluzione allo 0.4%, fornito dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Penicillina G, Streptomicina, AOT (dioctil-sodiosulfosuccinato), n-butanolo, VTES (viniltrietossisilano), APTES (3-aminopropiltrirossisilano), IR775 cloride (2-[2-[2-cloro-3-[2-(1,3-diidro-1,3,3-trimetil-2H-indol-2-ilidene)-etilidene]-1-cicloesene-1-il]-etenil]-1,3,3-trimetil-3H-indolio cloride), HEPES (acido 4-(2-idrossietil)-1-piperazinil-etansolfonico), Triton X-100: forniti dalla ditta Sigma-Aldrich.

SDS (sodio dodecil solfato): soluzione acquosa al 2% utilizzata per la lisi cellulare.

Kit per il saggio BCA: kit fornito dalla ditta Pierce (Rockford, IL) e costituito da un reagente A (acido bicinconinico, carbonato di sodio, bicarbonato di sodio, tartrato di sodio in NaOH 0.2 M) e da un reagente B (solfato di rame al 4%). Usato per determinare la concentrazione di proteine.

Tioridazina cloridrato: farmaco appartenente alla famiglia delle fenotiazine, fornito dalla Sandoz Pharma Ltd (Basilea, Svizzera); lo stock è sciolto in etanolo assoluto.

Acqua milliQ: preparata a partire da acqua deionizzata ( $R > 18 \text{ M}\Omega$ ) filtrata con sistema di purificazione Milli-Q della Millipore.

Materiale plastico: le plastiche utilizzate per le colture cellulari sono prodotti Falcon<sup>®</sup>.

## 4.2 mTHPC

La soluzione di mTHPC utilizzata in questo lavoro sperimentale è stata preparata sciogliendo la polvere nel solvente standard, ossia in una soluzione costituita da etanolo assoluto, poli(etilene glicole) (PEG 400) ed acqua milliQ (20:30:50, v/v/v). La concentrazione della mTHPC in questa soluzione stock è stata controllata misurando lo spettro di assorbimento di una piccola aliquota diluita in un eccesso di etanolo assoluto ed utilizzando i valori dei coefficienti di estinzione molare a 420 e 650 nm ( $\epsilon_{420 \text{ nm}} = 199700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;  $\epsilon_{650 \text{ nm}} = 43252 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

## 4.3 FOSPEG

Nel corso di questo lavoro sono state utilizzate varie formulazioni liposomiali PEGilate (Fospeg) contenenti la mTHPC, tra loro diverse per densità e lunghezza delle catene di PEG: Fospeg 2 mol%-2000, 8 mol%-750, 8 mol%-2000, 8 mol%-5000 (Fig. 13). Sono state preparate nei laboratori della ditta Biolitec, mediante il metodo convenzionale del film lipidico seguito da estrusione. Una soluzione di mTHPC e fosfolipidi DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina), DPPG (dipalmitoilfosfatidilglicerolo) e mPEG-DSPE (N-(carbonil-metossipolietilenglicole)-1,2-distearoilfosfatidiletanolamina) in cloroformio è stata fatta evaporare. Il film lipidico risultante è stato reidratato aggiungendo un tampone di istidina 10 mM con 5% (v/v) di glucosio, mantenendolo in rotazione a 50°C. La miscela è stata quindi estrusa attraverso membrane di policarbonato con pori di dimensioni comprese tra 100 e 400 nm utilizzando un EmulsiFlex-C5<sup>®</sup> o un LipoFast-extruder<sup>®</sup> (entrambi Avestin, Canada). La soluzione colloidale risultante è stata

caratterizzata mediante spettroscopia a correlazione di fotoni (Nano-Zetasizer, Malvern), calorimetria differenziale a scansione (Pyris 1, Perkin Elmer) e microscopia elettronica cryo a trasmissione (Philips CM 120).

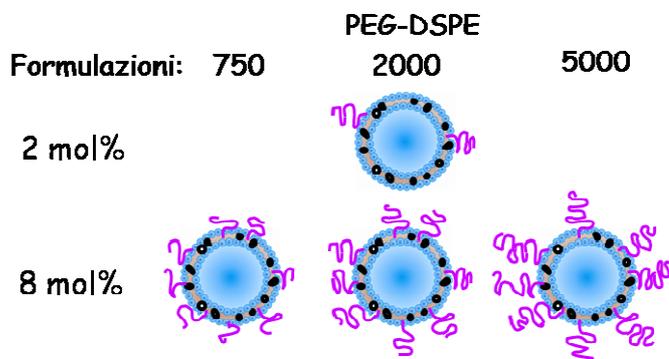


Fig. 13 Rappresentazione schematica delle diverse tipologie di Fospeg utilizzate.

In alcuni esperimenti è stata utilizzata una formulazione di liposomi PEGilati 8 mol%-2000 non contenenti la mTHPC, bensì marcati con una Rodamina-DPPE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanamina-N-(lissamina rodamina B sulfonil) (sale di ammonio).

#### 4.4 NANOPARTICELLE ORMOSIL

Le nanoparticelle ORMOSIL (ORganically MODified SILica) utilizzate in questo progetto di Dottorato di Ricerca sono state sintetizzate e caratterizzate presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova.

In generale, sono state sintetizzate per polimerizzazione di un precursore VTES (viniltrietossisilano) all'interno di micelle di tensioattivo, utilizzando come co-tensioattivo l'*n*-butanolo e come catalizzatore basico l' $\text{NH}_3$ , seguendo il metodo proposto da Roy et al. (2003).

Per quanto riguarda la preparazione di **nanoparticelle ORMOSIL nude**, ossia non PEGilate superficialmente, è stato seguito il seguente protocollo sperimentale (Fig. 14). All'interno di un reattore incamiciato termostato (20°C), contenente una soluzione di AOT (dioctil-sodio-sulfosuccinato, 0.44 g, 1.0 mmol) ed *n*-butanolo (0.8 ml, 7.6 mmol) in acqua (20 ml), sono stati aggiunti 100  $\mu\text{l}$  di una soluzione 8.8 mM di mTHPC in DMSO (dimetilsolfossido) per sintetizzare nanoparticelle con la mTHPC incorporata, oppure 200  $\mu\text{l}$  di una soluzione 8.8 mM di IR775-Sil in DMSO per sintetizzare nanoparticelle contenenti una cianina legata covalentemente alla matrice silanica, oppure entrambe queste quantità in modo da ottenere nanoparticelle con incorporate sia la mTHPC che la cianina. Successivamente sono stati addizionati anche 200  $\mu\text{l}$  di VTES (0.96 mmol) e la miscela di reazione è stata mantenuta sotto vigorosa agitazione per circa 30 minuti fino a limpidezza. La polimerizzazione è stata innescata per aggiunta di APTES (40  $\mu\text{l}$ , 0.17 mmol) o di una soluzione acquosa di ammoniaca (28%, 10  $\mu\text{l}$ , 0.12

mmol), che fungono solo da catalizzatori. La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione per 16 ore a 20°C; è stata poi filtrata attraverso una membrana PVDF avente pori di 0.45 µm, trasferita in una cella da ultrafiltrazione Amicon da 75 ml (Millipore) munita di una membrana di cellulosa rigenerata di 10 kDa (cut-off di circa 3 nm) e ultrafiltrata con acqua milliQ sotto azoto ad una pressione di 4 bar per eliminare dalla soluzione l'AOT, l'*n*-butanolo, i monomeri che non hanno reagito e le molecole di mTHPC non incorporate nelle nanoparticelle. La cella utilizzata per l'ultrafiltrazione è munita di un serbatoio da 1 litro per mantenere costante il volume all'interno della cella ed impedire un'eventuale andata a secco del campione. L'ultrafiltrazione è stata fatta proseguire fino al raggiungimento della concentrazione di AOT non tossica per le colture cellulari da utilizzarsi negli esperimenti *in vitro*, determinata mediante esperimenti di vitalità cellulare. La soluzione finale di nanoparticelle è stata filtrata attraverso una membrana PVDF con pori di 0.22 µm. Infine la sospensione di nanoparticelle è stata portata ad un pH compreso tra 7.2 e 7.3, per permetterne il successivo utilizzo negli esperimenti *in vitro* nelle colture cellulari, conservata a temperatura ambiente ed utilizzata entro breve tempo in quanto è stata riscontrata la tendenza delle nanoparticelle ad aggregare.

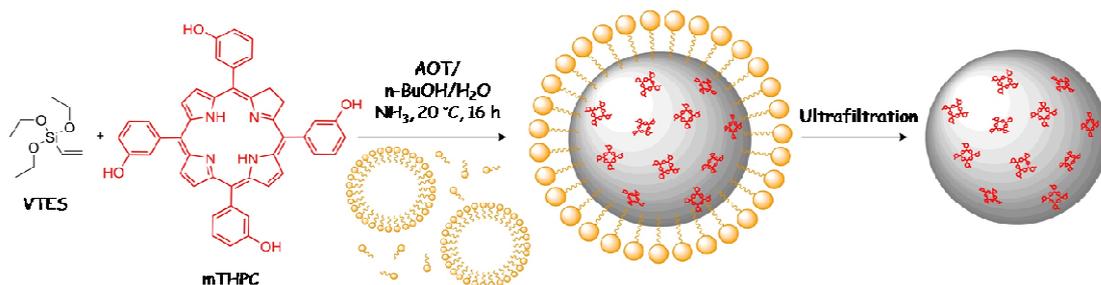


Fig. 14 Schema semplificato di sintesi di nanoparticelle ORMOSIL nude caricate non covalentemente con la mTHPC.

Le **nanoparticelle ORMOSIL PEGilate**, cioè rivestite con uno strato di poli(etilene glicole) (PEG 2000), sono state preparate secondo la procedura appena descritta per le nanoparticelle nude, aggiungendo però un trimetossisililderivato del PEG 2000 alla miscela di reazione ed utilizzando come tensioattivo il Brij35 (Fig. 15).

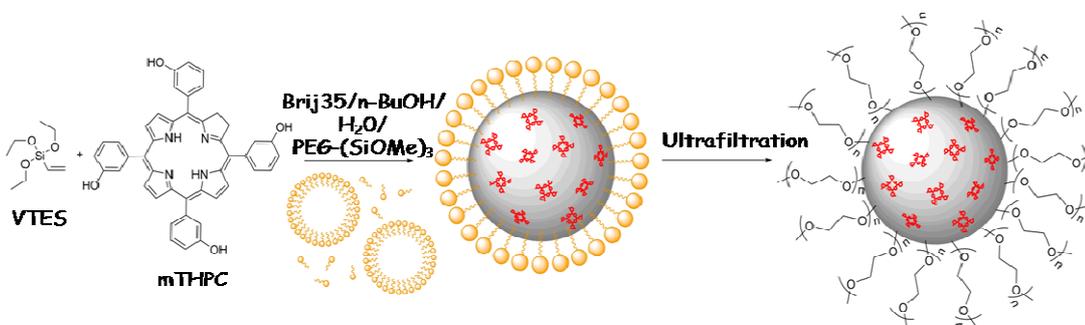


Fig. 15 Schema semplificato di sintesi di nanoparticelle ORMOSIL PEGilate caricate non covalentemente con la mTHPC.

Le **nanoparticelle ORMOSIL, nude o PEGilate, ma vuote**, sono state sintetizzate secondo la procedura sopra descritta per quelle caricate col fotosensibilizzante e/o con la cianina, e utilizzando 200  $\mu\text{l}$  di DMSO puro al posto del volume della soluzione di mTHPC e/o IR775-Sil in DMSO.

Le **nanoparticelle ORMOSIL** sono state preparate anche legando **covalentemente la mTHPC** alla loro matrice silanica. Sono state sintetizzate seguendo la medesima procedura descritta per quelle con la mTHPC incorporata non covalentemente, utilizzando 5-(meta-(3-trietossisililpropil)carbamoilossifenil)-10,15,20-tris(meta-idrossifenil)clorina, ossia un derivato mTHPC-Silano al posto della sola mTHPC (Fig. 16).

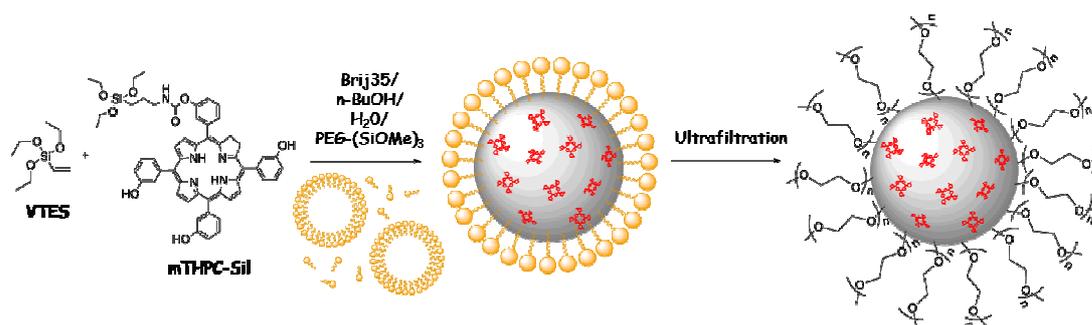


Fig. 16 Schema semplificato di sintesi di nanoparticelle ORMOSIL PEGilate caricate covalentemente con la mTHPC.

Una volta sintetizzate, le soluzioni di nanoparticelle sono state accuratamente caratterizzate. La concentrazione di AOT o Brij35 residua nei campioni di nanoparticelle ultrafiltrate è stata determinata misurando la tensione superficiale della soluzione di nanoparticelle con tensiometro Kruss K6 ed utilizzando una retta di calibrazione precedentemente allestita col medesimo strumento. Un'aliquota della soluzione di nanoparticelle risultante dalla sintesi è stata tirata a secco e pesata per determinarne la concentrazione in peso (mg di nanoparticelle/ml di soluzione), mentre la quantità di sostanza incorporata nelle nanoparticelle è stata determinata registrandone gli spettri di assorbimento UV-Vis con spettrofotometro Perkin Elmer Lambda 45, fornito di cella termostata, ed utilizzando i coefficienti di estinzione molare di 165000  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 420 nm e 45800  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 627 nm, rispettivamente per la mTHPC e la cianina IR775-Sil. Sono stati registrati gli spettri di fluorescenza della sostanza incorporata nelle nanoparticelle con spettrofluorimetro Perkin Elmer LS-55 munito di cella termostata. E' stata effettuata un'analisi dimensionale delle nanoparticelle tramite microscopia elettronica a trasmissione (TEM) con microscopio Fei Tecnai 12 (100 KeV) e programma *Image J*, e mediante determinazione del diametro idrodinamico medio con misurazioni di Dynamic Light Scattering (DLS) con strumento Particle Sizing Systems Nicomp Model 370 equipaggiato con cella termostata e laser a 488 nm (Spectra Physics Series 2016 Ar).

La stabilità della preparazione di nanoparticelle è stata controllata tramite la registrazione di un ulteriore spettro di assorbimento prima dell'uso con le cellule *in vitro*. La concentrazione della mTHPC incorporata nelle nanoparticelle è stata calcolata

utilizzando i valori dei coefficienti di estinzione molare ( $\epsilon$ ) calcolati sciogliendo la mTHPC in toluene ( $\epsilon_{420\text{ nm}} = 165977\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ;  $\epsilon_{650\text{ nm}} = 38315\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ). Un'eventuale aggregazione delle nanoparticelle risulta in una diminuzione della concentrazione del fotosensibilizzante e in un allargamento della banda a 420 nm.

#### 4.5 LINEE CELLULARI

La linea cellulare **KYSE 510**, derivante da un carcinoma squamocellulare esofageo umano di una donna giapponese di 67 anni, è stata fornita dalla DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH/Braunschweig, Germania) e presenta una mutazione nel gene p53 ed amplificazione dei geni c-myc, hst-1 e ciclina D1. Le cellule KYSE 510 sono state coltivate in monostrato in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> utilizzando il mezzo RPMI 1640 1X contenente il 10% di siero fetale bovino (FBS) inattivato con il calore, 38 unità/ml (30 mg/ml) di streptomina e 100 unità/ml (25 mg/ml) di penicillina G. Per la subcoltura le cellule sono state lavate con PBS ed incubate per 4 minuti a 37°C con una soluzione 0.25% di tripsina e 1 mM di EDTA, per permetterne il distacco dalla fiasca. L'azione della tripsina è stata quindi neutralizzata tramite l'aggiunta di mezzo completo (10% FBS) e, dopo un'accurata risospensione, sono state prelevate delle aliquote contenenti  $3 \times 10^6$  o  $0.8 \times 10^6$  cellule, che sono state seminate in nuove fiasche contenenti 15 ml di terreno completo fresco, rispettivamente per passaggi di 3 o 4 giorni. Le cellule KYSE 510 hanno un tempo di duplicazione di 23-24 ore.

La linea cellulare **A549**, derivante da un carcinoma polmonare di un uomo caucasico di 58 anni, è stata fornita dalla ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, USA). Essa è stata mantenuta in coltura come monostrato in terreno F-12K contenente 2 mM L-glutamina, 1.5 g/l sodio bicarbonato, 38 unità/ml (30 mg/ml) di streptomina e 100 unità/ml (25 mg/ml) di penicillina G e 10% di FBS inattivato col calore. Prima di arrivare a confluenza, le cellule sono state sciacquate con versene, staccate utilizzando una soluzione 0.05% di tripsina e 0.53 mM di EDTA, e riseminate in 15 ml di terreno di coltura completo in quantità pari a  $0.8 \times 10^6$  o  $0.6 \times 10^6$  cellule, rispettivamente ogni 2 o 3 giorni. Le cellule A549 hanno un tempo di duplicazione di circa 22 ore.

La linea cellulare **CCD-34Lu**, fornita dalla ATCC, è costituita da fibroblasti polmonari umani normali di origine neonatale. E' stata mantenuta in coltura come monostrato in terreno DMEM contenente 38 unità/ml di streptomina e 100 unità/ml di penicillina G, amminoacidi non essenziali (NEAA), 0.02 M HEPES e 10% di FBS inattivato con il calore. Prima del raggiungimento della confluenza, le cellule sono state sciacquate con versene, staccate utilizzando una soluzione 0.25% di tripsina e riseminate in 15 ml di mezzo di coltura completo in quantità pari a  $0.8 \times 10^6$  o  $0.6 \times 10^6$  cellule, rispettivamente ogni 2 o 3 giorni. Le cellule CCD-34Lu hanno un tempo di duplicazione di circa 24 ore.

Le varie colture cellulari sono state mantenute in incubatore a 37°C, in atmosfera contenente il 5% di CO<sub>2</sub> e 90% di umidità e sono state testate periodicamente per assicurare l'assenza di contaminazione da micoplasmi.

#### 4.6 SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE MTS

Il CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Proliferation Assay è un saggio colorimetrico che consente di determinare il numero di cellule vitali in esperimenti di proliferazione o di sopravvivenza, basandosi sull'attività delle deidrogenasi cellulari. E' costituito dal sale di tetrazolio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS o reagente di Owen) e dal reagente accoppiante di elettroni fenazina etosolfato (PES). L'MTS, dopo essere stato internalizzato dalle cellule, viene bioridotto e trasformato in formazano, composto solubile nel mezzo di coltura cellulare e con assorbimento alla lunghezza d'onda di 490 nm. Questa conversione dell'MTS è presumibilmente accompagnata dalla formazione di NADPH o NADH prodotti dalle deidrogenasi, enzimi presenti nelle cellule metabolicamente attive. Tali agenti riducenti trasferiscono elettroni al PES, che risulta quindi in grado di ridurre l'MTS. La quantità di formazano prodotta, misurata come assorbimento a 490 nm, è pertanto direttamente proporzionale al numero di cellule vitali presenti nel campione (Fig. 17).

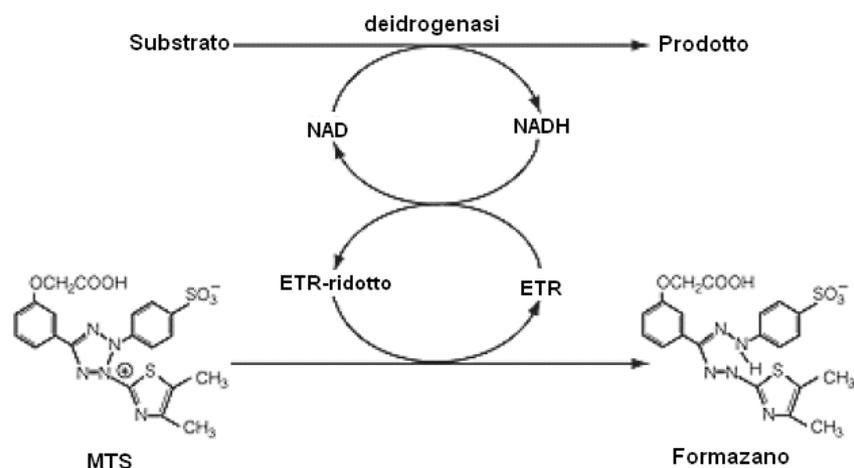


Fig. 17 Trasformazione dell'MTS a formazano (ETR: Electron Transfer Reagent, ossia il reagente accoppiante di elettroni PES).

Per effettuare tale test le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti con fondo piatto (1 x 10<sup>3</sup> cellule KYSE 510/pozzetto; 3 x 10<sup>3</sup> cellule A549 o CCD-34Lu/pozzetto) in 200 µl di terreno completo e lasciate crescere a 37°C per 24 ore. Allo scadere di tale tempo il terreno è stato sostituito con 150 µl di terreno fresco contenente il 3% di FBS e concentrazioni crescenti dell'agente con cui si doveva effettuare il trattamento (3 pozzetti per ogni diversa dose di trattamento). Le cellule sono state incubate al buio a 37°C per 24 ore, al termine delle quali è stata valutata la vitalità cellulare col test MTS

(24 h) oppure è stato eliminato il terreno contenente l'agente trattante, sostituito con 150 µl di terreno completo, dopo aver effettuato 2 lavaggi con 150 µl di PBS con  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , e la vitalità cellulare è stata valutata con saggio MTS dopo ulteriori 24 ore di incubazione (24 + 24 h). Allo scadere delle 24 h e 24 + 24 h, da ciascun pozzetto è stato rimosso il terreno e sono stati aggiunti 100 µl di terreno privo di FBS e 20 µl di soluzione MTS. La reazione è stata fatta procedere a 37°C al riparo dalla luce per circa 60-90 minuti, al termine dei quali è stata misurata l'assorbanza a 490 nm con lettore di piastra spettrofotometrico Spectramax 190 (Molecular Devices). Al valore di assorbanza dei campioni è stato sottratto il valore medio dei bianchi, ossia pozzetti privi di cellule il cui segnale rappresenta il background di assorbanza a 490 nm, calcolando così il valore di assorbanza del formazano prodotto dagli enzimi cellulari. La vitalità cellulare dei diversi campioni è stata quindi espressa come percentuale di assorbanza rispetto al valore medio di assorbanza delle cellule di controllo, ossia rispetto a cellule che non sono state esposte al trattamento, ma che hanno subito gli stessi cambiamenti di terreno delle cellule trattate.

Con questo saggio è stata valutata la tossicità al buio in cellule KYSE 510 indotta dalla mTHPC veicolata nel solvente standard o incorporata non covalentemente in nanoparticelle ORMOSIL nude, dalle nanoparticelle ORMOSIL nude vuote e dal solo solvente standard a concentrazione equivalente a quella utilizzata nella somministrazione della più alta dose di mTHPC. E' stata valutata anche la citotossicità del tensioattivo AOT, contenuto come residuo di sintesi nella soluzione di nanoparticelle, per determinarne la concentrazione massima non tossica *in vitro* nelle cellule KYSE 510. E' stata stimata la tossicità al buio in cellule A549 e CCD-34Lu indotta dalla mTHPC veicolata nel solvente standard o incorporata non covalentemente o covalentemente in nanoparticelle ORMOSIL PEGilate superficialmente, dalle nanoparticelle ORMOSIL PEGilate vuote, dal tensioattivo Brij35 e dalle varie formulazioni liposomiali veicolanti la mTHPC (Fospeg). Il test MTS è stato inoltre applicato per valutare la vitalità di cellule sottoposte a irradiazione dopo trattamento con concentrazioni crescenti di mTHPC nel solvente standard, caricata in nanoparticelle o in liposomi (esperimenti di PDT *in vitro*).

Per questi esperimenti di PDT *in vitro* le cellule sono state seminate in pozzetti e sottoposte a trattamento, seguendo il medesimo protocollo sperimentale sopra descritto per gli esperimenti di citotossicità al buio. Al termine dei trattamenti le cellule di ogni pozzetto sono state sciacquate due volte con 150 µl di PBS con ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  ed irradiate in PBS con una determinata dose di luce rossa (600-700 nm). Nel caso delle cellule KYSE 510 sono stati seminati e trattati solo i 4 pozzetti centrali della piastra, ed irradiati con  $0.12 \text{ J/cm}^2$  (30 secondi;  $4 \text{ mW/cm}^2$ ) di luce rossa, ponendo la piastra sopra un supporto in plexiglass al di sotto del quale è stata fissata la fibra della lampada a quarzo/alogeno PTL Penta (modello STL-B-049, Desys SA, S. Antonino, Svizzera), munita di fibre ottiche e di filtri che permettono di selezionare le lunghezze d'onda di luce appropriata per l'attivazione del PS. Le cellule A549 e CCD-34Lu, invece, sono

state irradiate con  $0.24 \text{ J/cm}^2$  (20 secondi;  $12 \text{ mW/cm}^2$ ) di luce rossa, ponendo la piastra sotto il fascio emesso dalla lampada Waldmann PDT 1200 (Waldmann Medizintechnik, Germania). Entrambe le lampade sono state tarate utilizzando un radiometro IL 1700 (International Light, Newburyport, MA). Al termine dell'irradiazione, il PBS di ogni pozzetto è stato sostituito con  $150 \mu\text{l}$  di terreno completo fresco. Dopo 24 ore di incubazione a  $37^\circ\text{C}$ , la vitalità cellulare è stata valutata con saggio MTS ed espressa come percentuale di assorbanza rispetto a cellule di controllo (100%) che non hanno subito né il trattamento né l'irradiazione.

#### **4.7 TEST DI VITALITÀ CELLULARE CON TRYPAN BLUE**

La vitalità di cellule KYSE 510 dopo PDT con la mTHPC, sciolta nel solvente standard o incorporata in nanoparticelle nude, è stata valutata anche mediante il saggio del trypan blue. Quest'ultimo è un colorante ad esclusione vitale, avente carica negativa, in grado di penetrare solamente nelle cellule con membrana danneggiata. Questa proprietà consente di discriminare le cellule vive dalle morte tramite osservazione al microscopio ottico, in quanto le prime risulteranno non colorate perché escludono il colorante, mentre le seconde assumeranno una tipica colorazione blu.

Per quest'esperimento, sono state seminate  $5 \times 10^4$  cellule KYSE 510 in 2 ml di terreno completo in capsule di plastica del diametro di 35 mm, e lasciate attaccare e crescere in incubatore per 24 ore. Dopo tale tempo, il terreno è stato sostituito con 2 ml di terreno fresco contenente il 3% di FBS e la concentrazione desiderata di mTHPC libera o incorporata in nanoparticelle. Dopo 24 ore di trattamento a  $37^\circ\text{C}$ , i monostrati cellulari sono stati sciacquati due volte con 2 ml di PBS con ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , ed irradiati in PBS con  $0.12 \text{ J/cm}^2$  ( $2 \text{ mW/cm}^2$ ; 1 minuto) di luce rossa (600-700 nm) emessa da una lampada a quarzo/alogeno PTL Penta. Al termine dell'irradiazione, in ogni capsula il PBS è stato sostituito con terreno completo e le capsule sono state mantenute in incubatore a  $37^\circ\text{C}$  per altre 24 ore prima di procedere con il test del trypan blue, che permette di determinare la vitalità cellulare esprimendola come percentuale di cellule negative al trypan blue rispetto a cellule di controllo che non sono state né trattate né irradiate, ma che sono state sottoposte agli stessi cambiamenti di terreno dei campioni trattati. Una volta eliminato il terreno, il monostrato cellulare è stato sciacquato 2 volte con 1 ml di PBS; le cellule sono state staccate dal substrato plastico aggiungendo  $500 \mu\text{l}$  di tripsina/capsula ( $37^\circ\text{C}$ ; 4 minuti) e neutralizzando l'azione di quest'ultima con  $200 \mu\text{l}$  di FBS. Le cellule sono state raccolte in provette e risospese accuratamente. Da ogni campione sono stati prelevati  $30 \mu\text{l}$  di sospensione cellulare ai quali sono stati aggiunti  $30 \mu\text{l}$  di soluzione di trypan blue per effettuare la conta cellulare utilizzando una camera di Bürker. La vitalità cellulare è stata quindi calcolata come percentuale, confrontando il numero di cellule vitali contate nei campioni trattati con il numero di cellule vitali nel controllo, considerate come 100% di vitalità.

## 4.8 PRODUZIONE DI OSSIGENO DI SINGOLETTO

Per valutare la produzione di ossigeno di singoletto da parte della mTHPC, libera o incorporata non covalentemente in nanoparticelle ORMOSIL nude, in diversi tipi di microambienti, è stato misurato il photobleaching dell'ADPA (acido disodico 9,10-antracenedipropionico) in funzione del tempo di irradiazione. L'ADPA è un derivato dell'antracene solubile in acqua che viene convertito in endoperossido dall'ossigeno di singoletto prodotto dall'irradiazione del PS (Yan et al., 2003) (Fig. 18). Questa reazione determina una diminuzione dell'assorbanza dell'ADPA a 378 nm ( $\lambda_{\max}$  di una delle bande di assorbimento dell'ADPA, Fig. 19) per cui è possibile monitorare la produzione di ossigeno di singoletto durante l'irradiazione attraverso misurazioni spettrofotometriche dell'assorbanza a questa lunghezza d'onda. Tali misurazioni devono essere eseguite nello stesso tipo di solvente sia per la mTHPC libera che in nanoparticelle, poiché il tempo di vita dell'ossigeno di singoletto è fortemente influenzato dalle caratteristiche del microintorno in cui viene generato.

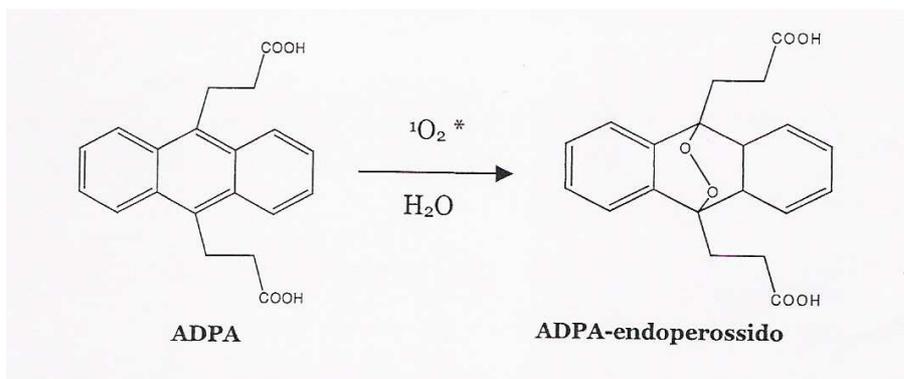


Fig. 18 Formazione dell'ADPA-endoperossido dopo irradiazione del fotosensibilizzatore.

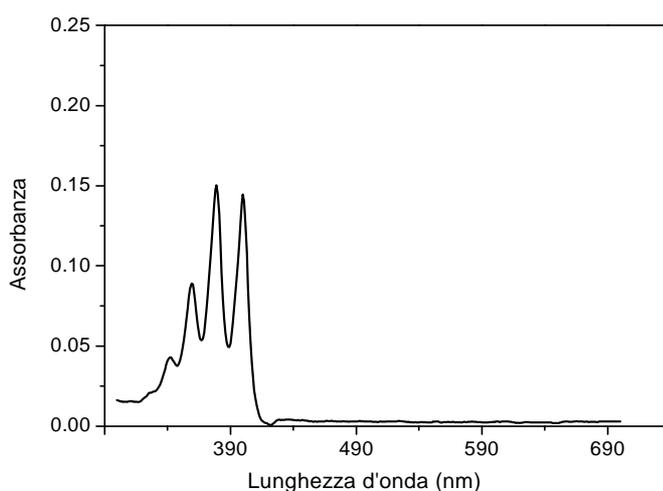


Fig. 19 Spettro di assorbimento dell'ADPA (20  $\mu$ M) in etanolo/acqua (1:1, v/v).

In un tipico esperimento, 2.5 ml di una soluzione di acqua o acqua/etanolo (1:1, v/v) o PBS col 3% di FBS, contenente ADPA 20  $\mu\text{M}$  e mTHPC 1  $\mu\text{M}$  (libera o in nanoparticelle) sono stati mantenuti in agitazione a 20°C ed irradiati con luce rossa in una cuvetta di quarzo con cammino ottico di 1 cm (50 mW/cm<sup>2</sup>) e utilizzando come sorgente luminosa una lampada PTL Penta. In esperimenti di controllo, una soluzione di ADPA 20  $\mu\text{M}$  è stata irradiata nelle stesse condizioni, ma in assenza della mTHPC. La fotodegradazione tempo-dipendente dell'ADPA durante l'irradiazione è stata monitorata effettuando una lettura dell'assorbanza a 378 nm per ogni soluzione, ad intervalli successivi di 5 minuti per un totale di 30 minuti. La costante cinetica della fotodegradazione dell'ADPA nei diversi mezzi è stata calcolata dalla pendenza della porzione lineare dei grafici del  $\ln(A_0/A_t)$  vs tempo di irradiazione.

#### 4.9 PHOTOBLEACHING

Il photobleaching, ossia la degradazione del fotosensibilizzatore una volta esposto ad irradiazione, è indice della fotostabilità della molecola fotosensibilizzante utilizzata. Se quest'ultima infatti si degradasse troppo velocemente si avrebbe una diminuzione della sua efficacia e quindi un insuccesso della terapia. La fotostabilità della mTHPC, veicolata nel solvente standard ed intrappolata fisicamente in nanoparticelle ORMOSIL nude, è stata determinata monitorandone l'emissione di fluorescenza in una sospensione cellulare incubata per 24 ore con il PS. A questo scopo sono state seminate  $5 \times 10^4$  cellule KYSE 510 in capsule di plastica del diametro di 35 mm. Dopo 24 ore a 37°C, le cellule sono state incubate con 2 ml di terreno RPMI contenente il 3% di FBS e 0.5 o 1  $\mu\text{M}$  di mTHPC, sciolta nel solvente standard o incorporata in nanoparticelle. E' stata anche allestita una capsula con cellule di controllo, che non sono state trattate, ma che hanno subito gli stessi cambiamenti di terreno dei campioni trattati. Tutti i campioni sono stati quindi mantenuti al buio a 37°C per 24 ore, al termine delle quali le cellule di ogni capsula sono state lavate due volte con 1 ml di PBS senza ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , sono state staccate con 500  $\mu\text{l}$  di tripsina, la cui azione è stata poi bloccata aggiungendo 200  $\mu\text{l}$  di FBS. La sospensione cellulare di ogni capsula è stata raccolta in una provetta e centrifugata per 8 minuti a 125 x g. Il pellet è stato risospeso con 3 ml di PBS con ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , per mimare le condizioni sperimentali applicate durante l'irradiazione negli esperimenti di valutazione della vitalità cellulare. Tale sospensione in PBS è stata trasferita infine in cuvette da 3 ml, aventi cammino ottico di 1 cm, ed irradiata con luce rossa ad una potenza di 6 mW/cm<sup>2</sup> per intervalli di tempo successivi, mantenendola sotto agitazione magnetica all'interno di un apposito supporto termostato a 22-23°C per evitare che incrementi della temperatura durante l'irradiazione potessero provocare delle alterazioni delle proprietà del fotosensibilizzatore. Al termine di ogni intervallo di irradiazione, per ogni campione è stata letta l'emissione di fluorescenza eccitandolo a 420 nm, dopo aver azzerato lo strumento con la sospensione delle cellule di controllo. Ciò è stato effettuato per analizzare l'eventuale diminuzione del segnale di fluorescenza

emesso dalla mTHPC durante l'esposizione a luce rossa e per individuare eventuali differenze di comportamento tra la clorina veicolata in nanoparticelle nude rispetto a quella nella forma libera.

## 4.10 STUDI DI RILASCIO DELLA mTHPC DALLE NANOPARTICELLE

### 4.10.1 FRET

Le cinetiche di rilascio della mTHPC dalle nanoparticelle, in cui è incorporata solo fisicamente, sono state studiate misurando l'efficienza di trasferimento di energia (FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer) della coppia mTHPC-cianina. A questo scopo sono state sintetizzate nanoparticelle caricate non covalentemente con la mTHPC (donatore) e con un derivato di una cianina (derivato IR775-Sil, accettore) legato covalentemente alla matrice silanica della nanoparticella. Le cinetiche di rilascio sono state analizzate in diversi mezzi: acqua, etanolo/acqua (50:50, v/v) e terreno di coltura cellulare RPMI contenente il 3% di FBS. Gli esperimenti sono stati condotti aggiungendo 200  $\mu$ l di soluzione di nanoparticelle caricate con la mTHPC (3.4  $\mu$ M) e la cianina (6.8  $\mu$ M) a 600  $\mu$ l del mezzo desiderato, in una cuvetta per fluorescenza da 1.2 ml. Ogni cuvetta è stata termostata a 37°C e gli spettri di eccitazione di fluorescenza (200-750 nm) sono stati registrati immediatamente dopo la miscelazione e ad intervalli successivi di 20 minuti, ponendosi alla lunghezza d'onda di emissione alla quale emette solo la cianina, ossia 760 nm. Una correzione lineare basale è stata applicata alla banda di eccitazione della mTHPC a 420 nm, e la sua intensità tempo-dipendente  $I(t)$  è stata utilizzata per calcolare la frazione rilasciata come  $[I(0)-I(t)]/I(0)$ , dove  $I(0)$  e  $I(t)$  indicano rispettivamente l'intensità al tempo 0 ed al tempo  $t$ . In maniera analoga, le cinetiche di rilascio della mTHPC sono state studiate anche per nanoparticelle ORMOSIL PEGilate in terreno di coltura cellulare contenente concentrazioni crescenti di FBS (3%, 10% e 50%).

### 4.10.2 Sintesi del derivato IR775-Sil

Il derivato IR775-Sil, incorporato nelle nanoparticelle impiegate negli esperimenti di FRET, è stato sintetizzato secondo il seguente protocollo sperimentale.

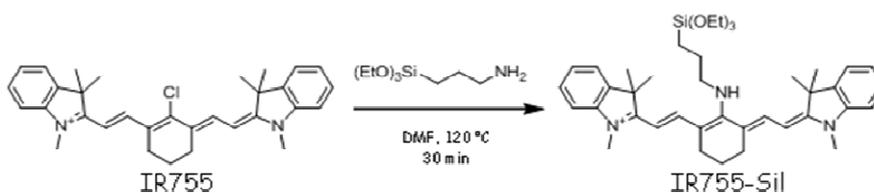


Fig. 20 Schema di reazione della sintesi del derivato IR775-Sil.

Una soluzione di IR775 (104 mg, 0.2 mmol) e APTES (187  $\mu$ l, 0.8 mmol) in DMF anidra (50 ml) è stata mantenuta sotto agitazione a 120°C per 30 minuti in atmosfera di azoto (Fig. 20). Il solvente è stato fatto evaporare ed il prodotto grezzo è stato purificato tramite cromatografia flash su gel di silice (DCM/MeOH, 10:1) ottenendo, dopo ulteriore evaporazione, 30 mg (resa 21%) di IR775-Sil sottoforma di polvere blu. L'emissione massima di fluorescenza di tale derivato in etanolo assoluto è a 738 nm, con un'eccitazione a 627 nm.

#### **4.10.3 Ultracentrifugazione**

Per confermare il rilascio della mTHPC dalle nanoparticelle ORMOSIL nude, in seguito a diluizione nel terreno di coltura cellulare contenente proteine del siero, sono stati effettuati degli esperimenti di ultracentrifugazione.

A tale scopo, la mTHPC incorporata non covalentemente in nanoparticelle nude, è stata diluita alla concentrazione 1.75  $\mu$ M in RPMI contenente il 3% di FBS. Sono stati registrati gli spettri di assorbimento dei campioni nella regione UV-visibile per misurare le concentrazioni delle proteine sieriche e della mTHPC, utilizzando come bianchi appropriate soluzioni. Subito dopo aver registrato gli spettri di assorbimento, oppure dopo incubazione a 37°C (per mimare le condizioni delle colture cellulari) per 5 o 24 ore, i vari campioni sono stati ultracentrifugati per 1 ora a 100000 x g con un'ultracentrifuga Beckman XL-70 munita di un rotore 50-Ti. Tali condizioni di centrifugazione sono state selezionate sulla base di esperimenti preliminari condotti con nanoparticelle nude caricate con una porfirina legata covalentemente alla matrice silanica, che avevano mostrato che in queste condizioni circa l'85% delle nanoparticelle venivano sedimentate, mentre le proteine del siero rimanevano nel surnatante.

Al termine dell'ultracentrifugazione, per valutare la percentuale di mTHPC rilasciata dalle nanoparticelle, sono stati registrati gli spettri di assorbimento UV-visibili dei surnatanti recuperati e confrontati con i corrispondenti spettri ottenuti prima della centrifugazione.

#### **4.11 CINETICHE DI MONOMERIZZAZIONE DELLA mTHPC**

Le cinetiche di monomerizzazione della mTHPC nel terreno di coltura cellulare contenente il 3% di FBS sono state studiate monitorando l'aumento dell'intensità dell'emissione di fluorescenza della clorina. Gli esperimenti sono stati condotti aggiungendo un'aliquota di mTHPC, sciolta nel solvente standard o incorporata non covalentemente in nanoparticelle ORMOSIL nude, a 1.8 ml di RPMI contenente il 3% di FBS in una cuvetta di quarzo per fluorescenza. In tutti i casi la concentrazione finale della mTHPC era pari a 1  $\mu$ M e la cuvetta veniva termostata a 37°C. La lunghezza d'onda di eccitazione è stata impostata a 420 nm e gli spettri di emissione di fluorescenza della clorina (600-800 nm,  $\lambda_{em\ max} = 652\ nm$ ) sono stati acquisiti

immediatamente dopo aver preparato la miscela e ad intervalli successivi di 10 minuti. Una volta raggiunte le condizioni di equilibrio, come indicato dalla costante di intensità di emissione, sono stati addizionati ad ogni cuvetta 3.6  $\mu$ l di Triton X-100 (corrispondente ad un 0.2% v/v della concentrazione nella cuvetta) e sono stati acquisiti gli spettri ad intervalli di 10 minuti. E' stata quindi costruita una curva relativa all'intensità di fluorescenza emessa dalla mTHPC a 652 nm in funzione del tempo, dopo diluizione nel terreno RPMI in presenza di siero.

#### **4.12 DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELL'ACCUMULO CELLULARE DELLA mTHPC**

La concentrazione di mTHPC internalizzata dalle cellule KYSE 510, dopo veicolazione nel solvente standard o incorporata non covalentemente in nanoparticelle nude, è stata misurata sfruttando il suo segnale di emissione di fluorescenza e normalizzandolo sulla base della quantità di proteine cellulari presenti nel campione.

Per questo esperimento sono state seminate  $5 \times 10^4$  cellule KYSE 510 in 2 ml di terreno completo in capsule di plastica del diametro di 35 mm e, dopo 24 ore a 37°C, sono state trattate con 2 ml di terreno contenente il 3% di FBS e 0.5 o 1  $\mu$ M di mTHPC, libera o incorporata in nanoparticelle (3 capsule per ciascuna concentrazione di trattamento). Contemporaneamente sono state preparate anche 3 capsule di controllo. L'accumulo del fotosensibilizzante è stato valutato dopo 24 ore di trattamento, allo scadere delle quali i monostrati cellulari sono stati lavati 2 volte con 2 ml di PBS con ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , e lisati sotto agitazione magnetica per 1 ora a temperatura ambiente con 0.8 ml di SDS al 2%. Per stimare, invece, il rilascio della mTHPC dalle cellule, al termine delle 24 ore di incubazione il terreno è stato sostituito con terreno completo privo della mTHPC e, dopo ulteriori 24 ore di incubazione, le cellule sono state lavate due volte con PBS e lisate.

Per ogni campione lisato è stato registrato lo spettro di emissione di fluorescenza della mTHPC tra 600 e 800 nm ( $\lambda_{\text{em max}} = 652$  nm) con uno spettrofluorimetro (Cary Eclipse, Varian), dopo eccitazione con lunghezza d'onda di 420 nm. La concentrazione della clorina nei lisati cellulari è stata estrapolata da una retta di taratura costruita con soluzioni a concentrazione nota di mTHPC, preparate aggiungendo quantità note di quest'ultima sciolta nel solvente standard ad aliquote di lisato ottenuto da cellule che non sono state esposte a trattamento con la clorina ed aventi lo stesso contenuto di proteine cellulari dei campioni analizzati.

Il contenuto proteico degli stessi lisati cellulari è stato misurato col saggio dell'acido bicinconinico (BCA) ed è stato usato per esprimere l'accumulo intracellulare della mTHPC come picomoli di mTHPC/ $\mu$ g di proteine cellulari. Il saggio viene condotto in condizioni alcaline in quanto viene sfruttata la riduzione dello ione  $\text{Cu}^{2+}$  a ione  $\text{Cu}^+$  da parte delle proteine e la sua interazione con l'acido bicinconinico. La reazione porta alla formazione di un complesso colorato tra due molecole di BCA e una molecola di rame;

tale prodotto è solubile in acqua ed è in grado di assorbire la luce alla lunghezza d'onda di 562 nm. Per effettuare tale saggio BCA, dai lisati cellulari, diluiti 1:2 in acqua milliQ, sono state prelevate in doppio aliquote di 50 µl, a ciascuna delle quali è stato aggiunto 1 ml di miscela di reazione. Quest'ultima è costituita da 50 parti di reagente A ed 1 parte di reagente B. Per permettere l'inizio della reazione, e pertanto l'interazione dell'acido bicinconico con lo ione rameoso, i campioni sono stati mantenuti in incubatore a 37°C per 30 minuti. La reazione è stata quindi bloccata raffreddando i campioni immergendoli in acqua fredda per circa 5 minuti. A questo punto è stata effettuata la lettura dell'assorbanza dei vari campioni a 562 nm, azzerando lo spettrofotometro con acqua milliQ. Per poter risalire alla concentrazione proteica (µg di proteine/ml di lisato cellulare) sulla base del valore di assorbanza letto, è stata costruita una retta di taratura con soluzioni a concentrazione nota di albumina in SDS 1%. Tutti i valori di assorbanza dei campioni e quelli della retta di taratura sono stati sottratti del valore medio delle due letture di assorbanza del bianco, ottenuto incubando 50 µl di SDS 1% con 1 ml di miscela di reazione.

#### **4.13 DETERMINAZIONE DELL'ACCUMULO CELLULARE DELLA mTHPC MEDIANTE CITOFLUORIMETRIA**

L'accumulo in cellule A549 e CCD-34Lu della mTHPC, veicolata nel solvente standard o incorporata non covalentemente e covalentemente in nanoparticelle ORMOSIL PEGilate ed in liposomi PEGilati di vario tipo (Fospeg), è stato valutato tramite citofluorimetria, sfruttando il segnale di fluorescenza emessa dalla clorina.

Per questo esperimento sono state seminate  $1 \times 10^5$  cellule A549 o CCD-34Lu in 2 ml di terreno completo in capsule di plastica del diametro di 35 mm e, dopo 24 ore a 37°C, sono state trattate con 2 ml di terreno contenente il 3% di FBS e concentrazioni crescenti di mTHPC, libera o incorporata in nanoparticelle o liposomi. Contemporaneamente sono state preparate anche delle capsule di controllo, non esposte al trattamento ma sottoposte agli stessi cambiamenti di terreno dei campioni trattati. Al termine delle 24 ore di incubazione è stato valutato l'accumulo della clorina, mentre è stato stimato l'eventuale rilascio della mTHPC dalle cellule dopo ulteriori 24 ore a 37°C in terreno completo fresco privo del trattamento. Allo scadere di questi tempi, le cellule di ogni capsula sono state sciacquate 2 volte con 2 ml di versene e staccate con 500 µl di tripsina, la cui azione è stata neutralizzata con 200 µl di siero. Le varie sospensioni cellulari sono state quindi raccolte in provette per citofluorimetria, centrifugate, risospese in 500 µl di PBS, acquisite ed analizzate al citofluorimetro BD FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, California, USA) utilizzando il programma FACSDiva. Il segnale di emissione di fluorescenza rossa della mTHPC è stata misurata a lunghezze d'onda superiori ai 670 nm, utilizzando come sorgente di eccitazione il laser a 488 nm. Per ciascun campione sono stati acquisiti 10000 eventi e la quantità di mTHPC

accumulata è stata espressa come fluorescenza cellulare media calcolata dagli istogrammi di intensità di fluorescenza vs numero di eventi acquisiti.

Mediante citofluorimetria è stato valutato anche l'accumulo nel tempo della mTHPC (1  $\mu$ M) in cellule A549, dopo veicolazione nel solvente standard o in liposomi Fospeg 8%-2000.

#### 4.14 VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE DI ROS MEDIANTE CITOFLUORIMETRIA

Per valutare la produzione cellulare endogena di ROS (Reactive Oxygen Species) in seguito a trattamento con nanoparticelle vuote nude e PEGilate è stato utilizzato il kit Image-It™ LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection basato sull'uso della sonda non fluorescente Carbossi-H<sub>2</sub>DCFDA (5-(e 6)-carbossi-2',7'-diclorodiidrofluoresceina diacetato). Questa sonda viene internalizzata dalle cellule e si accumula preferibilmente nel citosol, dove viene deacetilata a Carbossi-DCFH (diclorofluoresceina) dalle esterasi intracellulari. Quest'ultima, in presenza di qualsiasi forma di ROS, viene ossidata e convertita a Carbossi-DCF, prodotto fluorescente con un massimo di assorbimento a 495 nm e di emissione a 529 nm, rilevabile mediante citofluorimetria (Fig. 21).

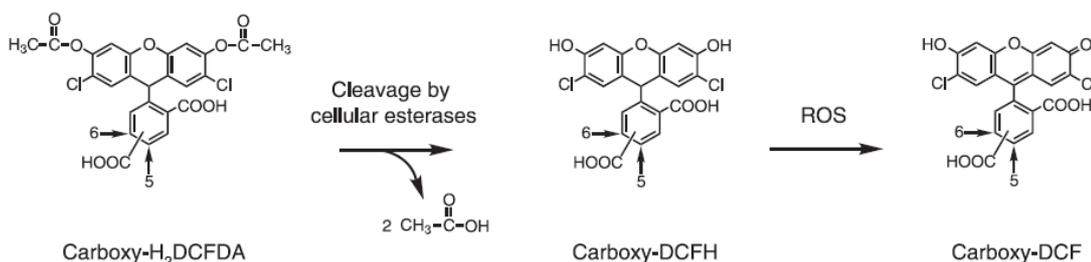


Fig. 21 Schema delle modificazioni subite dalla sonda non fluorescente Carbossi-H<sub>2</sub>DCFDA dopo internalizzazione cellulare.

Sono state seminate  $5 \times 10^4$  cellule KYSE 510 oppure  $1 \times 10^5$  cellule A549 o CCD-34Lu in 2 ml di terreno completo in capsule del diametro di 35 mm e lasciate crescere per 24 ore a 37°C. Ogni capsula è stata quindi incubata al buio per 24 ore con 2 ml di soluzione di trattamento contenente il 3% di FBS e nanoparticelle ORMOSIL vuote, nude o PEGilate superficialmente, in diverse concentrazioni. Allo scadere delle 24 ore, alcuni campioni di cellule KYSE 510 sono stati irradiati con  $0.12 \text{ J/cm}^2$  di luce rossa, come previsto nel protocollo adottato per la PDT *in vitro* (paragrafo 4.7). Parallelamente sono stati allestiti anche dei controlli negativi, ossia cellule incubate per 24 ore col solo terreno contenente il 3% di siero, e dei controlli positivi in cui il monostrato cellulare è stato trattato per 24 ore col farmaco tioridazina cloridrato (5  $\mu$ M) e successivamente irradiato con  $10 \text{ J/cm}^2$  di luce UVA utilizzando due lampade Philips HPW 125, che emettono quasi esclusivamente alla lunghezza d'onda di 365 nm. Al termine dei trattamenti, ogni capsula è stata incubata per 30 minuti con 500  $\mu$ l di Carbossi-H<sub>2</sub>DCFDA sciolta in PBS con ioni Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> alla concentrazione 25  $\mu$ M,

dopo aver effettuato due lavaggi con 1 ml di PBS con ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Come suggerito nel protocollo sperimentale fornito col Kit, la soluzione di Carboxy- $\text{H}_2\text{DCFDA}$  25  $\mu\text{M}$  in PBS è stata sempre preparata fresca diluendo quella precedentemente sciolta in DMSO (10 mM). Allo scadere dell'incubazione con la sonda, le cellule sono state sciacquate tre volte con 1 ml di PBS con ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , tripsinizzate e neutralizzate col siero, raccolte in provette per citofluorimetria, centrifugate, risospese in 500  $\mu\text{l}$  di PBS ed analizzate al citofluorimetro BD FACSCanto II utilizzando il programma FACSDiva.

L'intensità di emissione di fluorescenza verde della sonda è stata misurata nell'intervallo di  $530 \pm 15$  nm, utilizzando come sorgente di eccitazione il laser a 488 nm. Per ciascun campione sono stati acquisiti 10000 eventi.

#### **4.15 MICROSCOPIA DI FLUORESCENZA**

L'internalizzazione e la localizzazione intracellulare della mTHPC veicolata nel solvente standard, in nanoparticelle o in formulazioni liposomiali è stata analizzata mediante microscopia di fluorescenza, sfruttando la naturale fluorescenza rossa di questo fotosensibilizzatore.

Per questi esperimenti sono state seminate  $5 \times 10^4$  cellule KYSE 510 oppure  $1 \times 10^5$  cellule A549 o CCD-34Lu in 2 ml di terreno completo in capsule di plastica del diametro di 35 mm contenenti un vetrino coprioggetti. Dopo 24 ore a  $37^\circ\text{C}$ , il terreno è stato sostituito con terreno fresco contenente il 3% di FBS e 0.75 o 1.5  $\mu\text{M}$  di mTHPC sciolta nel solvente standard, incorporata in nanoparticelle e in liposomi. I vetrini sono stati incubati a  $37^\circ\text{C}$  per tempi diversi (KYSE: 0.5, 2 o 24 ore; A549 e CCD-34Lu: 5 o 24 ore) e, dopo due lavaggi con 2 ml di PBS, sono stati posti su vetrini portaoggetti ed osservati al microscopio a fluorescenza Olympus IMT-2 equipaggiato con CCD camera (Micromax, Princeton Instruments) e lampada allo Xenon da 75 W. Le immagini sono state acquisite utilizzando obiettivi a immersione in olio 40X o 60X 1.4 NA (Olympus) ed analizzate col software per immagini Metamorph (Universal Imaging). Per studiare la ridistribuzione della mTHPC intracellulare dopo la sua rimozione dal terreno di trattamento, le osservazioni sono state fatte anche 24 ore dopo la rimozione della soluzione di trattamento ed il ripristino del terreno completo. Per individuare la localizzazione subcellulare della mTHPC sono state utilizzate delle sonde fluorescenti specifiche per organelli e/o compartimenti cellulari, in modo da verificare l'eventuale co-localizzazione per sovrapposizione della fluorescenza della clorina con quella delle sonde. R123 (0.2  $\mu\text{M}$ ), LysoTrackerGreen DND-26 (75 nM), NBD  $\text{C}_6$ -ceramide (15  $\mu\text{M}$ ) e ER-Tracker Green (1  $\mu\text{M}$ ), utilizzati rispettivamente per marcare i mitocondri, i lisosomi, l'apparato del Golgi ed il reticolo endoplasmatico, sono stati aggiunti ai monostrati cellulari 15 minuti prima del termine del trattamento con la clorina. La R123 è una sonda cationica che viene sequestrata selettivamente all'interno dei mitocondri metabolicamente attivi. La sonda NBD- $\text{C}_6$  ceramide è in grado di legarsi agli

sfingolipidi cellulari, particolarmente abbondanti nell'apparato del Golgi. La glibenclamide coniugata all'ER-Tracker<sup>TM</sup> Green è in grado di legarsi a recettori della sulfonilurea presenti su canali del potassio ATP-dipendenti, che sono molto diffusi proprio nel reticolo endoplasmatico. Il LysoTracker Green è un fluoroforo legato ad una base debole solo parzialmente protonata a pH neutro, è di tipo acidotropico altamente permeabile nelle membrane biologiche in grado di colorare selettivamente solo gli organelli caratterizzati da un interno acido, tra cui i lisosomi.

E' stato usato un set di filtri con eccitazione a 400 nm ed emissione a 620 nm per visualizzare la fluorescenza della mTHPC, e con eccitazione a 475 nm ed emissione a 520 nm per visualizzare la fluorescenza verde delle sonde.

Lo stesso protocollo sperimentale è stato adottato anche per l'osservazione della distribuzione intracellulare di liposomi PEGilati marcati con una rodamina legata covalentemente ad un lipide, per poter individuare il sito di localizzazione cellulare del liposoma.

#### **4.16 STUDIO DEL MECCANISMO DI ACCUMULO CELLULARE DELLA mTHPC**

Per determinare se il meccanismo di internalizzazione nelle cellule KYSE 510 della mTHPC, libera o incorporata non covalentemente in nanoparticelle nude, fosse di tipo endocitico, è stato studiato l'effetto della temperatura di incubazione. Alla temperatura di 4°C si ha infatti una diminuzione della fluidità delle membrane cellulari e della produzione energetica intracellulare, che determinano un'inibizione dell'endocitosi cellulare. Le cellule sono state seminate secondo il protocollo seguito negli studi di microscopia di fluorescenza ed accumulo (paragrafi 4.15 e 4.12), sono state incubate per 2 ore a 4°C e a 37°C con le soluzioni di trattamento contenenti la mTHPC, veicolata nel solvente standard o incorporata non covalentemente in nanoparticelle nude, ed HEPES 5 mM, che serve a mantenere un pH fisiologico anche in seguito a cambiamenti di temperatura. Allo scadere di tale tempo, le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza (paragrafo 4.15) per verificare se sia avvenuta o meno l'internalizzazione cellulare della mTHPC dopo incubazione a 4°C. In alternativa le cellule sono state lisate (paragrafo 4.12) per determinare la quantità di clorina accumulata nelle cellule incubate a 4°C come percentuale rispetto a cellule incubate a 37°C.

#### **4.17 ANALISI STATISTICA**

I risultati relativi alla vitalità cellulare e agli accumuli di mTHPC sono stati analizzati utilizzando il programma di statistica medica per Discipline Biomediche (Mc GrowHill) e in particolar modo applicando il test *t di Student* per poter effettuare confronti tra due gruppi di campioni.



5

***RISULTATI E DISCUSSIONE***

## 5.1 CARATTERIZZAZIONE DI NANOPARTICELLE NUDE CARICATE NON COVALENTEMENTE CON LA mTHPC

Le nanoparticelle ORMOSIL nude caricate non covalentemente con la mTHPC sono state sintetizzate e caratterizzate presso il Dipartimento di Scienze Chimiche. Dalle analisi al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) è stato osservato che esse presentano una forma sferica ed un diametro medio di  $33 \pm 9$  nm (Fig. 22), in buon accordo col diametro idrodinamico di  $41 \pm 6$  nm determinato mediante le analisi effettuate al Dynamic Light Scattering (DLS). L'incorporazione della mTHPC nelle nanoparticelle è stata dimostrata attraverso gli spettri di assorbimento UV-vis e di emissione di fluorescenza della sospensione di nanoparticelle in acqua (Fig. 23). Lo spettro di assorbimento della clorina in nanoparticelle presenta una banda di assorbimento massimo attorno a 420 nm e quattro bande Q a lunghezze d'onda maggiori, l'ultima delle quali centrata a 650 nm. Il suo picco massimo di emissione di fluorescenza ( $\lambda_{\text{ecc}} = 420$  nm) è invece a 652 nm. E' noto che la mTHPC sciolta in acqua forma aggregati caratterizzati da bande di assorbimento allargate e da una diminuzione dell'emissione di fluorescenza (Hadjur et al., 1998). Al contrario, le caratteristiche della mTHPC incorporata nelle nanoparticelle in soluzione acquosa sono simili a quelle della mTHPC libera disciolta in solventi organici. La clorina incorporata in nanoparticelle ORMOSIL si trova in un ambiente di polarità simile al toluene. Le molecole di fotosensibilizzante nelle nanoparticelle sono in una forma monomericamente in quanto gli spettri d'assorbimento e di eccitazione di fluorescenza della mTHPC incorporata in nanoparticelle in acqua sono molto simili (Fig. 23). E' stato stimato che una tipica preparazione di nanoparticelle contiene in media circa 0.5 mg di nanoparticelle/ml e 7  $\mu\text{M}$  di mTHPC, e che all'interno di ogni singola nanoparticella sono state incorporate circa 260 molecole di fotosensibilizzante. Tali nanoparticelle sono stabili in acqua, ma tendono ad aggregare e precipitare in PBS o in terreno di coltura cellulare RPMI, a causa dell'elevata concentrazione di sali. Tuttavia, la presenza del 3% di FBS nelle soluzioni di trattamento previene l'aggregazione e la precipitazione.

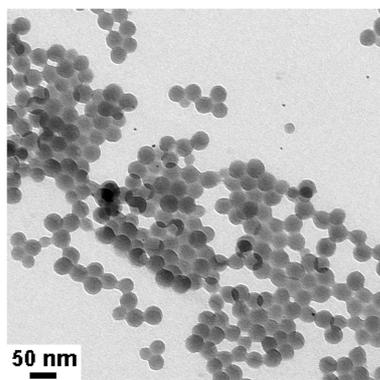


Fig. 22 Immagine al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di nanoparticelle ORMOSIL nude caricate non covalentemente con la mTHPC (Compagnin et al., 2009).

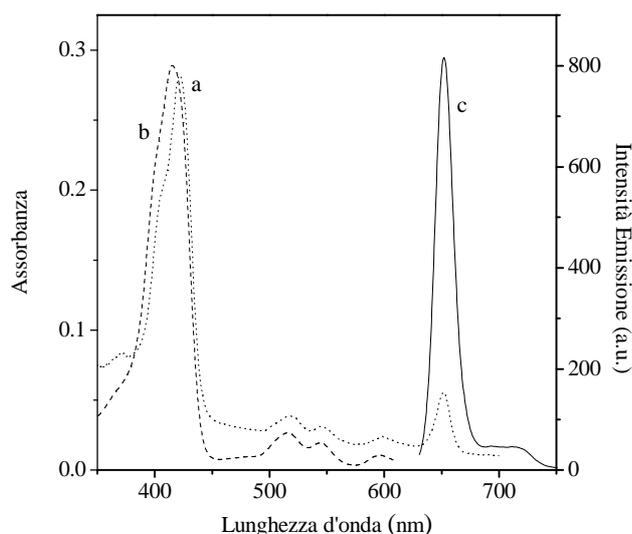


Fig. 23 Spettri di assorbimento ((a), linea punteggiata), di eccitazione di fluorescenza ((b), linea tratteggiata,  $\lambda_{em} = 652 \text{ nm}$ ) e di emissione di fluorescenza ((c), linea continua,  $\lambda_{ecc} = 420 \text{ nm}$ ) della mTHPC  $1 \mu\text{M}$  incorporata non covalentemente in nanoparticelle ORMOSIL nude in acqua (Compagnin et al., 2009).

## 5.2 TOSSICITA' IN CELLULE KYSE 510 DELL'AOT, DELLA mTHPC NEL SOLVENTE STANDARD E INCORPORATA NON COVALENTAMENTE IN NANOPARTICELLE NUDE, E DEI VEICOLI

Le nanoparticelle ORMOSIL nude sono state sintetizzate per polimerizzazione del VTES nel *core* idrofobico di micelle di AOT/*n*-butanolo. Una volta sintetizzata, la sospensione di nanoparticelle è stata ultrafiltrata per ridurre la concentrazione di tensioattivo AOT, prima della somministrazione *in vitro* alle cellule. La sua eliminazione non può essere completa in quanto le nanoparticelle ORMOSIL tendono a precipitare in soluzione acquosa priva di AOT. Pertanto, per poter individuare la concentrazione massima di AOT tollerata dalle cellule, la vitalità di cellule KYSE 510 è stata valutata con saggio MTS dopo 24 ore di trattamento al buio con dosi crescenti di questo surfattante e 24 ore dopo la sua eliminazione e ripristino con terreno completo. Nel grafico di Fig. 24 si può notare come la vitalità cellulare diminuisca all'aumentare della concentrazione di AOT presente nella soluzione di trattamento. Nei campioni cellulari incubati per 24 ore col detergente tale diminuzione risulta significativa per concentrazioni pari o superiori a  $50 \mu\text{M}$ , fino ad arrivare all'induzione di mortalità totale per concentrazioni di AOT pari a  $100 \mu\text{M}$ . Nei campioni trattati, invece, per 24 ore col tensioattivo ed incubati per ulteriori 24 ore in terreno completo, la vitalità cellulare diminuisce significativamente, rispetto a cellule di controllo, a partire dalla concentrazione  $30 \mu\text{M}$ , fino a raggiungere mortalità totale con una concentrazione pari a  $85 \mu\text{M}$ . Pertanto, al termine del processo di ultrafiltrazione, una sospensione standard di nanoparticelle ORMOSIL nude, vuote o caricate con la mTHPC, deve avere una

concentrazione di tensioattivo AOT tale che dopo diluizione nel mezzo di coltura cellulare di trattamento non sia superiore a 30  $\mu\text{M}$ .

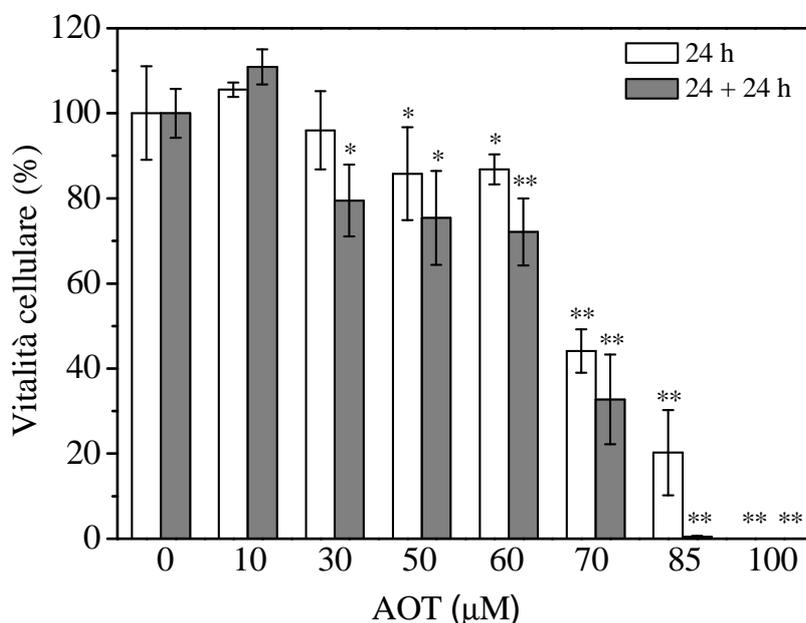


Fig. 24 Vitalità di cellule KYSE 510 incubate con concentrazioni crescenti di AOT per 24 ore. La vitalità è stata valutata con saggio MTS allo scadere del trattamento (24 h) e 24 ore dopo il ripristino con terreno completo (24 + 24 h). I dati rappresentano le medie  $\pm$  d.s. ( $n = 6$ ). \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  rispetto alle cellule di controllo,  $t$ -test.

E' stata valutata inoltre, col saggio MTS, la citotossicità al buio della mTHPC sciolta nel solvente standard ed incorporata in nanoparticelle nude, in modo da poter confrontare gli effetti delle due modalità di veicolazione (Fig. 25). Al termine delle 24 ore di trattamento (Fig. 25, A), la mTHPC in forma libera causa una significativa diminuzione della vitalità cellulare, rispetto a cellule di controllo, a partire dalla concentrazione 1.75  $\mu\text{M}$ , fino ad indurre una mortalità pari a circa l'80% alla dose 5  $\mu\text{M}$ . La mTHPC incorporata in nanoparticelle nude induce una minor mortalità cellulare rispetto a quella veicolata nel solvente standard, infatti alla concentrazione 5  $\mu\text{M}$  essa causa una mortalità pari solo a circa il 20%. La vitalità cellulare diminuisce 24 ore dopo il termine del trattamento e ripristino con mezzo completo (Fig. 25, B), per entrambe le modalità di veicolazione, fino ad arrivare a una mortalità quasi completa alla concentrazione 5  $\mu\text{M}$  di mTHPC nel veicolante standard e di circa il 90% alla concentrazione 5  $\mu\text{M}$  di mTHPC in nanoparticelle. Nella successiva analisi dei risultati ottenuti dopo irradiazione della clorina sarà importante tener presente che una piccola percentuale della mortalità indotta sarà dovuta alla citotossicità del trattamento al buio.

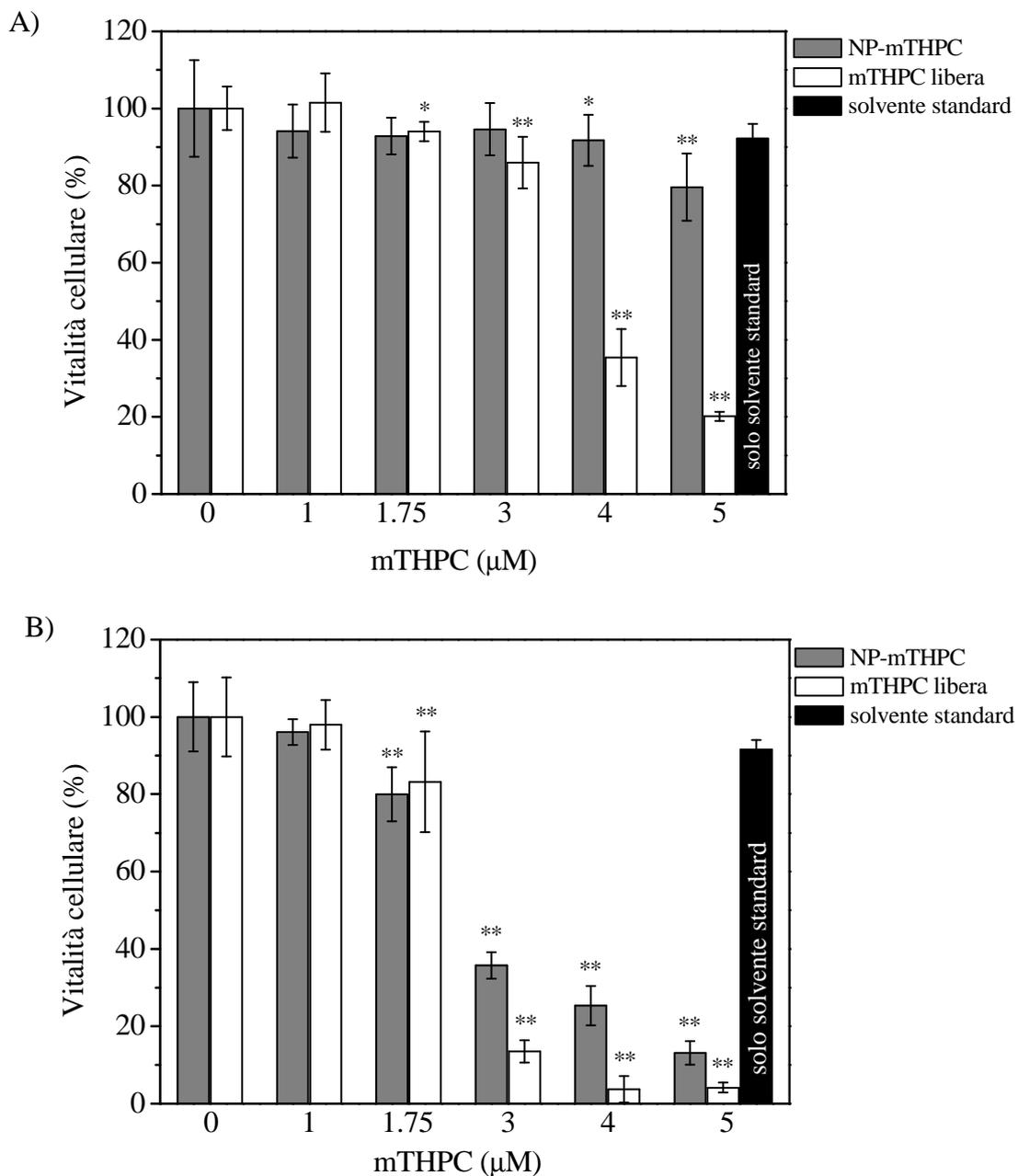


Fig. 25 Vitalità di cellule KYSE 510 trattate per 24 ore al buio con concentrazioni crescenti di mTHPC veicolata nel solvente standard (libera) o in nanoparticelle ORMOSIL nude legata non covalentemente. La vitalità cellulare è stata valutata col saggio MTS al termine del trattamento (24 h, A) e 24 ore dopo il ripristino con terreno completo (24 + 24 h, B); la vitalità è stata determinata anche dopo esposizione alla dose di veicolante della mTHPC (etanolo assoluto/PEG 400/acqua) corrispondente alla quantità presente nel trattamento con mTHPC 5 μM (solo solvente standard). La vitalità è espressa come percentuale rispetto a cellule di controllo trattate col medesimo protocollo dei campioni trattati, ma né incubate con la mTHPC né col veicolo. I dati rappresentano le medie ± d.s. ( $n = 6$ ). \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  rispetto alle cellule di controllo,  $t$ -test. (Compagnin et al., 2009).

Per verificare che l'effetto citotossico fosse dovuto esclusivamente al fotosensibilizzante, e non al veicolante standard in cui è sciolto, è stata determinata la vitalità cellulare dopo somministrazione del solvente standard in quantità pari a quella contenuta in una soluzione di trattamento con la mTHPC 5  $\mu\text{M}$ . Tale dose di solvente non provoca significative alterazioni della vitalità cellulare né dopo 24 ore di trattamento, né allo scadere di ulteriori 24 ore di incubazione in terreno completo privo del veicolante (Fig. 25), confermando così che gli effetti citotossici sono causati solo dalla clorina.

Il saggio MTS è stato utilizzato anche per valutare la citotossicità indotta al buio dalle nanoparticelle ORMOSIL nude vuote, chimicamente identiche a quelle caricate con la clorina, con lo scopo di verificare che il nanoveicolo non presenti una tossicità intrinseca (Fig. 26). Tutte le concentrazioni di nanoparticelle saggate nelle cellule KYSE 510 non causano citotossicità al termine delle 24 ore di trattamento; mentre 24 dopo il termine del trattamento e ripristino con terreno completo si ha una significativa diminuzione della vitalità cellulare, rispetto ai controlli, con concentrazioni superiori a 0.2 mg di nanoparticelle/ml. La mortalità cellulare indotta è comunque ridotta, in quanto non è superiore al 20%. La dose 0.15 mg di nanoparticelle/ml è circa pari a quella presente in una soluzione di trattamento contenente 1.75  $\mu\text{M}$  di mTHPC incorporata in nanoparticelle, che è la dose più elevata utilizzata negli esperimenti di PDT *in vitro*.

La vitalità di cellule KYSE 510 incubate per 24 ore con 0.2 mg/ml di nanoparticelle nude vuote, è stata valutata col test del trypan blue anche 24 dopo irradiazione con 0.12  $\text{J}/\text{cm}^2$  di luce rossa, ed è risultata essere solo lievemente ridotta ( $89.5 \pm 6.2\%$ ) rispetto a cellule di controllo.

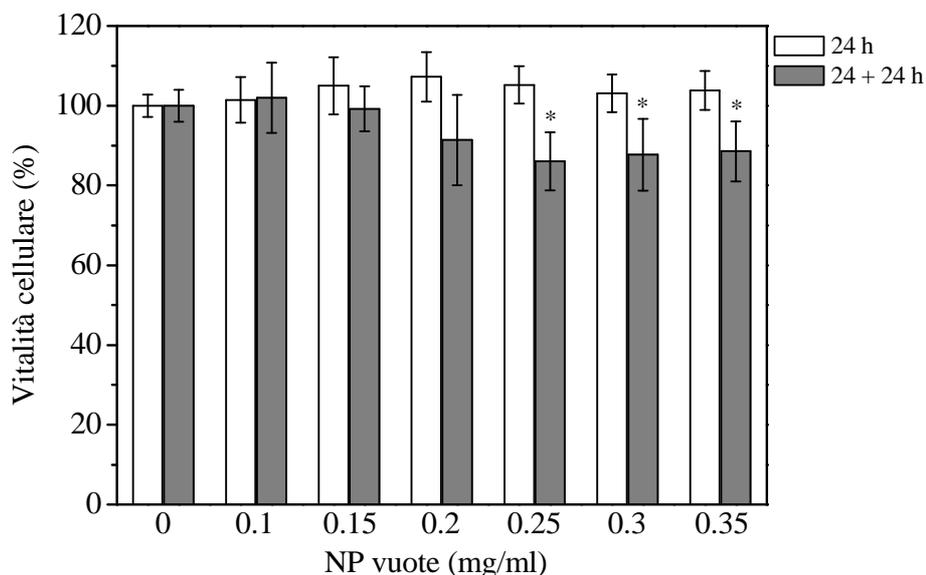


Fig. 26 Vitalità di cellule KYSE 510 incubate con concentrazioni crescenti di nanoparticelle ORMOSIL vuote nude, non sottoposte ad irradiazione. Il saggio MTS è stato condotto al termine delle 24 ore di trattamento (24 h) e dopo successive 24 ore di incubazione in terreno completo (24 + 24 h). I dati rappresentano le medie  $\pm$  d.s. ( $n = 9$ ). \*:  $p < 0.01$  rispetto alle cellule di controllo,  $t$ -test. (Compagnin et al., 2009).

Si può concludere pertanto che le nanoparticelle ORMOSIL nude vuote, alle concentrazioni utilizzate per veicolare la clorina, non causano effetti citotossici significativi né al buio né dopo irradiazione. Per concentrazioni superiori a 0.2 mg di nanoparticelle/ml, si dovrà considerare che una piccola parte della citotossicità è provocata dal nanoveicolo, mentre la rimanente tossicità sarà da attribuire al farmaco veicolato.

### 5.3 PRODUZIONE DI ROS IN CELLULE KYSE 510 ESPOSTE A NANOPARTICELLE NUDE VUOTE

La produzione di ROS è stata valutata in cellule KYSE 510 incubate con nanoparticelle ORMOSIL nude vuote, utilizzando la sonda Carbossi-H<sub>2</sub>DCFDA che, una volta internalizzata dalle cellule, viene ossidata e poi, in presenza di ROS intracellulari, convertita nel prodotto fluorescente Carbossi-DCF. Tale segnale di fluorescenza è stato quantificato tramite analisi al citofluorimetro. Per controllare un'eventuale fluorescenza cellulare endogena, come controllo negativo sono state considerate cellule KYSE 510 non trattate e non incubate con la sonda Carbossi-H<sub>2</sub>DCFDA e cellule non trattate, ma incubate con la sonda. E' stato inoltre allestito un controllo positivo per verificare il funzionamento della sonda, costituito da cellule incubate col farmaco tioridazina cloridrato (5 µM) per 24 ore ed irradiate con luce UVA alla potenza di 10 J/cm<sup>2</sup> in presenza della sonda Carbossi-H<sub>2</sub>DCFDA. In Fig. 27 è possibile osservare che, mentre le cellule di controllo incubate o meno con la sonda emettono un segnale di fluorescenza molto basso, il controllo positivo emette un segnale superiore di due ordini di grandezza.

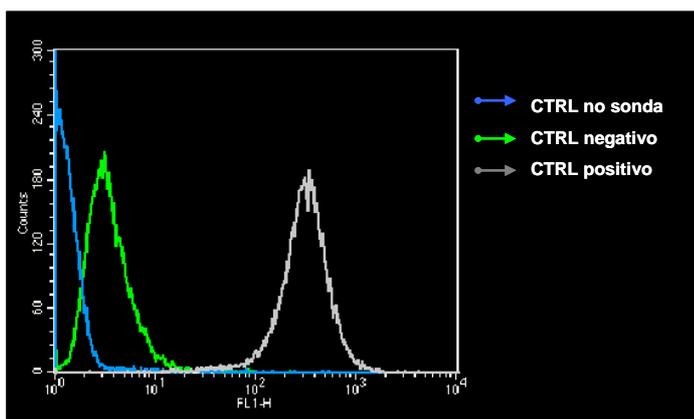


Fig. 27 Analisi al citofluorimetro di campioni di controllo (negativo, con e senza sonda, e positivo) di cellule KYSE 510 usate per la valutazione della produzione di ROS. Nell'istogramma, che in ordinata presenta il numero di eventi acquisiti ed in ascissa la fluorescenza verde in scala logaritmica, è visibile il segnale di fluorescenza verde emesso dalla sonda Carbossi-H<sub>2</sub>DCFDA nelle cellule.

La produzione di ROS è stata valutata in campioni trattati per 24 ore con nanoparticelle ORMOSIL vuote alle concentrazioni 0.2 e 0.33 mg/ml, non irradiati ed irradiati con luce rossa alla potenza di 0.12 J/cm<sup>2</sup>. In tutti i casi considerati i campioni non mostrano un segnale di fluorescenza significativamente diverso da quello di cellule di controllo (Tab. 1). La concentrazione di nanoparticelle 0.15 mg/ml corrisponde a quella presente in un trattamento con nanoparticelle caricate con 1.75 µM di mTHPC, ovvero la dose di fotosensibilizzante più elevata saggiata negli esperimenti di PDT *in vitro*. Si può quindi concludere che il trattamento con nanoparticelle vuote sottoposte e non ad irradiazione, non determina una significativa produzione di ROS nelle 24 ore successive al trattamento.

CAMPIONE	FLUORESCENZA CANALE MEDIO
Controllo negativo	1.43
Controllo negativo + sonda	3.81
Controllo positivo	341
0.2 mg NP/ml BUIO	2.83
0.2 mg NP/ml IRR	2.57
0.33 mg NP/ml BUIO	3.28
0.33 mg NP/ml IRR	2.53

Tab. 1 Valori relativi al canale medio di fluorescenza emessa dalla sonda Carbossi-H<sub>2</sub>DCFDA in vari campioni cellulari, al termine di 24 ore di trattamento.

#### **5.4 FOTOCITOTOSSICITA' DELLA mTHPC NEL SOLVENTE STANDARD E INCORPORATA NON COVALENTEMENTE IN NANOPARTICELLE NUDE**

La fototossicità di concentrazioni crescenti di mTHPC (0.1-1.75 µM) sciolta nel solvente standard o veicolata in nanoparticelle ORMOSIL nude è stata valutata nelle cellule KYSE 510 dopo 24 ore di trattamento seguito da irradiazione con una dose di luce rossa pari a 0.12 J/cm<sup>2</sup>. La vitalità cellulare è stata determinata utilizzando sia il saggio MTS che il test del trypan blue. Come visibile dalle curve dose-risposta dopo PDT, ottenute col test del trypan blue (Fig. 28, A), l'efficacia del fotosensibilizzatore è direttamente proporzionale alla concentrazione somministrata. Si ha una significativa diminuzione della vitalità cellulare, rispetto ai controlli, a partire dalla dose 0.2 µM di mTHPC, un'induzione di mortalità di circa il 50% per concentrazioni di mTHPC pari a 0.5 µM ed una completa induzione di mortalità dopo PDT con 1.25 µM di mTHPC. Sorprendentemente, la curva dose-risposta ottenuta incubando le cellule KYSE 510 con concentrazioni crescenti di mTHPC sciolta nel solvente standard è perfettamente sovrapponibile a quella della mTHPC veicolata in nanoparticelle ORMOSIL nude, dimostrando che l'efficacia del fotosensibilizzante veicolato in nanoparticelle non è minore rispetto a quella ottenuta somministrandolo in forma libera. Questi risultati sono

stati confermati anche col saggio MTS per quattro concentrazioni selezionate di mTHPC (0.25, 0.5, 1 e 1.75  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 28, B). I valori di vitalità cellulare ottenuti col test MTS sono leggermente più elevati rispetto a quelli ottenuti col test del trypan blue, probabilmente a causa del diverso metodo di rilevamento della vitalità cellulare dei due tests.

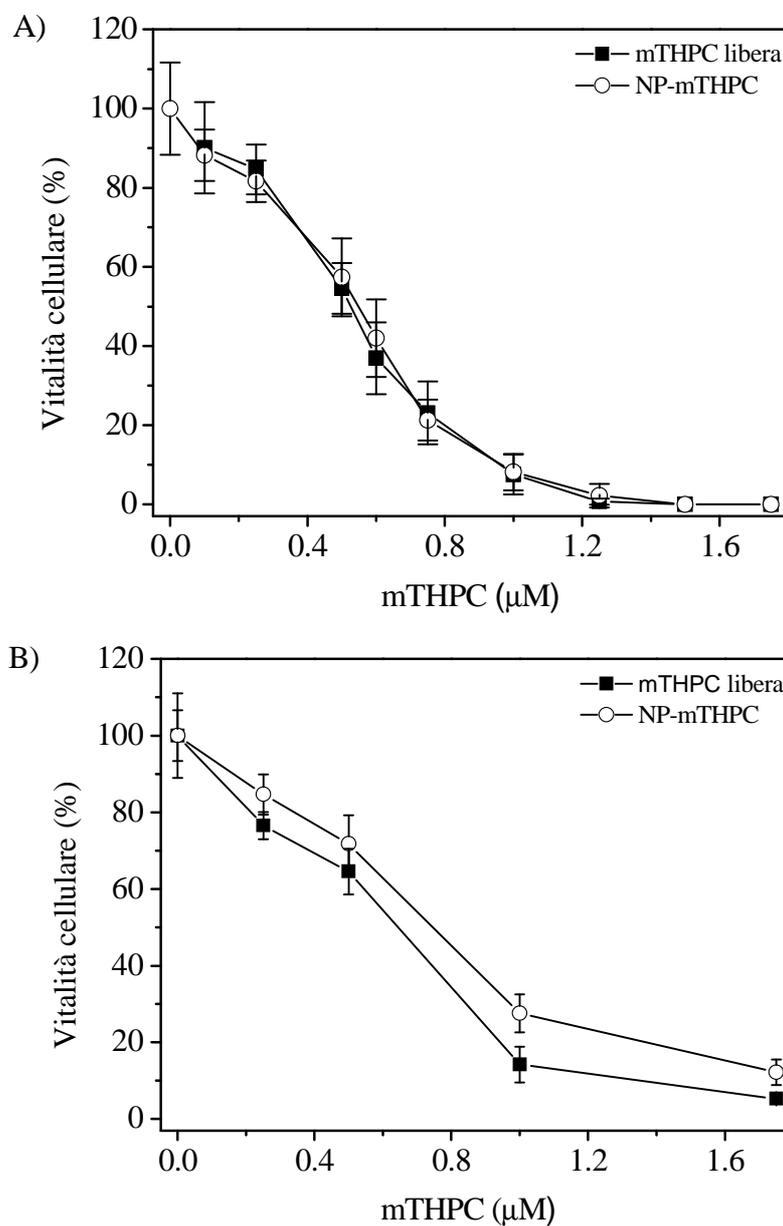


Fig. 28 Curve di vitalità di cellule KYSE 510 irradiate con  $0.12 \text{ J/cm}^2$  di luce rossa (600-700 nm) dopo 24 ore di incubazione con concentrazioni crescenti di mTHPC veicolata nel solvente standard oppure incorporata non covalentemente in nanoparticelle ORMOSIL nude. La vitalità cellulare è stata determinata 24 ore dopo l'irradiamento mediante il test col colorante ad esclusione vitale trypan blue (A) ed il saggio MTS (B). I dati rappresentano le medie  $\pm$  d.s. ( $n = 6$ ). (Compagnin et al., 2009).

## 5.5 LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE DELLA mTHPC NEL SOLVENTE STANDARD E INCORPORATA NON COVALENTEMENTE IN NANOPARTICELLE NUDE

L'internalizzazione in cellule KYSE 510 e la distribuzione subcellulare della mTHPC, nella forma libera (solvente standard) o veicolata tramite nanoparticelle ORMOSIL nude, sono state analizzate mediante studi di microscopia di fluorescenza, sfruttando le proprietà di fluorescenza della clorina.

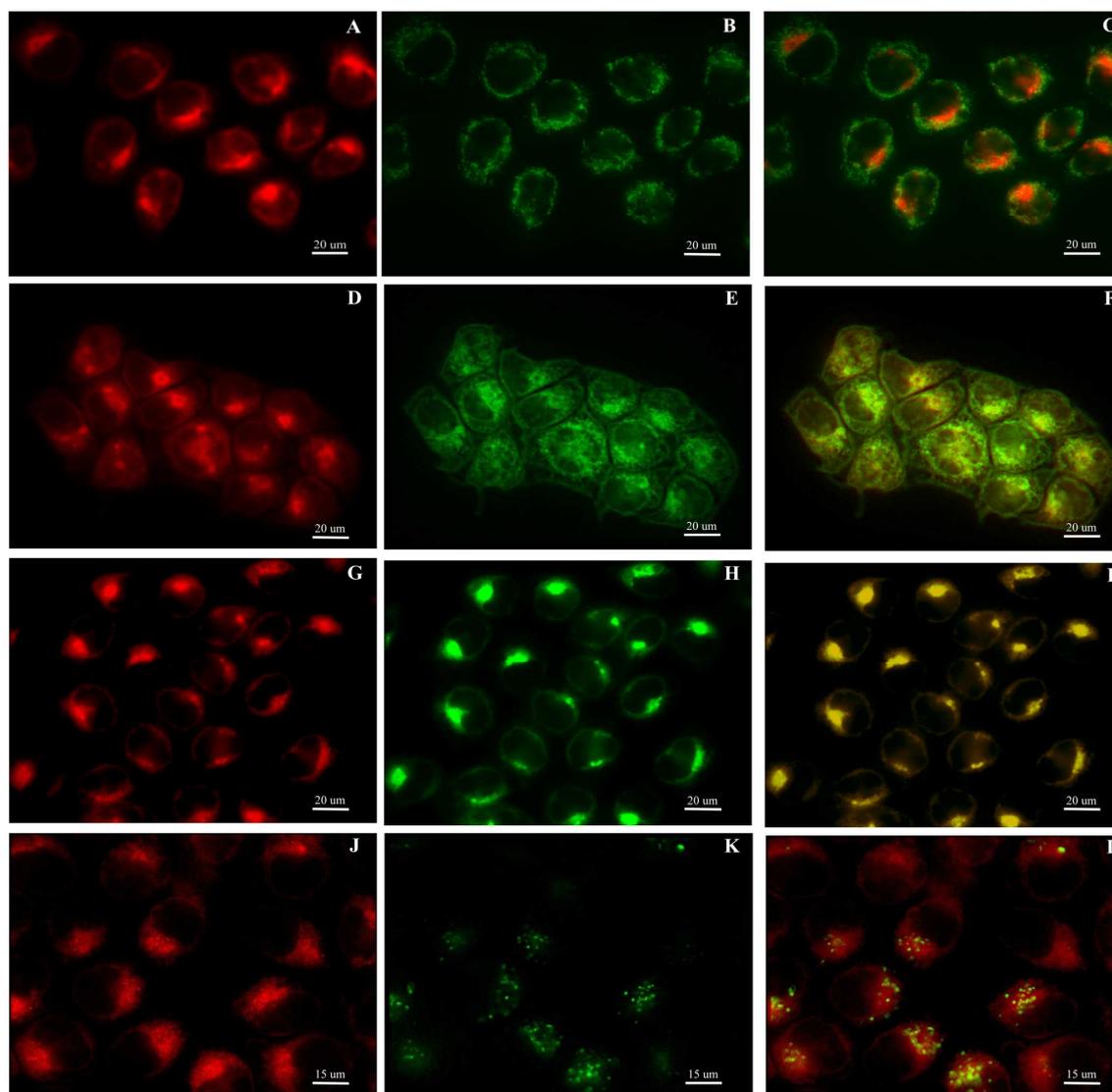


Fig. 29 Localizzazione della mTHPC ( $0.75 \mu\text{M}$ ) veicolata in nanoparticelle ORMOSIL nude in cellule KYSE 510 trattate per 24 ore. La fluorescenza rossa della mTHPC (A, D, G e J) co-localizza con la fluorescenza verde delle sonde ER-Tracker Green (E) e NBD  $\text{C}_6$ -ceramide (H), usate rispettivamente per marcare il reticolo endoplasmatico e l'apparato del Golgi, mentre non co-localizza col LysoTracker Green (K) o Rodamina 123 (B), utilizzate per marcare rispettivamente i lisosomi ed i mitocondri. Le sovrapposizioni delle immagini delle fluorescenze mTHPC-sonde sono visibili in (C), (F), (I) e (L), dove il colore giallo indica la presenza di co-localizzazione tra la clorina e la sonda usata (Compagnin et al., 2009).

La distribuzione intracellulare della mTHPC sciolta nel solvente standard non ha mostrato apprezzabili differenze rispetto a quella veicolata in nanoparticelle. Le cellule KYSE 510, al termine del trattamento di 24 ore con la mTHPC (0.75  $\mu$ M) veicolata nelle due formulazioni, presentano una fluorescenza rossa distribuita nel citoplasma e particolarmente intensa in una regione vicina al nucleo, ma perinucleare (Fig. 29, A, D, G, J). Tale fluorescenza rossa della mTHPC co-localizza (Fig. 29, F e I) con la fluorescenza verde delle sonde NBD C<sub>6</sub>-ceramide (Fig. 29, H) e ER-Tracker Green (Fig. 29, E), suggerendo quindi una localizzazione preferenziale della mTHPC nell'apparato del Golgi e nel reticolo endoplasmatico. Al contrario, la fluorescenza della clorina non co-localizza (Fig. 29, C e L) con la fluorescenza della R123 (Fig. 29, B) e del LysoTracker Green (Fig. 29, K), usate rispettivamente come sonde dei mitocondri e dei lisosomi. La distribuzione della mTHPC nell'apparato del Golgi e nel reticolo endoplasmatico è molto rapida poiché una simile distribuzione della fluorescenza è stata osservata già dopo 0.5 e 2 ore di incubazione a 37°C (Fig. 30, A, B). In cellule trattate per 24 ore con la mTHPC sciolta nel solvente standard o incorporata in nanoparticelle nude, ed incubate per altre 24 ore in terreno completo privo della clorina (Fig. 30, D), la localizzazione subcellulare sostanzialmente non cambia rispetto a quella che si ha allo scadere delle 24 ore di trattamento (Fig. 30, C).

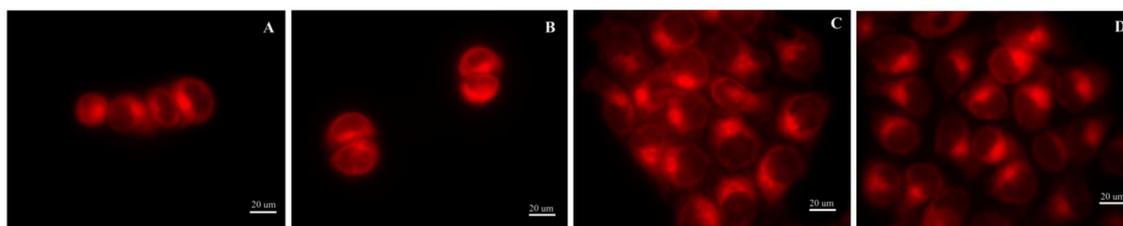


Fig. 30 Localizzazione della mTHPC (0.75  $\mu$ M) veicolata in nanoparticelle ORMOSIL nude in cellule KYSE 510 in funzione del tempo di incubazione a 37°C. La distribuzione della fluorescenza intracellulare della mTHPC è stata osservata a 0.5 (A), 2 (B) e 24 ore (C) di incubazione e a 24 ore seguite da ulteriori 24 ore nel mezzo di coltura completo privo di mTHPC (D) (Compagnin et al., 2009).

## 5.6 MECCANISMO DI INTERNALIZZAZIONE CELLULARE DELLA mTHPC

Studi sul meccanismo di internalizzazione cellulare della mTHPC, veicolata nel solvente standard o incorporata non covalentemente in nanoparticelle nude, sono stati condotti effettuando i trattamenti a basse temperature, poiché a 4°C si verifica un'inibizione dell'endocitosi. Le cellule KYSE 510 sono state osservate col microscopio a fluorescenza al termine di 2 ore di trattamento a 4°C, e confrontate con cellule trattate parallelamente a 37°C. L'immagine relativa alla fluorescenza (Fig. 31, B) dimostra che il meccanismo di internalizzazione della mTHPC è endocitotico, per entrambe le modalità di veicolazione utilizzate; infatti la fluorescenza rossa tipica della clorina non è rilevabile a livello intracellulare nei campioni incubati a bassa

temperatura. Questo risultato è stato confermato valutando l'accumulo della clorina in cellule trattate per 2 ore a 4°C e 37°C, mediante quantificazione allo spettrofluorimetro della mTHPC nei lisati cellulari e determinazione delle pmoli di mTHPC/μg di proteine cellulari di ogni campione. La quantità di mTHPC accumulata nelle cellule dopo 2 ore a 4°C è stata calcolata come percentuale rispetto alla quantità internalizzata dopo 2 ore di trattamento a 37°C (100%). Dal grafico (Fig. 31, A) si può notare come l'incubazione a 4°C riduca l'internalizzazione della mTHPC di circa l'80%, per entrambe le modalità di veicolazione utilizzate, a conferma dei risultati ottenuti con la microscopia di fluorescenza.

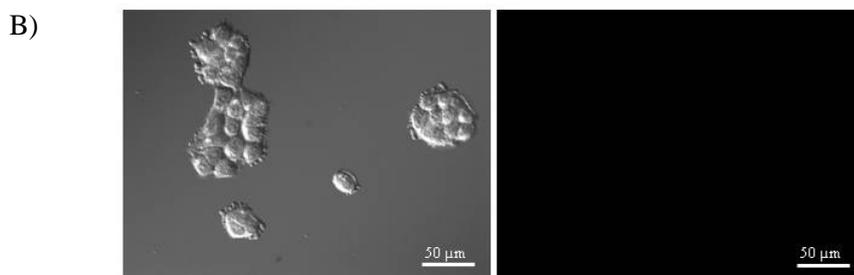
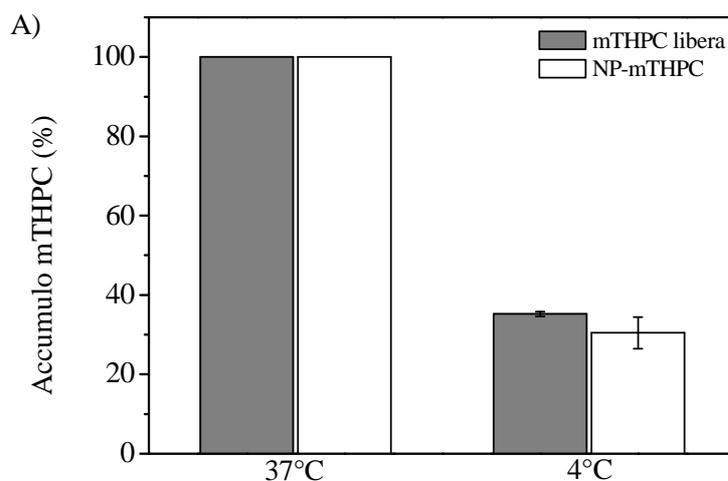


Fig. 31 Accumulo della mTHPC in cellule KYSE 510 dopo 2 ore di incubazione a 4°C. Nell'istogramma in (A) è riportato l'accumulo cellulare della mTHPC (1 μM), veicolata nel solvente standard o in nanoparticelle ORMOSIL nude, dopo 2 ore a 4°C, come percentuale rispetto a quello dopo 2 ore a 37°C. I dati rappresentano le medie ± d.s. ( $n = 3$ ). In (B) sono visibili le immagini di microscopia, a sinistra in campo chiaro (Differential Interference Contrast) e a destra di fluorescenza, di cellule incubate per 2 ore a 4°C con la mTHPC (0.75 μM) incorporata in nanoparticelle nude. Tali immagini dimostrano l'inibizione dell'internalizzazione della mTHPC a 4°C (Compagnin et al., 2009).

## 5.7 ACCUMULO IN CELLULE KYSE 510 DELLA mTHPC NEL SOLVENTE STANDARD E INCORPORATA NON COVALENTEMENTE IN NANOPARTICELLE NUDE

Per poter verificare l'esistenza di una proporzionalità tra la dose di fotosensibilizzatore somministrato alle cellule KYSE 510 e la quantità effettivamente accumulata al loro interno, come anche un eventuale rilascio nel tempo del farmaco dalle cellule, è stata determinata la quantità di mTHPC accumulata nelle cellule, normalizzandola in base al contenuto proteico cellulare del campione analizzato. Tale esperimento è stato inoltre condotto per indagare se l'accumulo intracellulare della mTHPC fosse simile per le due diverse modalità di veicolazione utilizzate (solvente standard e nanoparticelle nude), dato che la fototossicità della mTHPC nelle cellule KYSE 510 era risultata simile per le due formulazioni (paragrafo 5.4).

La quantità di mTHPC accumulata nelle cellule KYSE 510 è stata determinata allo scadere di 24 ore di incubazione (24 h) con la mTHPC 0.5 e 1  $\mu\text{M}$  veicolata nel solvente standard ed incorporata non covalentemente in nanoparticelle nude. I dati ottenuti al termine del trattamento mostrano che la clorina nella forma libera è stata accumulata dalle cellule più efficientemente ed in quantità circa doppia rispetto a quella veicolata in nanoparticelle, nonostante per entrambe le formulazioni la quantità di mTHPC accumulata nelle cellule sia direttamente proporzionale alla concentrazione usata nel trattamento (Tab. 2).

mTHPC		24 h			24 + 24 h		
		pmol mTHPC	$\mu\text{g}$ proteine cellulari	pmol/ $\mu\text{g}$ proteine	pmol mTHPC	$\mu\text{g}$ proteine cellulari	pmol/ $\mu\text{g}$ proteine
libera	0.5 $\mu\text{M}$	37 $\pm$ 1	130 $\pm$ 13	0.29 $\pm$ 0.03	38 $\pm$ 3	354 $\pm$ 22	0.11 $\pm$ 0.01
	1 $\mu\text{M}$	110 $\pm$ 12	138 $\pm$ 11	0.80 $\pm$ 0.09	105 $\pm$ 4	364 $\pm$ 24	0.29 $\pm$ 0.01
NP	0.5 $\mu\text{M}$	21 $\pm$ 1*	137 $\pm$ 19	0.15 $\pm$ 0.01*	21 $\pm$ 3*	385 $\pm$ 12	0.05 $\pm$ 0*
	1 $\mu\text{M}$	49 $\pm$ 3*	134 $\pm$ 17	0.37 $\pm$ 0.03*	49 $\pm$ 3*	380 $\pm$ 28	0.13 $\pm$ 0*

Tab. 2 Accumulo in cellule KYSE 510 della mTHPC 0.5 e 1  $\mu\text{M}$ , veicolata nella forma libera (solvente standard) o incorporata in nanoparticelle ORMOSIL nude. L'accumulo è stato valutato dopo 24 ore di trattamento a 37°C in terreno contenente la mTHPC ed il 3% di FBS (24 h) ed è stato espresso come pmoli totali di mTHPC recuperata dai campioni e come pmoli di mTHPC/ $\mu\text{g}$  di proteine cellulari. L'eventuale fuoriuscita della clorina dalle cellule è stata determinata eliminando la soluzione di trattamento e ponendo le cellule in terreno completo privo della mTHPC per altre 24 ore (24 + 24 h). I dati rappresentano le medie  $\pm$  d.s. ( $n = 6$ ). \*:  $p < 0.001$  rispetto alle cellule trattate con la mTHPC nella forma libera alla stessa concentrazione, *t*-test (Compagnin et al., 2009).

Per entrambe le modalità di veicolazione, la quantità di mTHPC accumulatasi non viene rilasciata incubando poi le cellule per ulteriori 24 ore in terreno completo privo della mTHPC (24 + 24 h). E' possibile notare in Tab. 2 che, alle 24 + 24 h, le pmoli di mTHPC/ $\mu\text{g}$  di proteine cellulari sono ridotte di circa il 50% rispetto ai rispettivi valori delle 24 h. Questa differenza non è indice di un rilascio della clorina dalle cellule, bensì di un incremento del numero di cellule presenti nei campioni, essendo il tempo di duplicazione di tali cellule circa di 24 ore. Ciò è confermato, infatti, dall'aumento del contenuto di proteine/campione ( $\mu\text{g}$  di proteine cellulari) alle 24 + 24 h, rispetto alle 24 h, e dal fatto che la quantità di mTHPC recuperata dai campioni cellulari (pmol mTHPC) sia simile per le 24 h e le 24 + 24 h. Pertanto le cellule, duplicandosi, si spartiscono la quantità di clorina internalizzata, senza rilasciarla nel terreno di coltura cellulare.

La mTHPC veicolata in nanoparticelle nude, pur accumulandosi nelle cellule in minor quantità rispetto a quella veicolata in forma libera, possiede, rispetto ad essa, un'efficienza fotocitotossica simile, probabilmente a causa di fenomeni di aggregazione a cui è soggetta la mTHPC nella forma libera.

## 5.8 PRODUZIONE DI OSSIGENO DI SINGOLETTO

La produzione di ossigeno di singoletto da parte della mTHPC, libera o incorporata non covalentemente in nanoparticelle ORMOSIL nude, è stata determinata in diversi solventi, misurando la fotodegradazione nel tempo dell'ADPA irradiato e calcolando le costanti cinetiche di questa fotodegradazione (Tab. 3). Tali costanti in etanolo/acqua (1:1, v/v) non sono significativamente diverse tra la clorina sciolta nel solvente standard e quella incorporata in nanoparticelle nude e, come atteso dai tempi di emivita dell'ossigeno di singoletto, risultano maggiori rispetto a quelle ottenute in acqua o in PBS addizionato di siero.

Solvente	mTHPC stock	$k \cdot 10^2 \pm \text{d. s. (min}^{-1}\text{)}$
etanolo/acqua (1:1, v/v)	Solvente standard	$5.64 \pm 1.42$
	Nanoparticelle	$5.47 \pm 0.45$
PBS + 3% FBS	Solvente standard	$1.78 \pm 0.12$
	Nanoparticelle	$2.13 \pm 0.77$
acqua	Nanoparticelle	$1.42 \pm 0.32$

Tab. 3 Costanti cinetiche (k) della fotodegradazione dell'ADPA (20  $\mu\text{M}$ ) irradiato con luce rossa (50  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) in presenza della mTHPC (1  $\mu\text{M}$ ), sciolta nel solvente standard o incorporata non covalentemente in nanoparticelle ORMOSIL nude. Le cinetiche sono state misurate in differenti solventi, andando a registrare la diminuzione di assorbanza dell'ADPA a 378 nm. I dati rappresentano le medie  $\pm$  d.s. ( $n = 3$ ) (Compagnin et al., 2009).

I valori di assorbanza letti a 378 nm, relativi all'ADPA, diminuiscono notevolmente nel tempo fino alla totale scomparsa dopo 30 minuti di irradiazione. A tale tempo nella soluzione irradiata si trova solo lo spettro di assorbimento tipico della mTHPC, dimostrando quindi che tutto l'ADPA è stato convertito in endoperossido dall'ossigeno di singoletto prodotto dalla clorina, e che quest'ultima non ha subito fotodegradazione, dato che il picco di assorbimento a 650 nm rimane inalterato nel tempo (dati non mostrati). Analogamente, le costanti cinetiche in PBS contenente il 3% di FBS sono molto simili tra la clorina in forma libera e quella veicolata in nanoparticelle nude, ma sono leggermente più alte rispetto a quelle ottenute in acqua. Come controllo è stata irradiata con luce rossa anche una soluzione di ADPA (20  $\mu\text{M}$ ) in acqua/etanolo (1:1, v/v), priva della clorina. In tale soluzione l'assorbanza dell'ADPA non è diminuita significativamente nel tempo indicando che la degradazione, che si ha nei campioni, è provocata esclusivamente dall'ossigeno di singoletto generato dalla mTHPC.

## 5.9 PHOTBLEACHING DELLA mTHPC NEL SOLVENTE STANDARD E INCORPORATA NON COVALENTEMENTE IN NANOPARTICELLE NUDE

Per poter spiegare la parità di efficacia fotodinamica della mTHPC, veicolata nel solvente standard ed in nanoparticelle nude, nonostante il differente accumulo intracellulare della mTHPC tra le due diverse modalità di veicolazione (paragrafi 5.4 e 5.7), è stata studiata la fotostabilità della mTHPC, esposta ad irradiazione, tramite degli esperimenti di photobleaching, verificando se il diverso sistema di *delivery* incidesse o meno sulla velocità di fotodegradazione del PS.

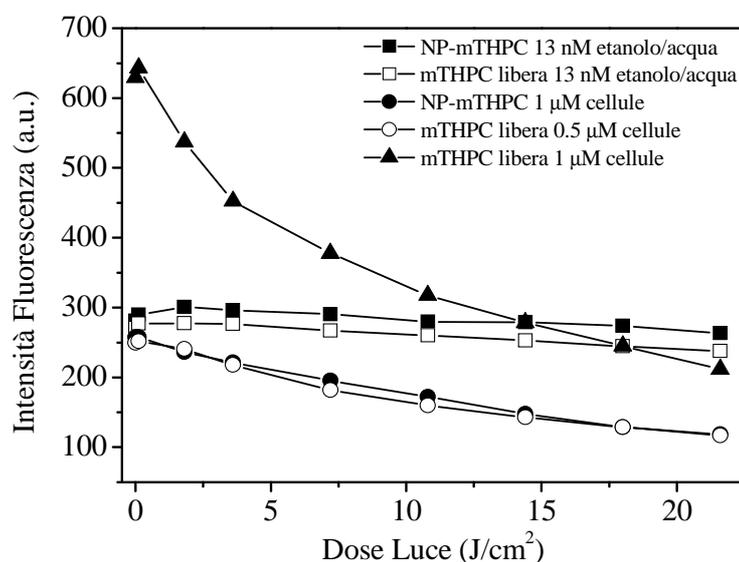


Fig. 32 Curve di fotodegradazione della mTHPC, veicolata nel solvente standard e incorporata in nanoparticelle ORMOSIL nude, ad intervalli costanti di tempo durante l'irradiazione con luce rossa (6 mW/cm<sup>2</sup>). Il photobleaching è stato valutato sia in acqua/etanolo (1:1, v/v) che in una sospensione di cellule KYSE 510 trattate per 24 ore con il fotosensibilizzatore, andando ad effettuare delle letture dell'intensità di fluorescenza emessa a 652 nm, dopo eccitazione a 420 nm.

E' stata quindi monitorata l'emissione di fluorescenza della clorina, dopo eccitazione a 420 nm, in una sospensione di cellule KYSE 510 irradiate con luce rossa dopo 24 ore di trattamento con la mTHPC, veicolata nelle due diverse formulazioni (solvente standard e nanoparticelle nude).

In Fig. 32 si può notare come si abbia una conferma dei risultati relativi all'accumulo (paragrafo 5.7), poiché per avere la stessa intensità di emissione di fluorescenza tra mTHPC, veicolata nel solvente standard ed incorporata in nanoparticelle, bisogna porsi nelle condizioni sperimentali per cui la concentrazione di clorina somministrata alle cellule veicolata in nanoparticelle sia doppia (1  $\mu\text{M}$ ) rispetto alla molecola in forma libera (0.5  $\mu\text{M}$ ). La clorina nelle due modalità di veicolazione presenta la medesima velocità ed entità di fotodegradazione, dimostrando che l'incorporazione in nanoparticelle non sembra avere nessuna influenza sulla sua fotostabilità. L'esperimento è stato condotto anche irradiando la mTHPC (13 nM) in una soluzione di acqua/etanolo (1:1, v/v). In tale solvente il fotosensibilizzatore non si fotodegrada, probabilmente trovandosi in un ambiente protettivo. Tale risultato concorda con quello ottenuto dall'esperimento condotto per determinare la produzione di ossigeno di singoletto (paragrafo 5.8), nel quale il segnale di assorbanza a 650 nm, relativo alla clorina, rimaneva costante anche dopo irradiazione.

## **5.10 RILASCIO DELLA mTHPC DALLE NANOPARTICELLE NUDE**

Data la somiglianza di molti risultati ottenuti con la mTHPC incapsulata in nanoparticelle nude o sciolta nel solvente standard, in particolare relativamente alla distribuzione subcellulare ed alla fotocitotossicità, è stata perciò presa in considerazione la possibilità che il fotosensibilizzatore potesse essere rilasciato dalle nanoparticelle in seguito al suo trasferimento ad altre entità biologiche presenti nel terreno di coltura cellulare, quali proteine del siero, prima ancora dell'accumulo intracellulare. La mTHPC si trova, infatti, intrappolata solo fisicamente nelle nanoparticelle, grazie all'idrofobicità del loro ambiente interno. Se i pori della matrice silanica della nanoparticella sono sufficientemente grandi da permettere il passaggio della clorina, essa può pertanto essere rilasciata dal nanoveicolo. Per studiare questo eventuale rilascio sono stati utilizzati due metodi: 1) esperimenti di FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), e 2) esperimenti di ultracentrifugazione.

### **5.10.1 Esperimenti di FRET**

Per gli esperimenti di FRET sono state sintetizzate nanoparticelle ORMOSIL caricate non covalentemente con la mTHPC (donatore) e con un derivato di una cianina (IR775-Sil) covalentemente legato alla matrice della nanoparticella (accettore). Lo spettro di assorbimento dell'IR775-Sil presenta un'ampia banda centrata a 627 nm, che si sovrappone ampiamente con l'emissione della mTHPC. Conseguentemente, quando la clorina ed il derivato della cianina si trovano confinati nel piccolo volume delle

nanoparticelle, ossia ad una distanza nanometrica (2-6 nm), può avvenire FRET tra essi. Ciò è stato confermato dagli spettri di eccitazione di fluorescenza di nanoparticelle caricate con la mTHPC e IR775-Sil, registrati a 760 nm in soluzione acquosa. L'emissione massima di fluorescenza dell'IR775-Sil si ha a 738 nm, ma la sua emissione è stata monitorata a 760 nm per escludere ogni possibile contributo da parte della fluorescenza della mTHPC. La presenza nello spettro di eccitazione delle bande di assorbimento tipiche della clorina indica che è avvenuto un processo di FRET, come atteso quando le due specie si trovano in stretta prossimità (Fig. 33, spettro a). Tale spettro di eccitazione in soluzione acquosa non si modifica per molti giorni, ma l'aggiunta di etanolo assoluto all'acqua (50:50, v/v) causa la rapida scomparsa delle bande della mTHPC (Fig. 33, spettro b), dimostrando così l'immediato rilascio della clorina dalle nanoparticelle in seguito ad aggiunta di etanolo.

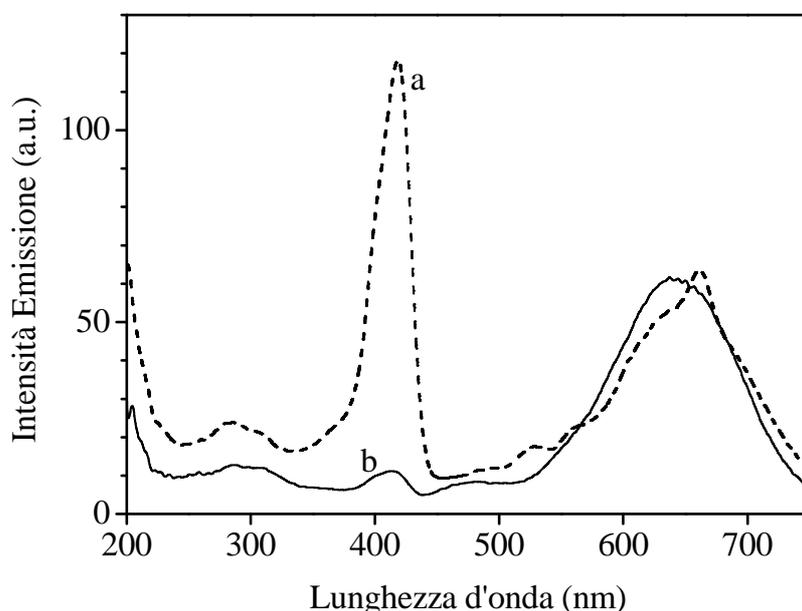


Fig. 33 Spettri di eccitazione di nanoparticelle ORMOSIL nude caricate non covalentemente con la mTHPC e covalentemente con IR775-Sil. Gli spettri sono stati registrati in acqua ((a), linea tratteggiata) ed in acqua/etanolo (1:1, v/v) ((b), linea continua). Condizioni: [mTHPC] = 0.8  $\mu$ M, [IR775-Sil] = 1.6  $\mu$ M,  $\lambda_{em}$  = 760 nm, 37 °C (Compagnin et al., 2009).

Risultati analoghi sono stati ottenuti diluendo le nanoparticelle in terreno di coltura cellulare contenente il 3% di FBS. E' stata osservata, infatti, una progressiva diminuzione della banda della mTHPC nello spettro di eccitazione, indicando il graduale rilascio della clorina dalle nanoparticelle nude. Il rilascio completo è stato osservato dopo 30 minuti di incubazione a 37°C (Fig. 36 al paragrafo 5.13). Questi spettri sono stati analizzati anche in sospensioni di cellule KYSE 510 incubate con nanoparticelle nude caricate con la mTHPC e IR775-Sil. In questi casi è stata osservata solamente l'emissione di fluorescenza della clorina a 652 nm, ma non quella a 738 nm

tipica del derivato della cianina, dimostrando pertanto che l'accumulo intracellulare della mTHPC è avvenuto solo in seguito al suo rilascio dalle nanoparticelle nude (dati non mostrati).

### 5.10.2 Esperimenti di ultracentrifugazione

Per confermare i risultati ottenuti con gli esperimenti di FRET, sono stati condotti anche degli esperimenti di ultracentrifugazione con nanoparticelle ORMOSIL nude caricate non covalentemente con la mTHPC, disciolte in acqua e nel terreno di coltura cellulare RPMI addizionato di FBS. Gli spettri UV-visibili dei surnatanti, ottenuti dopo ultracentrifugazione delle soluzioni di nanoparticelle, sono stati confrontati con quelli registrati prima dell'ultracentrifugazione. Il campione di riferimento per tali esperimenti di ultracentrifugazione è costituito da nanoparticelle nude caricate non covalentemente con la mTHPC in soluzione acquosa, dal momento che le nanoparticelle in terreno di coltura privo di siero tendono ad aggregare e precipitare a causa della presenza di sali. Dopo ultracentrifugazione di queste nanoparticelle in acqua solo una minima frazione (circa il 13%) della clorina è stata ritrovata nel surnatante (Tab. 4). Questa piccola percentuale di sostanza nel surnatante è dovuta ad una sedimentazione incompleta delle nanoparticelle nude nelle condizioni di ultracentrifugazione utilizzate.

Mezzo	Tempo di incubazione a 37°C (h)	Assorbanza mTHPC a 420 nm		Assorbanza residua (%)
		prima	dopo	
acqua	-	0.267	0.034	13
RPMI + 3% FBS	0	0.252	0.133	53
	5	0.225	0.173	77
	24	0.220	0.165	75

Tab. 4 Rilascio della mTHPC dalle nanoparticelle ORMOSIL nude incubate per diversi tempi a 37°C in terreno di coltura cellulare (RPMI) contenente il 3% di FBS. Il rilascio è stato determinato mediante ultracentrifugazione (1 h, 100000 x g) dei campioni e misurazioni dell'assorbanza della mTHPC nel surnatante. I valori di assorbanza sono stati confrontati con quelli registrati prima dell'ultracentrifugazione ed utilizzati per determinare l'assorbanza residua come parametro correlato alla frazione di mTHPC rilasciata dalle nanoparticelle. I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti che hanno mostrato risultati simili (Compagnin et al., 2009).

Come osservato in esperimenti di controllo condotti in terreno contenente siero e nanoparticelle nude caricate covalentemente con una porfirina queste condizioni di ultracentrifugazione permettono una quasi completa sedimentazione delle nanoparticelle, evitando la sedimentazione delle proteine; un aumento del tempo o della velocità di centrifugazione non sono applicabili in quanto provocherebbero una sedimentazione delle proteine del siero. Dall'analisi dei campioni di nanoparticelle

incubate nel terreno di coltura cellulare contenente il 3% di FBS, ed ultracentrifugati, è risultato che, mentre la maggior parte delle nanoparticelle si ritrova sedimentata, la mTHPC si trova nel surnatante, contenente le proteine del siero, in quantità crescente all'aumentare del tempo di incubazione a 37°C del campione (Tab. 4). Tali risultati confermano il rilascio della clorina dalle nanoparticelle nude in seguito ad interazione con proteine del siero.

### 5.11 CINETICHE DI MONOMERIZZAZIONE DELLA mTHPC

Il ridotto accumulo in cellule KYSE 510 della mTHPC veicolata in nanoparticelle nude rispetto a quella nella forma libera potrebbe essere spiegato da fenomeni di aggregazione del fotosensibilizzatore, dovuti ad interazione con proteine del siero. Per questo motivo sono state analizzate le cinetiche di monomerizzazione della clorina nel terreno di coltura cellulare. Il legame della mTHPC a proteine del siero risulta nella parziale conversione da aggregati a monomeri (Sasnouski et al., 2005). Poiché è noto che solamente i monomeri sono fluorescenti, i processi di disaggregazione possono essere monitorati misurando la fluorescenza emessa dai campioni. Infatti, quando la mTHPC nel solvente standard è stata diluita alla concentrazione 1  $\mu\text{M}$  in terreno di coltura contenente il 3% di FBS, è stato osservato un rapido aumento dell'intensità di fluorescenza a 37°C.

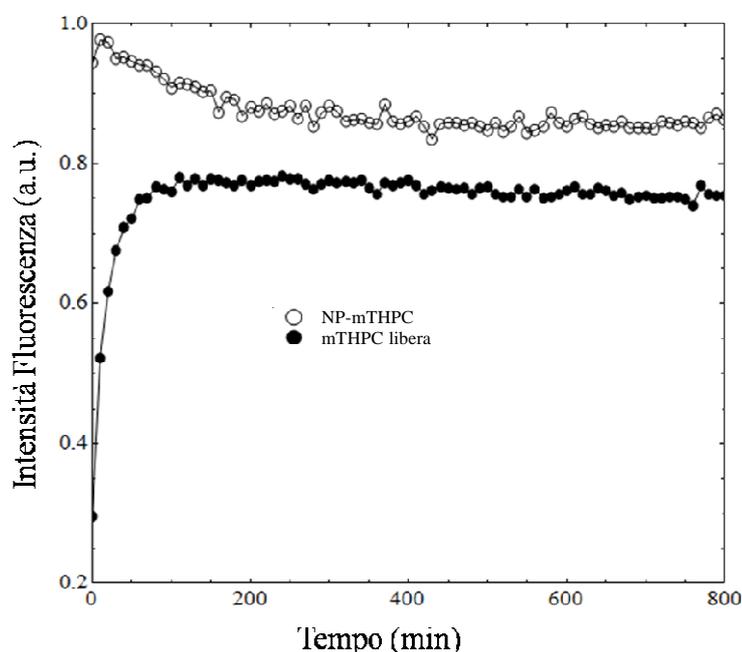


Fig. 34 Emissione di fluorescenza della mTHPC 1  $\mu\text{M}$  a 652 nm, dopo diluizione in terreno di coltura RPMI contenente il 3% di FBS e prima dell'aggiunta di Triton X-100. La mTHPC, veicolata nel solvente standard e incorporata non covalentemente in nanoparticelle ORMOSIL nude, è stata diluita in RPMI contenente siero ed incubata a 37°C. Le intensità di fluorescenza emessa sono state normalizzate all'equilibrio di intensità di emissione dopo aggiunta di Triton X-100 (Compagnin et al., 2009).

All'equilibrio l'intensità di fluorescenza è risultata comunque minore di quella misurata dopo aggiunta di Triton X-100 (che produce completa monomerizzazione della clorina), indicando la presenza del 20-25% di aggregati residui (Fig. 34). Quando invece la mTHPC incorporata non covalentemente in nanoparticelle nude è stata diluita nel terreno alla stessa concentrazione di quella sciolta nel solvente standard, è stata osservata un'immediata lieve diminuzione dell'emissione di fluorescenza (il che potrebbe indicare un ambiente meno polare per la clorina nelle nanoparticelle che nelle proteine del siero) e meno del 10% della mTHPC presente come aggregati all'equilibrio.

Tale studio ha quindi evidenziato un'aggregazione della mTHPC quando veicolata nel solvente standard.

### 5.12 NANOPARTICELLE ORMOSIL PEGilate

Gli esperimenti di FRET e di ultracentrifugazione hanno dimostrato che solventi meno polari dell'acqua e la presenza di proteine del siero causano il rapido e quasi totale rilascio della mTHPC dalle nanoparticelle ORMOSIL nude in cui è incorporata fisicamente. Per superare il problema del rilascio è stata quindi studiata una nuova strategia basata, in un primo momento, sul rivestimento superficiale delle nanoparticelle con catene di poli(etilene glicole) (PEG 2000), seguita dall'utilizzo di nanoparticelle ORMOSIL PEGilate con la clorina legata covalentemente alla matrice silanica, per evitare anche un'eventuale parziale rilascio della mTHPC dalle nanoparticelle.

Sono state quindi sintetizzate e caratterizzate nanoparticelle ORMOSIL PEGilate caricate non covalentemente con la mTHPC, utilizzando un derivato PEG-silano. Dalle analisi al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) ed al Dynamic Light Scattering (DLS) è stato osservato che esse presentano una forma sferica ed un diametro medio di  $70 \pm 9$  nm (Fig. 35). L'incorporazione della mTHPC nelle nanoparticelle è stata dimostrata attraverso gli spettri di assorbimento UV-vis e di emissione di fluorescenza della sospensione di nanoparticelle in acqua. Tali nanoparticelle sono stabili in acqua.

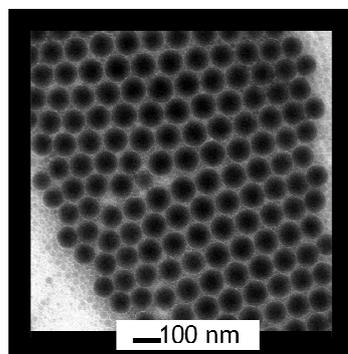


Fig. 35 Immagine al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di nanoparticelle ORMOSIL PEGilate caricate non covalentemente con la mTHPC.

Le nanoparticelle ORMOSIL PEGilate caricate covalentemente con la mTHPC sono state preparate utilizzando un derivato mTHPC-silano, che ne permette il legame alla matrice silanica costituente la nanoparticella, e presentano un diametro medio pari a quello delle nanoparticelle PEGilate con la mTHPC fisicamente intrappolata.

### 5.13 RILASCIO DELLA mTHPC DALLE NANOPARTICELLE PEGilate

Per ottenere maggiori informazioni relativamente al meccanismo di rilascio della mTHPC dalle nanoparticelle, è stato preparato un campione di nanoparticelle ORMOSIL, caricato con la mTHPC e IR775-Sil, la cui superficie è stata anche rivestita con PEG 2000.

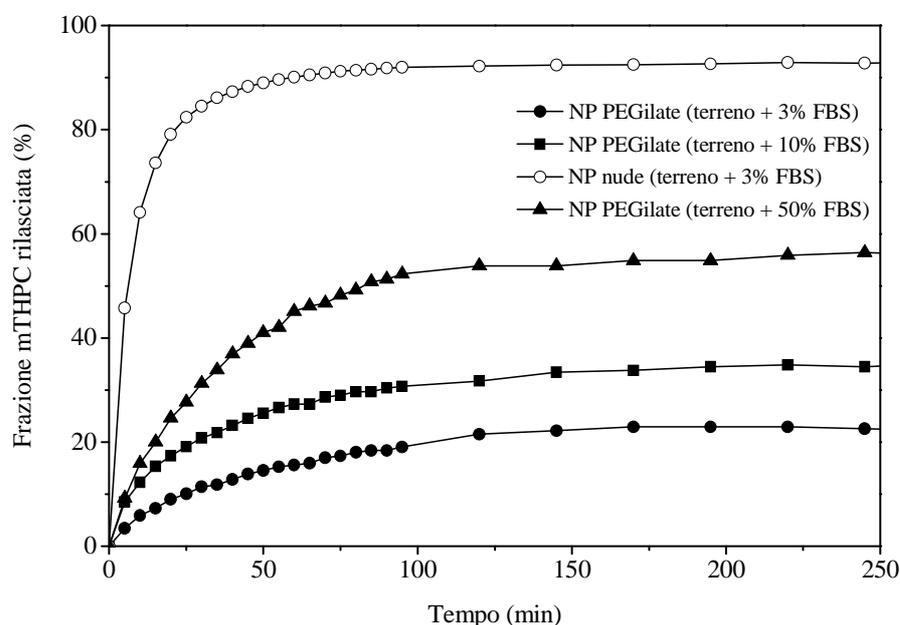


Fig. 36 Rilascio tempo-dipendente della mTHPC dalle nanoparticelle ORMOSIL nude in terreno di coltura cellulare (RPMI) contenente il 3% di FBS e PEGilate in RPMI contenente il 3%, 10%, 50% di FBS. Il rilascio è stato determinato con gli esperimenti di FRET, utilizzando nanoparticelle nude e PEGilate caricate con la clorina ed il derivato della cianina IR775-Sil. Condizioni: [mTHPC] = 0.8  $\mu$ M, [IR775-Sil] = 1.6  $\mu$ M,  $\lambda_{em}$  = 760 nm, 37 °C.

E' stato condotto un esperimento di FRET, come per le nanoparticelle nude (paragrafo 4.10.1), nel quale è stato osservato che, dopo diluizione in terreno RPMI contenente il 3% di FBS, si ha un rilascio della mTHPC dalle nanoparticelle molto inferiore (circa 20%) e molto più lento rispetto a quello osservato per le nanoparticelle non PEGilate. Il rivestimento superficiale con catene di PEG, pertanto, riduce fortemente, seppure non completamente, il rilascio della clorina dalle nanoparticelle in presenza di proteine del siero, sebbene non limiti il rilascio indotto dall'aggiunta di etanolo alla soluzione acquosa (dato non mostrato nel grafico). Questo rilascio inoltre dipende dalla

concentrazione di proteine presenti, poiché all'aumentare della percentuale di siero presente nel terreno di coltura cellulare aumenta la quantità di clorina rilasciata dalle nanoparticelle PEGilate (Fig. 36).

#### **5.14 TOSSICITA' IN CELLULE A549 E CCD-34LU DEL BRIJ35, DELLA mTHPC NEL SOLVENTE STANDARD E INCORPORATA IN NANOPARTICELLE PEGilate, E DEL NANOVEICOLO**

Gli effetti biologici indotti dal trattamento *in vitro* con nanoparticelle PEGilate, caricate e non caricate con la mTHPC, sono stati studiati nelle cellule A549, derivanti da un carcinoma polmonare, e nei fibroblasti polmonari normali CCD-34Lu. La linea A549 è stata selezionata in previsione di futuri esperimenti mirati ad aumentare la selettività della terapia antitumorale. Si prevede infatti di funzionalizzare i nanoveicoli con acido folico, i cui recettori (FR) sono poco espressi su tale linea cellulare, al contrario della linea KB che sovraesprime FR. La linea CCD-34Lu è stata scelta per confrontare i risultati con cellule umane normali.

Il tensioattivo utilizzato nella sintesi di nanoparticelle ORMOSIL PEGilate è il Brij35. La citotossicità di questo surfattante è stata valutata nelle cellule A549 e CCD-34Lu, tramite saggio MTS, in modo da poter definire la concentrazione massima non tossica utilizzabile durante il loro trattamento con nanoparticelle PEGilate.

Nei campioni cellulari di carcinoma polmonare, trattati per 24 ore col Brij35 (Fig. 37, A), la vitalità cellulare diminuisce al crescere della concentrazione di tensioattivo somministrata; tale diminuzione diventa significativa a partire dalla concentrazione 15  $\mu\text{M}$ . Nei campioni trattati per 24 ore col Brij35, ed incubati poi per altre 24 ore con terreno completo, si nota che l'induzione di mortalità è significativa già a partire dalla dose 10  $\mu\text{M}$ . Per quanto riguarda i fibroblasti (Fig. 37, B), invece, dopo 24 ore di incubazione con dosi crescenti di Brij35, si osserva una significativa diminuzione della vitalità cellulare per concentrazioni pari o superiori a 15  $\mu\text{M}$ . In campioni trattati con dosi di Brij35 che vanno da 40  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  si ha un rapido calo della vitalità, che varia dal  $65 \pm 5\%$  al  $27 \pm 4\%$  rispetto al controllo. Questa curva dose-risposta risulta simile anche 24 ore dopo il termine del trattamento e ripristino per ulteriori 24 ore con terreno completo privo di Brij35, e mostra persino un leggero recupero della vitalità cellulare rispetto ai campioni non ripristinati. Dai risultati ottenuti nelle due tipologie di cellule è possibile concludere in generale che una sospensione di nanoparticelle ORMOSIL PEGilate, vuote o caricate con la mTHPC, deve possedere, dopo il processo di ultrafiltrazione, una concentrazione residua di Brij35 tale che, in seguito a diluizione nella soluzione di trattamento cellulare, risulti inferiore a 10  $\mu\text{M}$ .

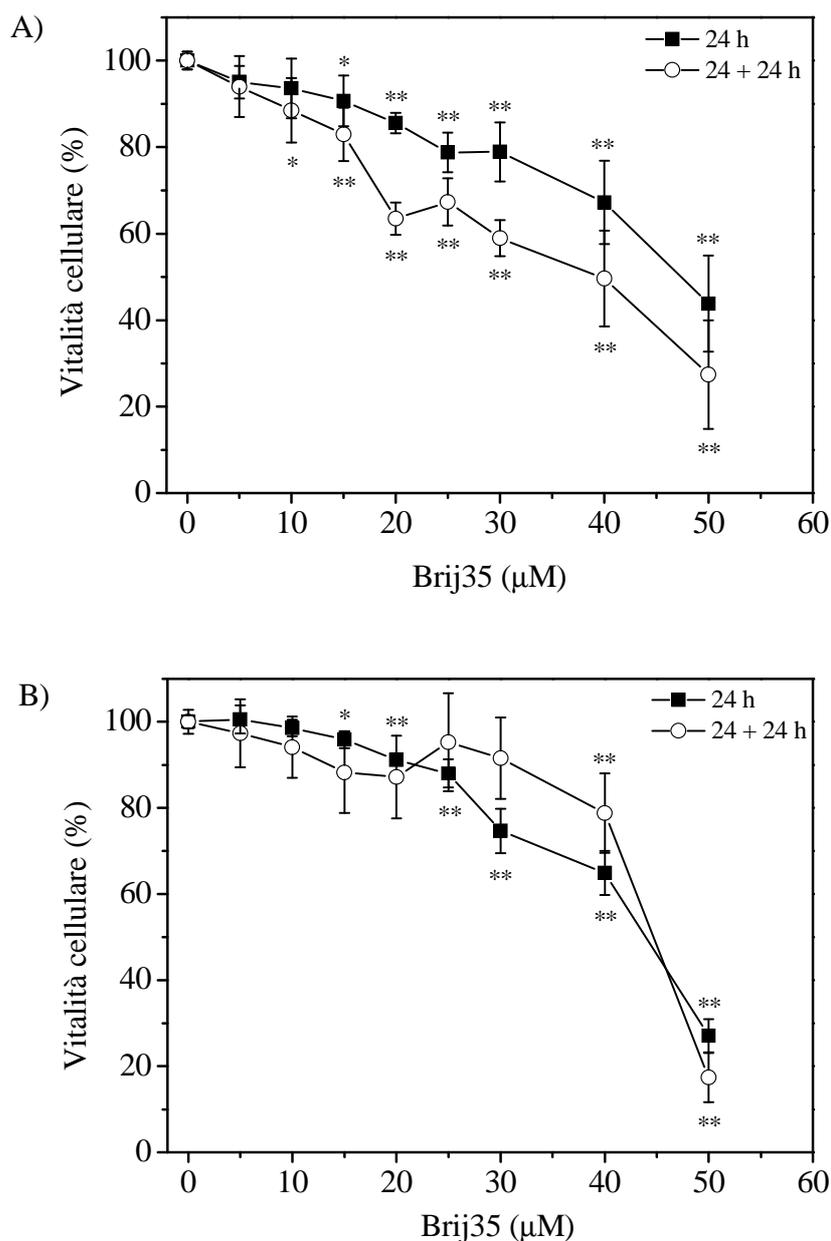


Fig. 37 Vitalità di cellule A549 (A) e CCD-34Lu (B) trattate con concentrazioni crescenti di Brij35 per 24 ore. La vitalità è stata valutata con saggio MTS al termine del trattamento (24 h) e 24 ore dopo il ripristino con terreno completo (24 + 24 h). I dati rappresentano le medie  $\pm$  d.s. ( $n = 6$ ). \*:  $p < 0.01$ , \*\*:  $p < 0.001$  rispetto alle cellule di controllo,  $t$ -test.

Il test dell'MTS è stato effettuato anche per valutare la tossicità indotta al buio dal trattamento con la mTHPC, veicolata nel solvente standard ed incorporata covalentemente e non in nanoparticelle ORMOSIL PEGilate, in cellule A549 e CCD-34Lu. In entrambe le linee cellulari si ha una diminuzione della vitalità cellulare all'aumentare della concentrazione di clorina somministrata in forma libera (solvente standard); in particolare tale induzione di mortalità diventa significativa per dosi superiori o pari a 1.75  $\mu\text{M}$  di mTHPC, che sarà pertanto la concentrazione massima utilizzabile nei successivi esperimenti di PDT *in vitro*, fino a diventare quasi completa

alla dose 5  $\mu\text{M}$ . Questa citotossicità della mTHPC viene fortemente diminuita dall'incorporazione covalente e non nelle nanoparticelle PEGilate (Fig. 38 e 39).

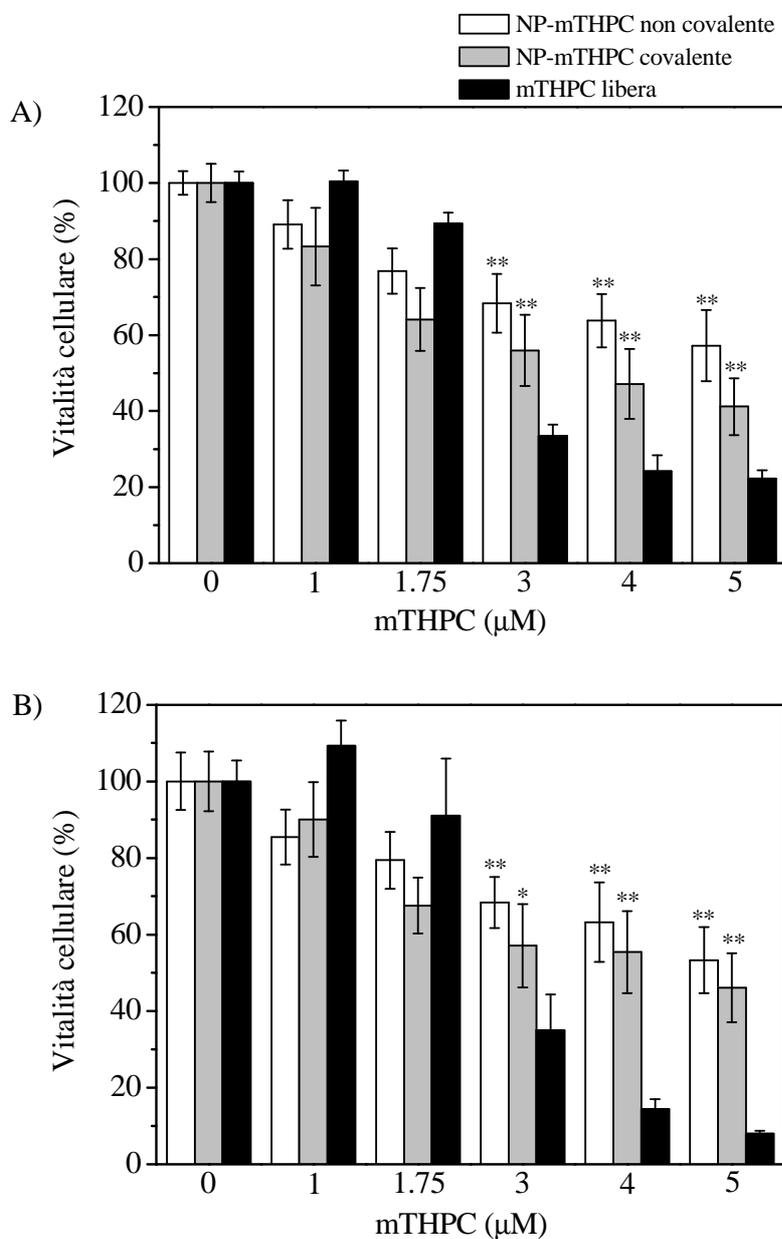


Fig. 38 Vitalità di cellule A549 trattate per 24 ore al buio con concentrazioni crescenti di mTHPC veicolata nel solvente standard o incorporata covalentemente e non in nanoparticelle ORMOSIL PEGilate. La vitalità è stata valutata con saggio MTS al termine del trattamento (24 h, A) e 24 ore dopo il ripristino in terreno completo privo di clorina (24 + 24 h, B), ed espressa come percentuale rispetto a cellule di controllo non trattate ma sottoposte agli stessi cambiamenti di terreno dei campioni trattati. I dati rappresentano le medie  $\pm$  d.s. ( $n = 6$ ). \*:  $p < 0.01$ , \*\*:  $p < 0.001$  rispetto alle cellule trattate con la mTHPC nella forma libera (solvente standard),  $t$ -test.

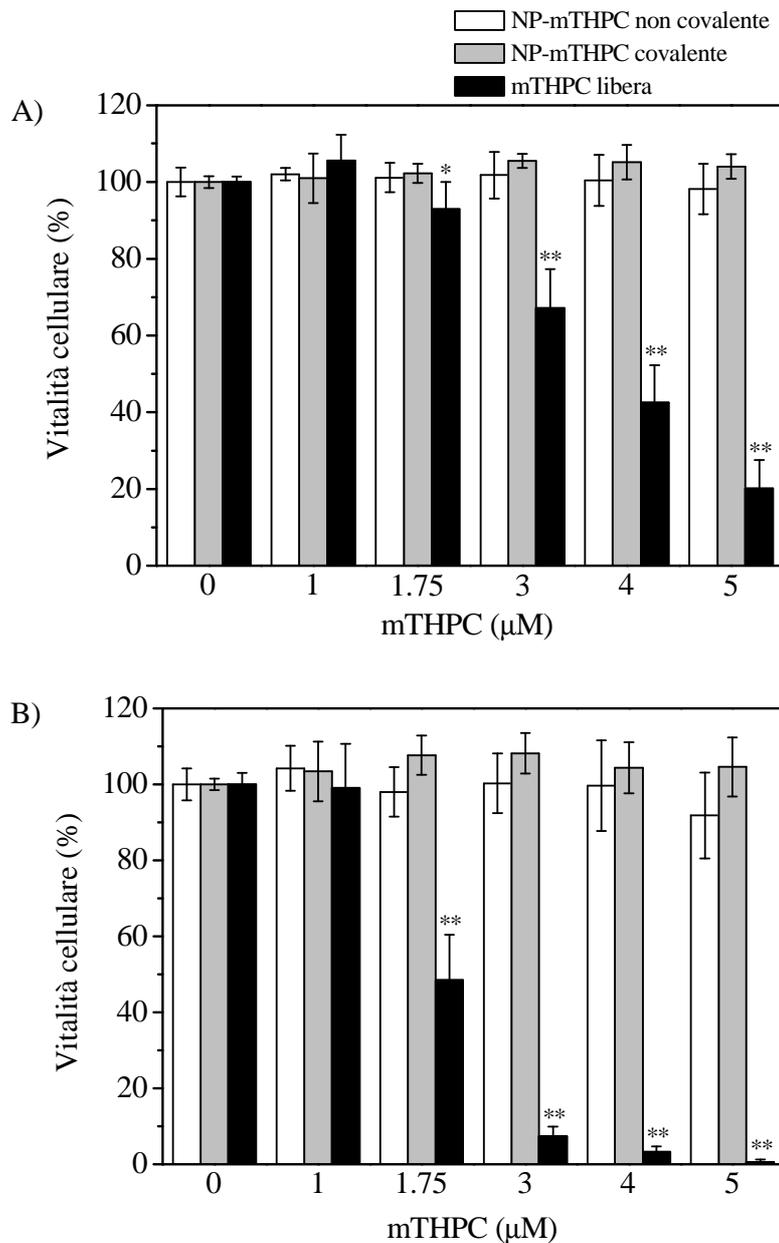


Fig. 39 Vitalità di cellule CCD-34Lu trattate per 24 ore al buio con concentrazioni crescenti di mTHPC veicolata nel solvente standard o incorporata covalentemente e non in nanoparticelle ORMOSIL PEGilate. La vitalità cellulare, espressa come percentuale rispetto a cellule di controllo non trattate ma sottoposte agli stessi cambiamenti di terreno dei campioni trattati, è stata valutata con saggio MTS al termine del trattamento (24 h, A) e 24 ore dopo il ripristino in terreno completo privo di clorina (24 + 24 h, B). I dati rappresentano le medie  $\pm$  d.s. ( $n = 6$ ). \*:  $p < 0.01$ , \*\*:  $p < 0.001$  rispetto alle cellule trattate con la mTHPC in nanoparticelle,  $t$ -test.

I risultati ottenuti con le due diverse modalità di caricamento della clorina nelle nanoparticelle non presentano in generale differenze significative tra loro in entrambe le linee cellulari. Nei fibroblasti normali, a differenza delle cellule tumorali A549, la vitalità cellulare non viene significativamente diminuita rispetto ai campioni di controllo dopo somministrazione di concentrazioni crescenti di mTHPC veicolata in nanoparticelle PEGilate, né al termine delle 24 ore di trattamento né allo scadere delle 24 ore successive in terreno completo privo di trattamento (Fig. 39). Questa differente risposta nelle due linee cellulari al trattamento al buio con la mTHPC incorporata covalentemente e non in nanoparticelle PEGilate potrebbe essere dovuta ad una diversa citotossicità del nanoveicolo non caricato col fotosensibilizzante oppure ad un diverso accumulo della clorina nelle due tipologie di cellule.

E' stata pertanto stimata, mediante saggio MTS, la citotossicità indotta dopo 24 ore di trattamento con dosi crescenti di nanoparticelle PEGilate vuote e dopo ulteriori 24 ore in terreno completo privo di nanoparticelle. I risultati ottenuti mostrano come effettivamente le cellule A549 (Fig. 40) rispondano in maniera completamente differente rispetto alle cellule CCD-34Lu (Fig. 41). In queste ultime infatti la vitalità cellulare non scende mai al di sotto di valori pari all'80%, neppure alla più alta dose di nanoparticelle somministrata, pari a 1.5 mg/ml (Fig. 41). Nelle cellule A549, invece, sia al termine del trattamento che dopo 24 ore di ripristino in terreno completo, si ha una significativa diminuzione della vitalità cellulare già a partire dalla più bassa dose somministrata, pari a 0.1 mg/ml. La vitalità delle cellule A549 diminuisce poi all'aumentare della concentrazione di nanoparticelle presenti nel trattamento, fino a stabilizzarsi intorno al 40% e 30%, rispettivamente per le 24 h e le 24 + 24 h, dalla dose 1 mg/ml alla 1.5 mg/ml. Questa diversa tossicità delle nanoparticelle vuote PEGilate tra le cellule di carcinoma polmonare ed i fibroblasti polmonari dà una possibile spiegazione alla differente risposta al trattamento al buio con la mTHPC incorporata covalentemente e non in nanoparticelle PEGilate. Parte della diminuzione di vitalità delle cellule A549, in seguito ad incubazione con nanoparticelle PEGilate caricate con la mTHPC, può essere correlata alla citotossicità indotta dal nanoveicolo non caricato. Una dose di nanoparticelle vuote pari 0.25 mg/ml coincide circa con la quella presente nel trattamento con nanoparticelle PEGilate caricate con la mTHPC in concentrazione 1.5  $\mu$ M.

Per alcuni campioni la vitalità cellulare è stata valutata col saggio MTS anche 24 ore dopo irradiazione con luce rossa (0.24 J/cm<sup>2</sup>), effettuato al termine delle 24 ore di trattamento con le nanoparticelle PEGilate vuote. I risultati ottenuti (dati non mostrati) hanno dimostrato che la citotossicità dopo PDT non aumenta rispetto a quella indotta al buio.

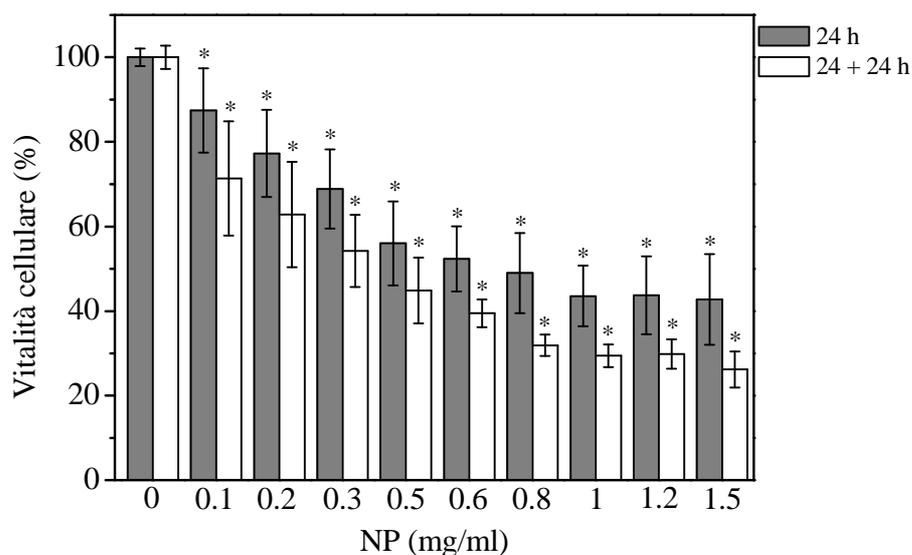


Fig. 40 Vitalità di cellule A549 incubate con concentrazioni crescenti di nanoparticelle ORMOSIL vuote PEGilate, non sottoposte ad irradiazione. Il saggio MTS è stato condotto al termine delle 24 ore di trattamento (24 h) e dopo successive 24 ore di incubazione in terreno completo (24 + 24 h). I dati rappresentano le medie  $\pm$  d.s. ( $n = 12$ ). \*:  $p < 0.001$  rispetto alle cellule di controllo,  $t$ -test.

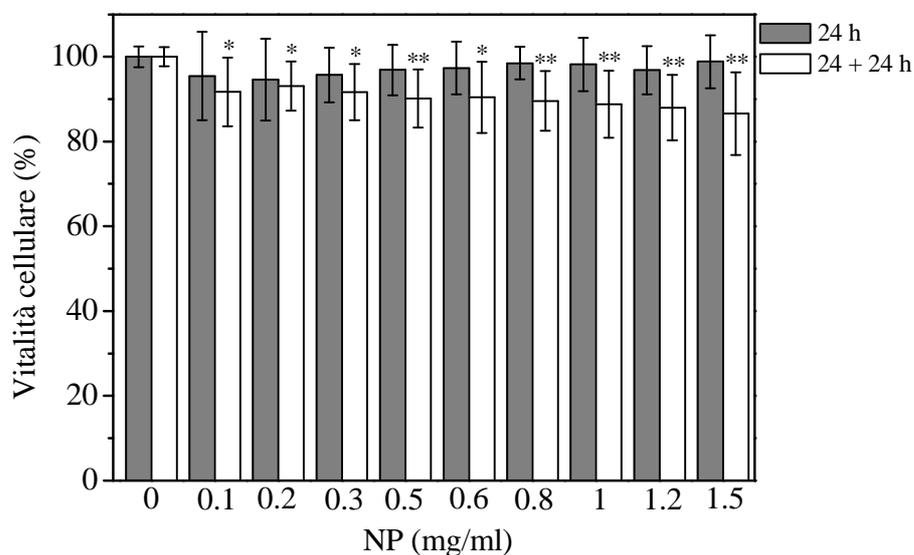


Fig. 41 Vitalità di cellule CCD-34Lu trattate al buio con dosi crescenti di nanoparticelle ORMOSIL vuote PEGilate. Il saggio MTS è stato condotto al termine delle 24 ore di trattamento (24 h) e dopo successive 24 ore di incubazione in terreno completo (24 + 24 h). I dati rappresentano le medie  $\pm$  d.s. ( $n = 9$ ). \*:  $p < 0.01$ , \*\*:  $p < 0.001$  rispetto alle cellule di controllo,  $t$ -test.

## 5.15 PRODUZIONE DI ROS IN CELLULE A549 E CCD-34LU ESPOSTE A NANOPARTICELLE VUOTE PEGilate

Vista la diversa citotossicità indotta dalle nanoparticelle PEGilate vuote nelle due diverse linee cellulari utilizzate, è stata analizzata la produzione di ROS nei due tipi di cellule dopo vari tempi di incubazione con nanoparticelle. La quantità di specie reattive dell'ossigeno prodotte è stata determinata in campioni trattati per 5 e 24 ore con nanoparticelle ORMOSIL PEGilate vuote alle concentrazioni 0.1 e 0.5 mg/ml, mediante analisi citofluorimetrica, utilizzando la sonda Carbossi-H<sub>2</sub>DCFDA.

A)

CAMPIONI	Fluorescenza media (Incremento sul controllo con sonda)		
	5 h	24 h	24 + 24 h
	Controllo (con sonda)	50	62
0.1 mg NP/ml	45 (+ 0)	80 (+ 18)	50 (+ 27)
0.5 mg NP/ml	48 (+ 0)	130 (+ 68)	103 (+ 80)

B)

CAMPIONI	Fluorescenza media (Incremento sul controllo con sonda)		
	5 h	24 h	24 + 24 h
	Controllo (con sonda)	899	827
0.1 mg NP/ml	854 (+ 0)	880 (+ 53)	263 (+ 21)
0.5 mg NP/ml	1076 (+ 177)	1425 (+ 598)	360 (+ 118)

Tab. 5 Valori relativi alla fluorescenza media emessa dalla sonda Carbossi-H<sub>2</sub>DCFDA in vari campioni di cellule A549 (A) e CCD-34Lu (B), a diversi tempi di incubazione. In rosso sono riportati i valori relativi all'incremento di fluorescenza sul controllo incubato con la sonda. L'analisi al citofluorimetro per la valutazione della produzione di ROS è stata condotta al termine di 5 e 24 ore di trattamento (5 h, 24 h) e dopo successive 24 ore di incubazione in terreno completo (24 + 24 h). I dati sono rappresentativi di 2 esperimenti che hanno mostrato risultati simili.

Come controllo negativo sono state considerate cellule non trattate e non incubate con la sonda, il cui valore medio di fluorescenza è stato sottratto come fondo da tutti i campioni analizzati, e cellule non trattate ma incubate con la sonda, il cui segnale di fluorescenza è indice della produzione basale di ROS. In Tab. 5 è possibile osservare che i fibroblasti CCD-34Lu (Tab. 5, B) possiedono un segnale di produzione basale di ROS molto elevato rispetto alle cellule tumorali A549 (Tab. 5, A). Ad esempio, dopo 5 ore di incubazione in terreno contenente il 3% di FBS (5 h) il segnale medio di fluorescenza emessa dalla sonda è pari a 50 nelle cellule di controllo A549, mentre è pari a 899 nelle cellule CCD-34Lu. In tutti i casi di trattamento considerati, i campioni non mostrano un incremento di segnale di fluorescenza da considerarsi significativo rispetto a cellule di controllo. Per entrambe le linee comunque una lieve produzione di ROS si nota al termine di 24 ore di incubazione con la dose 0.5 mg di nanoparticelle/ml. Tale incremento si mantiene come tale nelle 24 ore successive di ripristino con terreno completo (24 + 24 h) nelle cellule A549, mentre diminuisce, tendendo a ritornare ai valori basali, nelle cellule CCD-34Lu. Questo risultato, insieme all'elevata produzione endogena di ROS nei fibroblasti CCD-34Lu, suggerisce che la differente risposta delle due linee cellulari al trattamento con NP PEGilate vuote (paragrafo 5.14) potrebbe dipendere dalla presenza nei fibroblasti di efficienti sistemi di protezione dallo stress ossidativo.

#### **5.16 FOTOTOSSICITA' NELLE CELLULE A549 DELLA mTHPC VEICOLATA NEL SOLVENTE STANDARD O IN NANOPARTICELLE PEGilate**

Per valutare un'eventuale differenza di efficacia, dopo irradiazione, tra la mTHPC somministrata nel solvente standard e quella veicolata in nanoparticelle ORMOSIL PEGilate, come anche per verificare l'efficacia fotodinamica della clorina dopo legame covalente nella matrice silanica delle nanoparticelle, è stato effettuato l'esperimento di PDT *in vitro* nelle cellule tumorali A549. I campioni cellulari sono stati trattati per 24 ore al buio con concentrazioni non citotossiche di fotosensibilizzante, libero o caricato covalentemente e non in nanoparticelle, ed irradiati con luce rossa alla potenza di 0.24 J/cm<sup>2</sup>. La vitalità cellulare è stata valutata con saggio MTS 24 ore dopo l'irradiazione. Come visibile dal grafico (Fig. 42), l'efficacia della clorina nelle cellule A549 è direttamente proporzionale alla concentrazione somministrata e determina mortalità completa dopo PDT con dosi di mTHPC superiori o pari a 1.5 µM. L'efficacia della mTHPC veicolata in nanoparticelle è significativamente inferiore a quella ottenuta veicolandola sciolta nel solvente standard. Inoltre, la curva di vitalità cellulare della clorina incorporata covalentemente in nanoparticelle si sovrappone quasi completamente a quella della clorina incorporata fisicamente in nanoparticelle, dimostrando che l'efficacia della clorina dopo irradiazione risulta simile sia essa incorporata fisicamente o legata covalentemente in nanoparticelle.

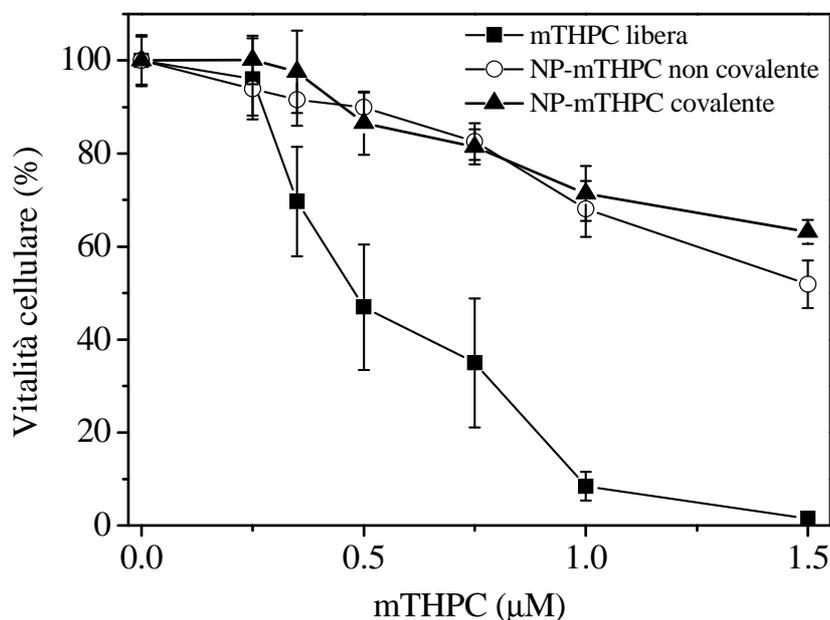


Fig. 42 Curve di vitalità di cellule A549 irradiate con  $0.24 \text{ J/cm}^2$  di luce rossa (600-700 nm) dopo 24 ore di incubazione con concentrazioni crescenti di mTHPC veicolata nel solvente standard oppure incorporata covalentemente e non in nanoparticelle ORMOSIL PEGilate. La vitalità cellulare è stata determinata 24 ore dopo l'irradiamento mediante il saggio MTS. I dati rappresentano le medie  $\pm$  d.s. ( $n = 6$ ).

### 5.17 ACCUMULO IN CELLULE A549 E CCD-34LU DELLA mTHPC NEL SOLVENTE STANDARD E INCORPORATA IN NANOPARTICELLE PEGilate

Dato che la mTHPC somministrata alle cellule A549 e CCD-34Lu nella forma libera presenta una maggiore tossicità, sia al buio che dopo irradiazione (paragrafi 5.14 e 5.16), rispetto a quella veicolata in nanoparticelle PEGilate, è stato studiato se ciò potesse dipendere da un maggior accumulo intracellulare della clorina quando veicolata nel solvente standard. E' stata pertanto determinata, mediante citometria a flusso, la quantità di mTHPC accumulata nelle cellule dopo 24 ore di trattamento con la clorina somministrata libera e incorporata covalentemente e non in nanoparticelle PEGilate.

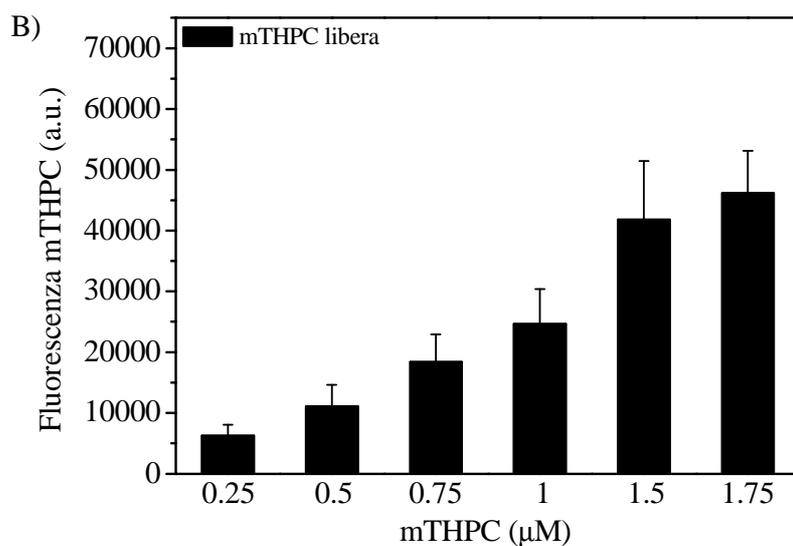
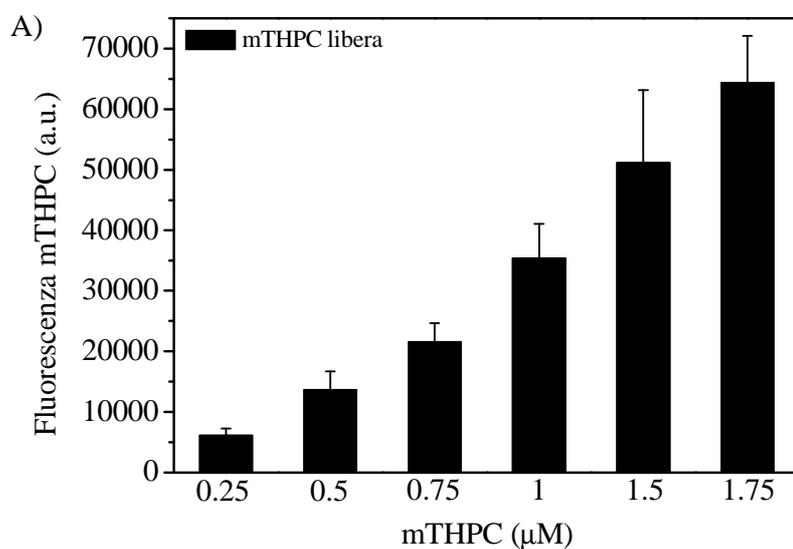


Fig. 43 Accumulo in cellule A549 (A) e CCD-34Lu (B) di concentrazioni crescenti di mTHPC veicolata nella forma libera (solvente standard). L'accumulo è stato valutato mediante citofluorimetria dopo 24 ore di trattamento a 37°C. I dati rappresentano le medie  $\pm$  d.s. ( $n = 3$ ).

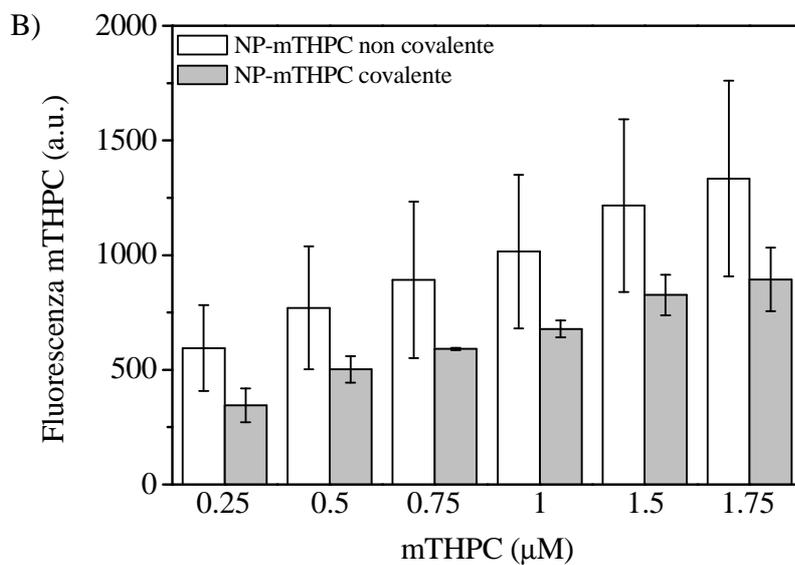
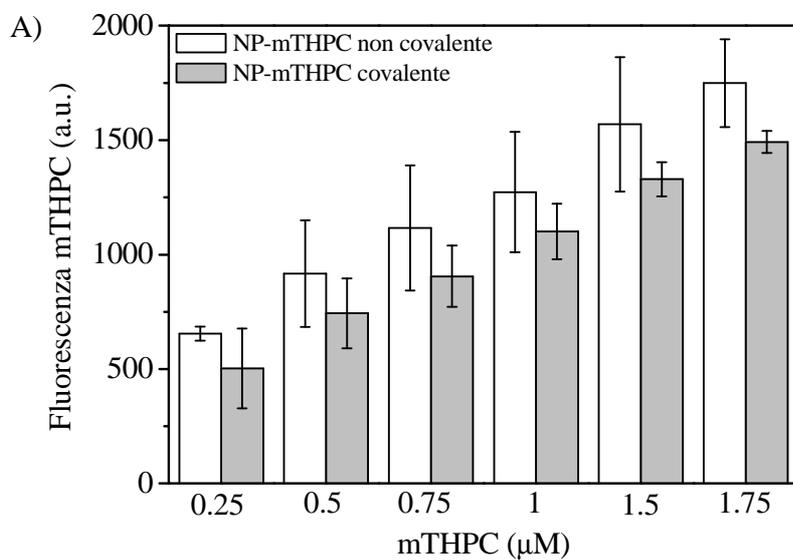


Fig. 44 Accumulo in cellule A549 (A) e CCD-34Lu (B) di concentrazioni crescenti di mTHPC incorporata covalentemente e non in nanoparticelle ORMOSIL PEGilate. L'accumulo è stato valutato mediante citofluorimetria dopo 24 ore di trattamento a 37°C. I dati rappresentano le medie  $\pm$  d.s. ( $n = 3$ ).

Dagli istogrammi di Fig. 43 e 44 si può notare come in entrambe le linee cellulari l'accumulo aumenti al crescere della concentrazione di clorina somministrata, indipendentemente dalla modalità di veicolazione. La mTHPC incorporata covalentemente e non in nanoparticelle PEGilate (Fig. 44) viene internalizzata nelle cellule in quantità significativamente inferiore rispetto a quella in forma libera (Fig. 43). Infatti, considerando la più alta dose di trattamento utilizzata, pari a 1.75  $\mu$ M di mTHPC, l'intensità di fluorescenza media è risultata nelle cellule A549 pari a circa 70000 dopo trattamento con la clorina in forma libera, mentre pari a circa 1700 dopo trattamento con la mTHPC incorporata in nanoparticelle PEGilate. L'efficienza di tale accumulo è inferiore nei fibroblasti rispetto alle cellule tumorali polmonari per entrambe le modalità di veicolazione utilizzate. Inoltre tra le due diverse formulazioni di nanoparticelle PEGilate non si ha significativa differenza di accumulo; si ha solamente una lieve minor internalizzazione nel caso della mTHPC legata covalentemente alle nanoparticelle rispetto a quella incorporata fisicamente.

#### **5.18 LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE DELLA mTHPC INCORPORATA IN NANOPARTICELLE PEGilate**

Sono stati condotti degli studi di microscopia di fluorescenza per valutare l'internalizzazione e la localizzazione intracellulare della mTHPC, veicolata nel solvente standard o incorporata covalentemente e non in nanoparticelle ORMOSIL PEGilate. In particolare, attraverso la distribuzione subcellulare della clorina legata covalentemente alla matrice silanica delle nanoparticelle è possibile individuare l'effettivo sito di accumulo delle nanoparticelle stesse. L'osservazione al microscopio a fluorescenza, effettuata, nelle cellule A549 e CCD-34Lu, dopo 5 e 24 ore di trattamento con la clorina veicolata nelle varie modalità, ha evidenziato che la distribuzione subcellulare della mTHPC non presenta significative differenze tra le due diverse linee cellulari e tra i diversi tempi di trattamento considerati. La mTHPC veicolata nella forma libera si localizza nel comparto citosolico cellulare in modo analogo a quella incorporata non covalentemente in nanoparticelle PEGilate. Dalle immagini (Fig. 45, A-D) è possibile osservare, in analogia con quanto visto per la mTHPC incorporata in nanoparticelle ORMOSIL nude (paragrafo 5.5), una localizzazione preferenziale del fotosensibilizzante nell'apparato del Golgi e nel reticolo endoplasmatico. Le cellule trattate per 5 ore con la clorina incorporata covalentemente in nanoparticelle PEGilate mostrano invece, nella maggior parte delle cellule, una fluorescenza rossa puntinata, indicante una distribuzione nei compartimenti endosomali acidi (Fig. 45, E e F). Tale diversità di localizzazione subcellulare tra la clorina incorporata fisicamente e covalentemente in nanoparticelle fornisce un'ulteriore conferma al fenomeno di rilascio, seppur parziale, della mTHPC dalle nanoparticelle ORMOSIL PEGilate.

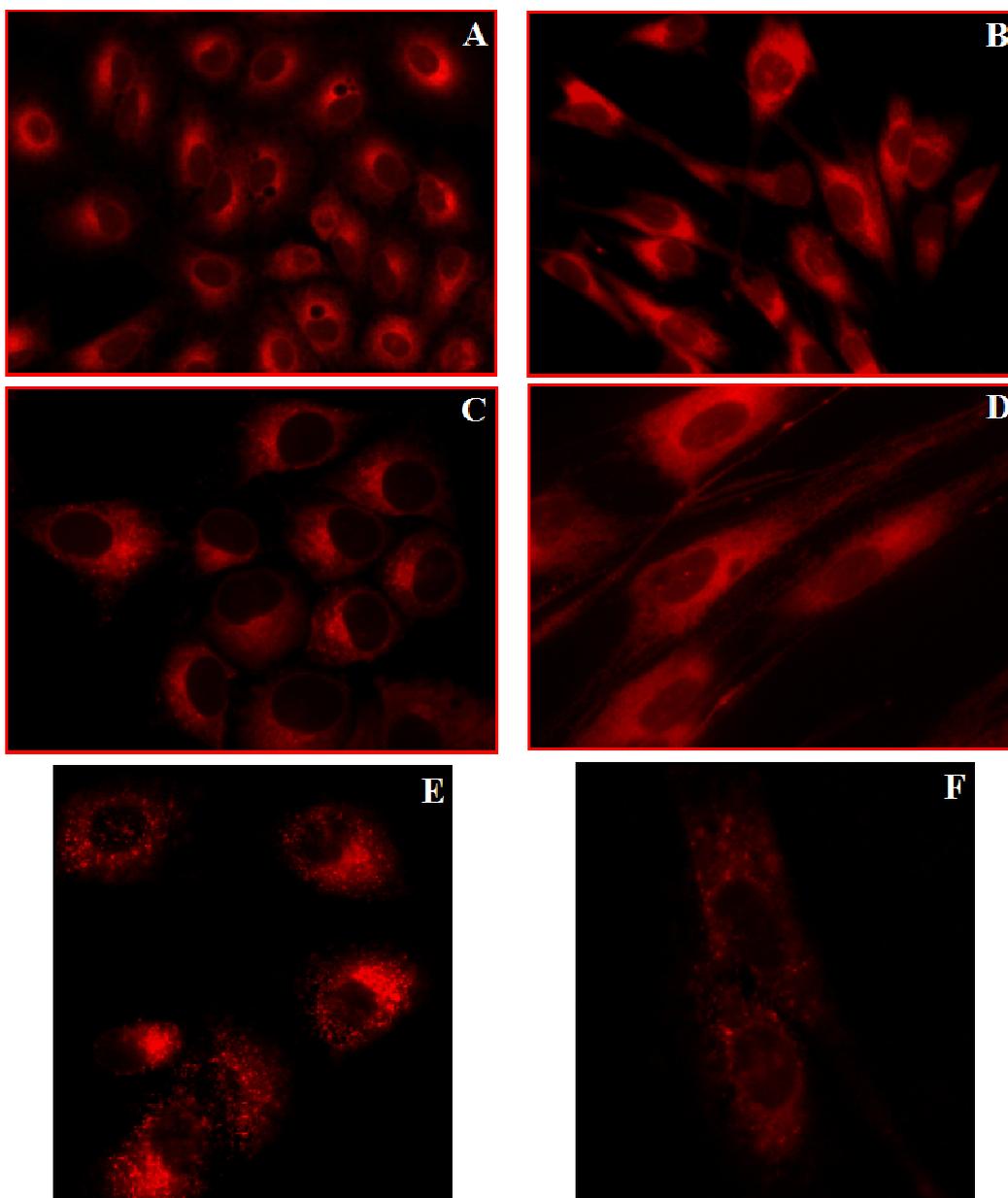


Fig. 45 Localizzazione della mTHPC (1.5  $\mu$ M) veicolata nel solvente standard (A, B; 40X) e incorporata covalentemente (E, F) e non (C, D; 100X) in nanoparticelle ORMOSIL PEGilate in cellule A549 (A, C, E) e CCD-34Lu (B, D, F). L'osservazione al microscopio a fluorescenza è stata effettuata dopo 5 ore di trattamento a 37°C.

### 5.19 CARATTERIZZAZIONE DELLE FORMULAZIONI LIPOSOMIALI PEGilate CONTENENTI LA mTHPC (FOSPEG)

In questo lavoro come nanoveicoli per la mTHPC, oltre alle nanoparticelle di silice, sono state prese in analisi anche delle formulazioni liposomiali unilamellari PEGilate (Fospeg), diverse tra loro per densità (2-8 mol% dei lipidi totali) e lunghezza (750, 2000, 5000) delle catene di PEG.

Le varie formulazioni sono state preparate e caratterizzate nei laboratori della ditta Biolitec. Esse avevano in genere un diametro medio di circa 120 nm (Tab. 6) ed una composizione di 18 mg di DPPC/ml, 2 mg di DPPG/ml e 1.5 mg di mTHPC/ml.

PEG-lipide	8 mol%	
	dimensione [nm]	PTT [°C]
PEG-750-DSPE	120.1	38.21
PEG-2000-DSPE	115.6	37.2
PEG-5000-DSPE	108.5	41.73

Tab. 6 Dimensioni medie e temperature della fase di transizione (PTT, Phase Transition Temperatures) delle formulazioni liposomiali PEGilate 8%, contenenti la mTHPC.

### 5.20 CITOTOSSICITA' DEI FOSPEG

In primo luogo è stata valutata la tossicità al buio causata dalla mTHPC veicolata in diversi Fospeg nelle cellule A549 e CCD-34Lu, in modo da evidenziare eventuali diverse risposte cellulari in relazione alla differente PEGilazione superficiale dei liposomi. I risultati ottenuti sono stati anche confrontati con quelli relativi alla citotossicità indotta dalla mTHPC veicolata nel solvente standard, già discussa nel paragrafo 5.14. La vitalità cellulare è stata determinata, col saggio MTS, dopo 24 ore di trattamento (24 h) (Fig. 46 e 47, A) e 24 ore dopo il termine del trattamento e ripristino con mezzo completo (24 + 24 h) (Fig. 46 e 47, B). A questi tempi, in entrambe le linee cellulari, l'incorporazione della clorina in liposomi ne minimizza significativamente la citotossicità al buio (Fig. 46 e 47). Infatti, 24 ore dopo il termine dell'incubazione con la dose più alta di mTHPC (5  $\mu$ M) somministrata in liposomi si hanno percentuali di vitalità cellulare non inferiori al 70% rispetto ai campioni di controllo, ad eccezione della formulazione di Fospeg 2%-2000 nei fibroblasti CCD34-Lu. Quest'ultima provoca, 24 ore dopo il ripristino con mezzo completo (Fig. 47, B), una significativa diminuzione delle percentuali di vitalità cellulare rispetto alle altre tipologie di formulazioni liposomiali, a partire dalla dose 1.75  $\mu$ M di mTHPC, fino ad indurre una mortalità circa pari al 70% alla concentrazione 5  $\mu$ M di mTHPC. Tra le altre tipologie di Fospeg non si notano significative differenze di citotossicità. La minore percentuale di PEGilazione superficiale del liposoma potrebbe pertanto essere la causa di una minore protezione dalla citotossicità della mTHPC incorporata.

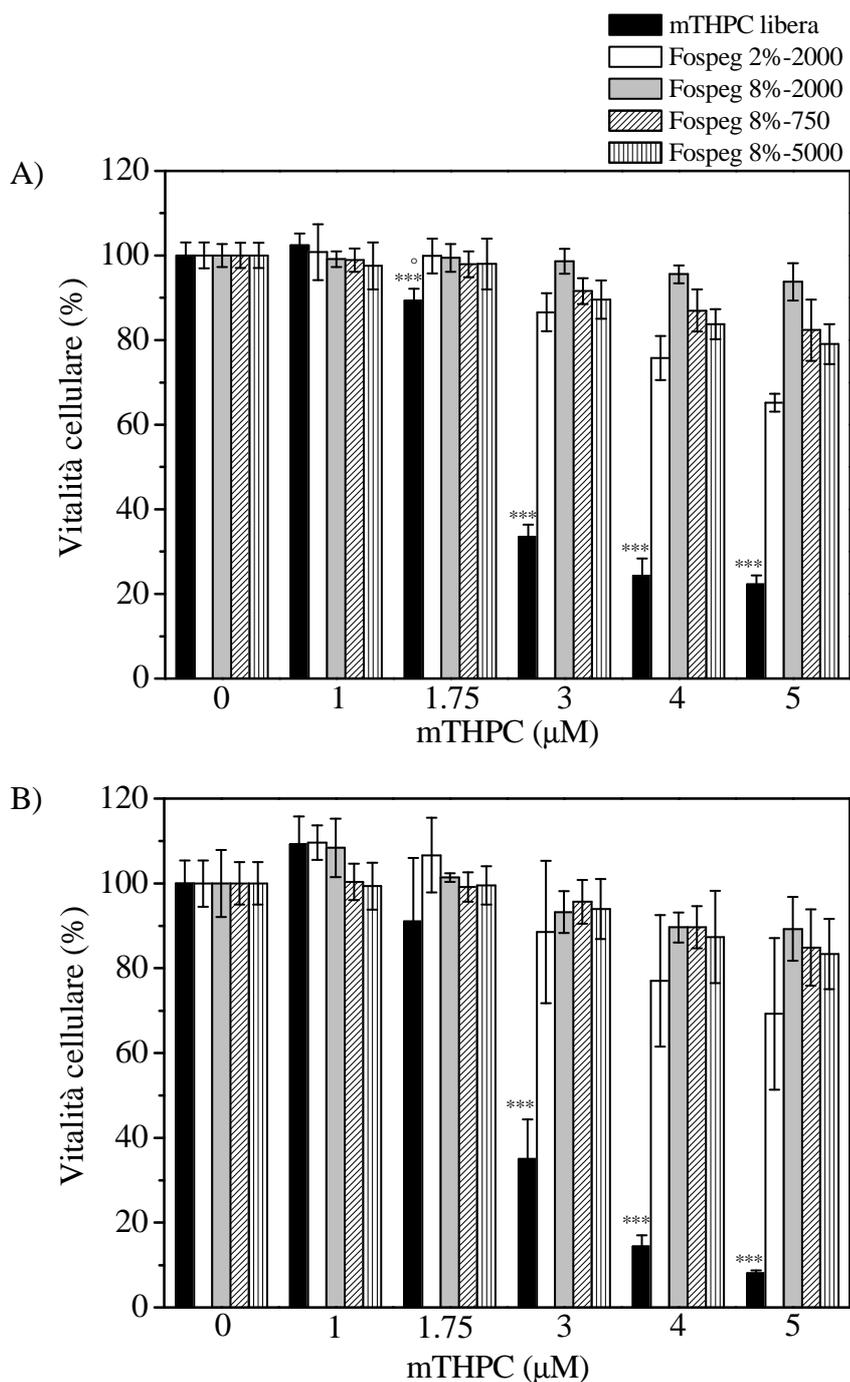


Fig. 46 Vitalità di cellule A549 trattate per 24 ore al buio con concentrazioni crescenti di mTHPC veicolata nel solvente standard (libera) o in liposomi PEGilati (Fospeg). La vitalità è stata valutata con saggio MTS allo scadere del trattamento (24 h, A) e 24 ore dopo il ripristino con terreno completo (24 + 24 h, B), ed espressa come percentuale rispetto a cellule di controllo sottoposte al medesimo protocollo dei campioni trattati, ma non incubate con la mTHPC. I dati rappresentano le medie  $\pm$  d.s. ( $n = 9$ ). \*\*\*:  $p < 0.001$  rispetto ai corrispondenti campioni trattati con Fospeg 2%-2000, 8%-2000, -750, -5000; °:  $p < 0.01$  rispetto al corrispondente campione trattato con Fospeg 8%-5000,  $t$ -test.

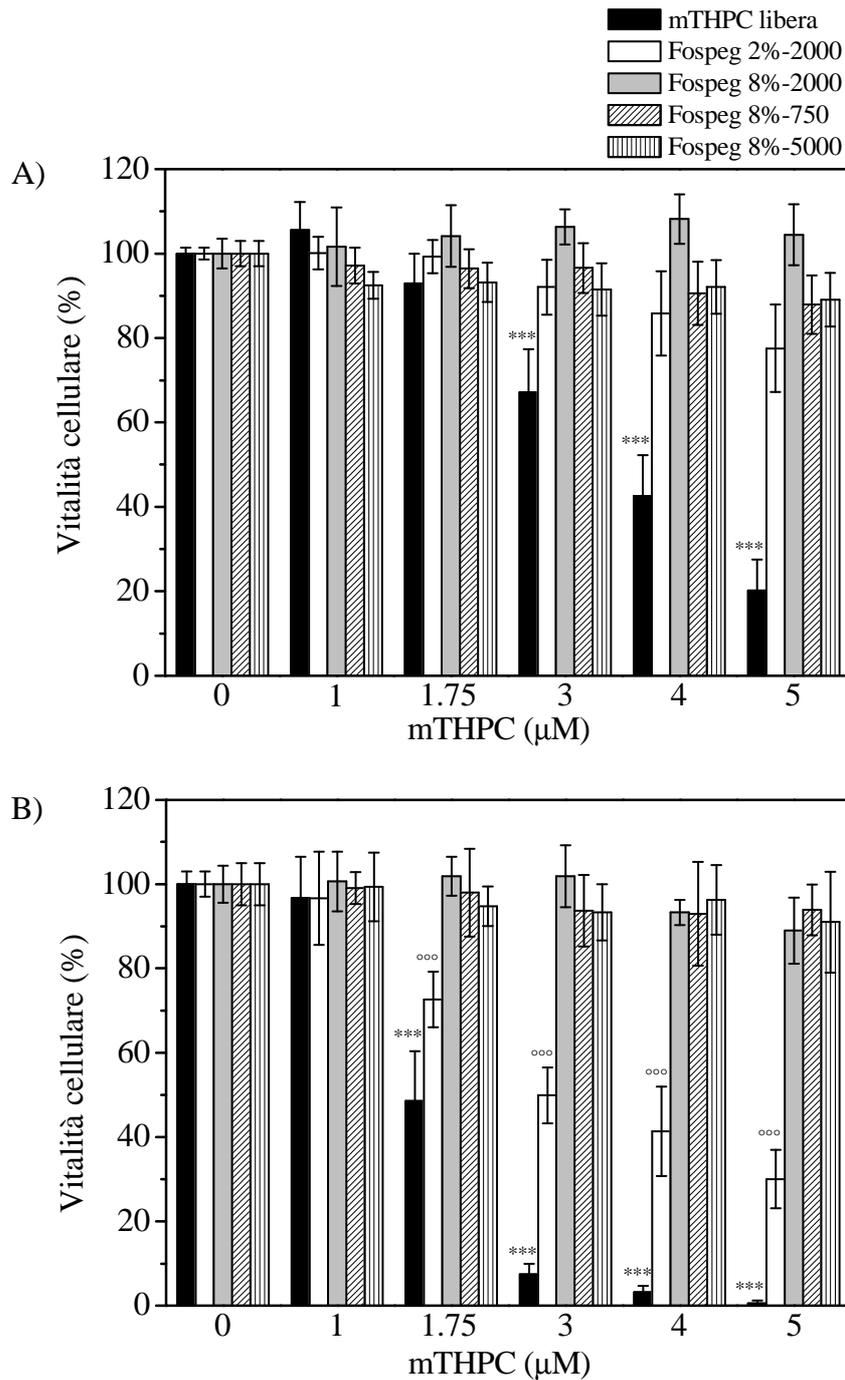


Fig. 47 Vitalità di cellule CCD-34Lu trattate per 24 ore al buio con concentrazioni crescenti di mTHPC veicolata nel solvente standard (libera) o in liposomi PEGilati (Fospeg). La vitalità è stata valutata con saggio MTS allo scadere del trattamento (24 h, A) e 24 ore dopo il ripristino con terreno completo (24 + 24 h, B), ed espressa come percentuale rispetto a cellule di controllo. I dati rappresentano le medie  $\pm$  d.s. ( $n = 9$ ). \*\*\*:  $p < 0.001$  rispetto ai corrispondenti campioni trattati con Fospeg 2%-2000, 8%-2000, -750, -5000; ooo:  $p < 0.001$  rispetto ai corrispondenti campioni trattati con Fospeg 8%-2000, -750, -5000,  $t$ -test.

## 5.21 ACCUMULO INTRACELLULARE DELLA mTHPC INCORPORATA IN LIPOSOMI PEGilati

Per indagare un'eventuale analogia di accumulo intracellulare della mTHPC tra le differenti formulazioni liposomiali Fospeg, e tra questi ultimi e la mTHPC veicolata nel solvente standard, è stata stimata, mediante citofluorimetria, la quantità di clorina internalizzata dalle cellule A549 e CCD-34Lu al termine di 24 ore di incubazione con concentrazioni crescenti di clorina somministrata nelle varie modalità di veicolazione.

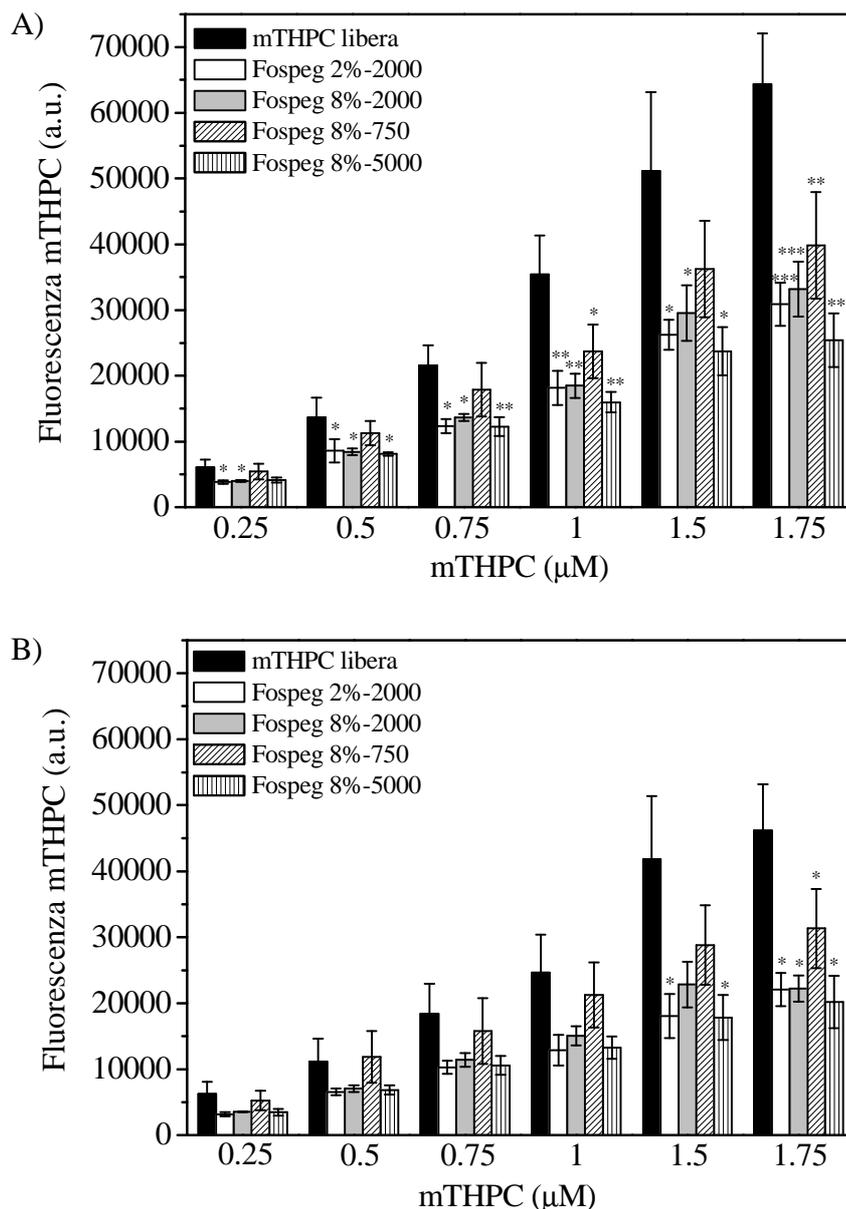


Fig. 48 Accumulo in cellule A549 (A) e CCD-34Lu (B) di concentrazioni crescenti di mTHPC veicolata nella forma libera e in diversi tipi di Fospeg. E' stata utilizzata la citofluorimetria per registrare i segnali di fluorescenza della mTHPC dopo 24 ore di trattamento. I dati rappresentano le medie  $\pm$  d.s. ( $n = 3$ ). \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.005$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  rispetto ai corrispondenti campioni trattati con la mTHPC nella forma libera,  $t$ -test.

I risultati mostrano che la clorina nella forma libera viene accumulata, sia dalle cellule A549 che CCD-34Lu, più efficientemente rispetto a quella veicolata in liposomi, e che tale differenza di accumulo diventa sempre più significativa all'aumentare della concentrazione di mTHPC somministrata. La quantità di mTHPC accumulata nelle cellule è direttamente proporzionale alla concentrazione utilizzata nel trattamento, per tutte le modalità di veicolazione; inoltre, non sono evidenziabili significative differenze di accumulo intracellulare tra le varie tipologie di Fospeg (Fig. 48).

E' stata selezionata la formulazione di Fospeg 8%-2000 per studiarne la cinetica di accumulo tempo-dipendente nelle cellule A549 e confrontarla con quella della mTHPC nella forma libera (solvente standard). Le curve relative alle due cinetiche, costruite registrando il segnale di fluorescenza della clorina nelle cellule ad intervalli successivi di tempo fino a 24 ore di trattamento, presentano un andamento analogo, ma non sono sovrapponibili, poiché ad ogni tempo si ha un accumulo inferiore per la mTHPC veicolata in liposomi rispetto a quella nel solvente standard (Fig. 49).

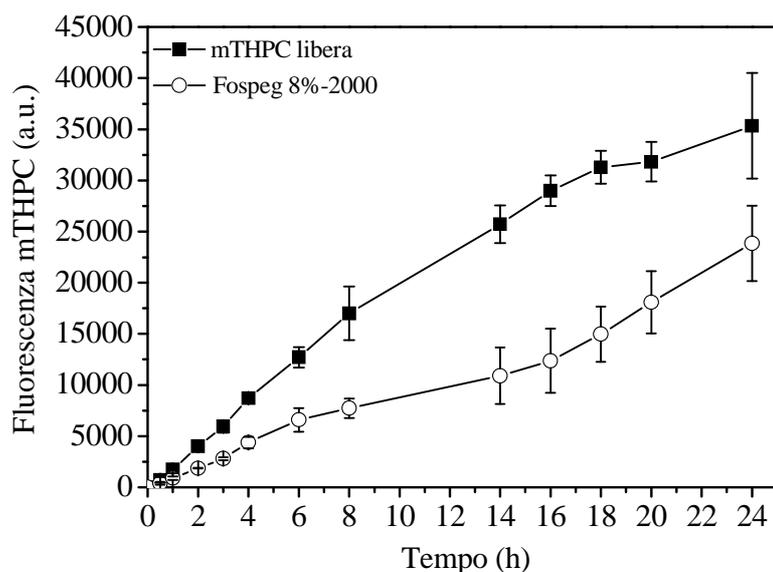


Fig. 49 Accumulo nel tempo in cellule A549 della mTHPC (1  $\mu$ M) nella forma libera e incapsulata in liposomi rivestiti con 8 mol% di catene di PEG 2000 (Fospeg 8%-2000). L'accumulo è stato valutato mediante citofluorimetria dopo diversi tempi di trattamento a 37°C. I dati rappresentano le medie  $\pm$  d.s. ( $n = 2$ ).

## 5.22 FOTOCITOTOSSICITA' DELLA mTHPC IN LIPOSOMI PEGilati

Visto il minor accumulo intracellulare della mTHPC quando è veicolata in Fospeg rispetto alla forma libera, ne è stata valutata la fototossicità, somministrandola nel solvente standard e in Fospeg, tramite un esperimento di PDT *in vitro* nelle cellule A549. La vitalità cellulare dei vari campioni è stata valutata con saggio MTS 24 ore dopo l'irradiazione con luce rossa alla potenza di  $0.24 \text{ J/cm}^2$ .

Come visibile nel grafico (Fig. 50), l'efficienza fotodinamica della clorina nelle cellule tumorali risulta ridotta somministrandola incorporata in Fospeg rispetto alla formulazione standard, ma non si riscontrano significative differenze di fototossicità tra le diverse tipologie di liposomi PEGilati utilizzati per la veicolazione della clorina. Tali dati sono in accordo con i risultati ottenuti dalla valutazione dell'accumulo intracellulare (paragrafo 5.21).

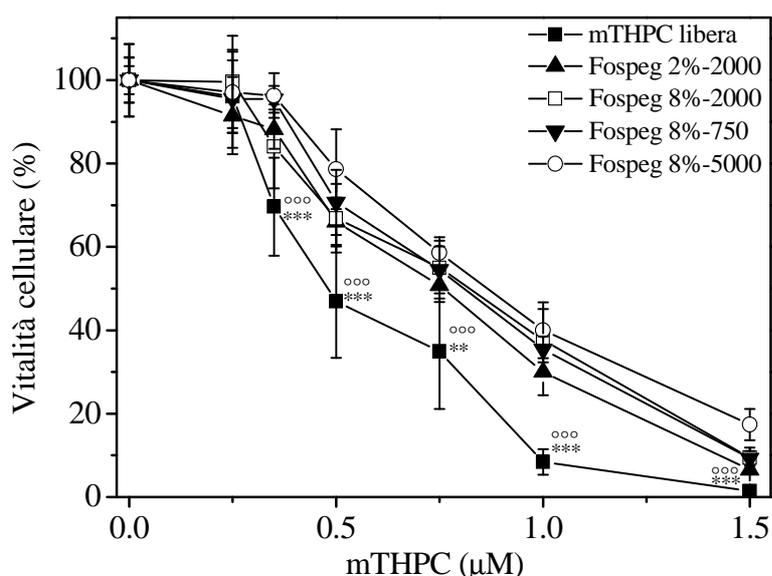


Fig. 50 Curve di vitalità di cellule A549 irradiate con  $0.24 \text{ J/cm}^2$  di luce rossa (600-700 nm) dopo 24 ore di incubazione con concentrazioni crescenti di mTHPC veicolata nel solvente standard oppure in vari tipi di liposomi PEGilati (Fospeg). La vitalità cellulare è stata determinata 24 ore dopo l'irradiazione mediante il saggio MTS. I dati rappresentano le medie  $\pm$  d.s. ( $n = 12$ ). \*\*:  $p < 0.005$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  rispetto ai corrispondenti campioni trattati con Fospeg 2%-2000 e 8%-750; °°°:  $p < 0.001$  rispetto ai corrispondenti campioni trattati con Fospeg 8%-2000 e -5000, *t*-test.

### 5.23 DISTRIBUZIONE SUBCELLULARE DELLA mTHPC INCORPORATA IN LIPOSOMI PEGilati

L'osservazione al microscopio a fluorescenza di campioni di cellule A549 e CCD-34Lu trattati per 5 e 24 ore con la mTHPC veicolata nel solvente standard e in varie tipologie di Fospeg ha permesso di studiare l'internalizzazione e la localizzazione subcellulare dei tale fotosensibilizzante.

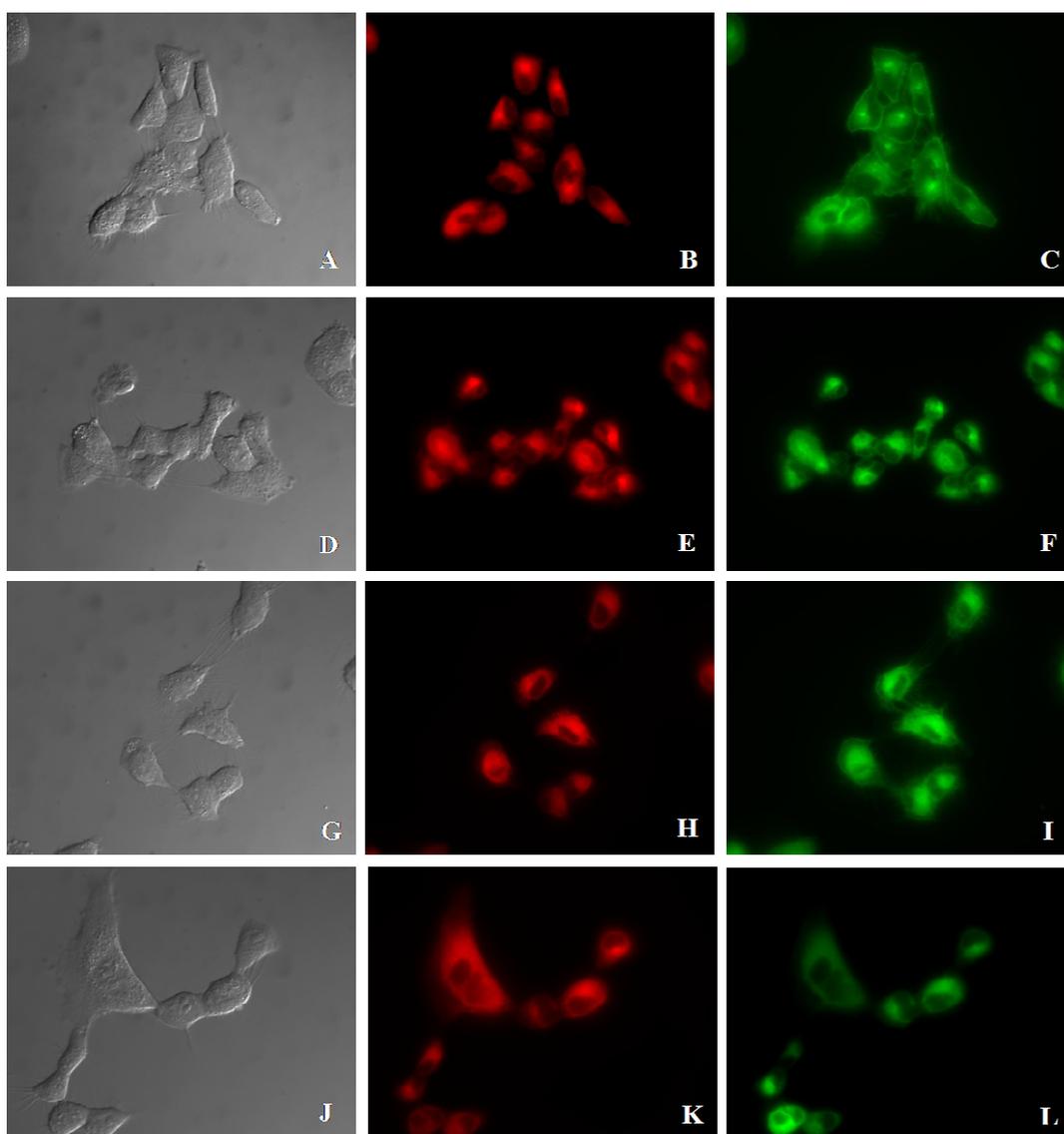


Fig. 51 Distribuzione subcellulare della mTHPC ( $1.5 \mu\text{M}$ ) veicolata nel solvente standard (B, E) o incapsulata in liposomi PEGilati Fospeg 8%-2000 (H, K) in cellule A549 dopo 5 ore di incubazione. La fluorescenza rossa della mTHPC (B, E, H e K) co-localizza con la fluorescenza verde delle sonde ER-Tracker Green (F, L) e NBD  $\text{C}_6$ -ceramide (C, I), utilizzate rispettivamente per marcare il reticolo endoplasmatico e l'apparato del Golgi. Le immagini A, D, G e J sono relative alla microscopia in campo chiaro (Differential Interference Contrast).

Le immagini ottenute (Fig. 51) hanno evidenziato una rapida internalizzazione della mTHPC ed una localizzazione citoplasmatica, preferenzialmente nell'apparato del Golgi e nel reticolo endoplasmatico, in entrambe le linee cellulari considerate, indipendentemente dalla modalità di veicolazione utilizzata, Fospeg (Fig. 51, H e K) o solvente standard (Fig. 51, B ed E). Non è stata osservata una localizzazione lisosomiale né per la mTHPC veicolata nella forma libera né per quella incorporata in liposomi (Fig. 52, A e B). Non vi sono inoltre significative differenze tra i due tempi di trattamento analizzati, per cui le immagini ottenute al termine di 24 ore di trattamento sono risultate analoghe a quelle osservate dopo 5 ore di incubazione mostrate in Fig. 51. Neppure tra le diverse tipologie di formulazioni liposomiali si sono evidenziate significative differenze di localizzazione subcellulare, cosicchè le foto in Fig. 51, relative alla formulazione Fospeg 8%-2000, sono simili a quelle ottenute incubando le cellule con altri Fospeg (immagini non mostrate).

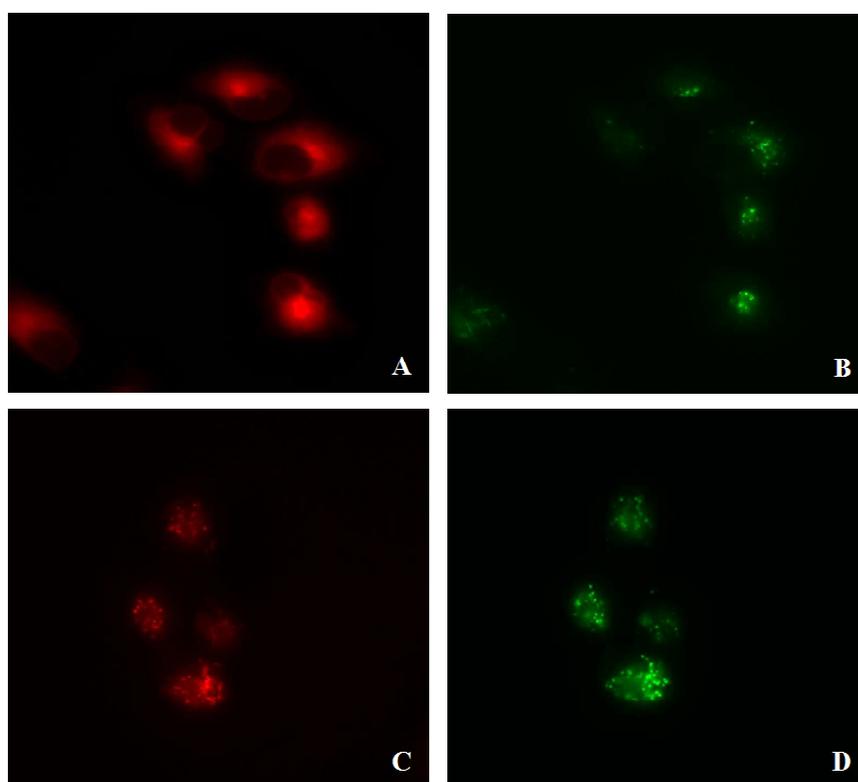


Fig. 52 Localizzazione subcellulare della mTHPC (1.5  $\mu$ M) veicolata in Fospeg 8%-2000 (A), e della rodamina legata covalentemente ad un lipide costituente i liposomi PEGilati 8%-2000 (C), in cellule A549 dopo 5 ore di incubazione. La fluorescenza rossa della mTHPC (A) non co-localizza con la fluorescenza verde del LysoTracker Green (B), utilizzata per marcare i lisosomi, mentre la fluorescenza della rodamina-DPPE (C) co-localizza con la fluorescenza della sonda lisosomiale (D).

Una possibile spiegazione alla simile distribuzione subcellulare tra mTHPC veicolata nella forma libera e quella veicolata in Fospeg potrebbe essere la fuoriuscita del fotosensibilizzante dai liposomi, persino precedente all'internalizzazione dei liposomi stessi nelle cellule. Per verificare ciò è stata osservata al microscopio a fluorescenza la localizzazione intracellulare di liposomi PEGilati marcati con un fluoroforo legato covalentemente ad un lipide (rodamina-DPPE). La fluorescenza di questa rodamina co-localizza con la fluorescenza verde emessa dalla sonda specifica per i lisosomi (Fig. 52, C e D), mentre non sovrappone con quella emessa dalle sonde specifiche per l'apparato del Golgi e del reticolo endoplasmatico. In tal modo è stato possibile individuare il sito di localizzazione cellulare dei liposomi PEGilati, che è risultato essere lisosomiale suggerendo pertanto un possibile rilascio della mTHPC dai liposomi, dato che essa si trova distribuita in altri compartimenti subcellulari.



**6**

***CONCLUSIONI***

In questo lavoro sperimentale le nanoparticelle di silice organicamente modificata (ORMOSIL NP) ed i liposomi PEGilati (Fospeg) sono stati sfruttati come nanosistemi per la veicolazione del fotosensibilizzatore (PS) mTHPC con lo scopo di migliorare la PDT dei tumori, evitando così alcuni dei possibili svantaggi associati ai convenzionali metodi di veicolazione dei farmaci. La mTHPC è una molecola che, per la sua estrema idrofobicità, tende ad aggregare in ambiente acquoso ponendo delle limitazioni alla sua somministrazione *in vivo* per via endovenosa. Pertanto la sua incorporazione nell'interno idrofobico di nanoparticelle o del doppio strato fosfolipidico di liposomi, che sono solubili in acqua, ne permette la somministrazione in forma non aggregata. E' stato dimostrato, in primo luogo, che la mTHPC incapsulata nelle ORMOSIL NP mantiene inalterate le sue proprietà fotofisiche, si trova in forma monomerică e rimane incorporata nelle NP proprio per l'idrofobicità dell'ambiente interno in quanto solventi meno polari dell'acqua ne provocano l'immediato rilascio, come riportato anche in alcuni lavori condotti con ORMOSIL NP esposte a solventi organici (Kumar et al., 2008). Come dimostrato dall'esperimento condotto con l'ADPA per misurare la produzione di  $^1\text{O}_2$  da parte della mTHPC attivata con luce rossa, l'incorporazione del PS in ORMOSIL NP non modifica la sua efficienza di produzione di  $^1\text{O}_2$  rispetto al PS nel solvente standard o in mezzo acquoso contenente proteine sieriche. La mTHPC può dare luogo a reazioni fotocitotossiche senza essere necessariamente rilasciata dalla NP, in quanto l' $^1\text{O}_2$  può attraversare la matrice silanica porosa del nanoveicolo (Roy et al., 2003). Come dimostrato dagli esperimenti di photobleaching, neppure la velocità e l'entità di fotodegradazione della mTHPC sottoposta ad irradiazione viene alterata incorporandola in NP. I saggi effettuati *in vitro* per valutare la potenziale citotossicità del nanoveicolo e l'eventuale produzione di ROS hanno evidenziato una buona biocompatibilità delle ORMOSIL NP nude nelle cellule di carcinoma esofageo umano KYSE 510. La veicolazione della mTHPC in ORMOSIL NP nude riduce la citotossicità al buio rispetto a quella indotta dopo trattamento con la mTHPC sciolta nel solvente standard. Le curve dose-risposta dopo PDT con luce rossa in cellule KYSE 510, ottenute con due diversi saggi di vitalità cellulare (trypan blue e MTS), hanno dimostrato che l'efficacia della mTHPC è direttamente proporzionale alla dose somministrata, indipendentemente dalla modalità di veicolazione, e che la mTHPC in NP e nel solvente standard ha un'uguale efficacia fotodinamica, nonostante si abbia un minor accumulo intracellulare quando essa viene somministrata in NP. Tale differenza di accumulo può essere spiegata tramite fenomeni di aggregazione della mTHPC, veicolata nel solvente standard, nel terreno di coltura cellulare contenente proteine del siero, come dimostrato dall'analisi delle cinetiche di monomerizzazione della clorina nel mezzo di coltura. E' noto, infatti, che la mTHPC nella forma libera (solvente standard) può associarsi a proteine del siero aggregando almeno in parte, quando viene diluita nel mezzo di coltura cellulare (Sasnouski et al., 2005). Gli aggregati di PS hanno una minor efficienza fotodinamica rispetto alle molecole di mTHPC incorporate in NP sottoforma di monomeri. Studi di microscopia di fluorescenza hanno evidenziato che

non vi sono differenze di localizzazione subcellulare tra la mTHPC veicolata nel solvente standard o tramite NP. In entrambi i casi, il PS viene rapidamente internalizzato dalle cellule e si localizza a livello citosolico, preferenzialmente nell'apparato del Golgi e nel reticolo endoplasmatico, dove permane anche dopo duplicazione delle cellule. Tale distribuzione della clorina è in accordo con quanto riportato anche per altre linee cellulari (Teiten et al., 2003). Il meccanismo di internalizzazione cellulare della mTHPC, per entrambe le modalità di veicolazione, è l'endocitosi, come suggerito dagli esperimenti condotti a basse temperature (4°C). Poiché con le due diverse modalità di *delivery* della mTHPC sono stati ottenuti sempre risultati molto simili, è stato ipotizzato che la molecola di PS potesse fuoriuscire dalle NP nude, precedentemente all'ingresso nelle cellule, a causa di interazioni della superficie del nanoveicolo con componenti proteiche del siero. Ciò è stato dimostrato sia mediante esperimenti di FRET che di ultracentrifugazione delle NP veicolanti la mTHPC. Quindi è probabile che le proteine sieriche, dopo essere state adsorbite alla superficie della NP, si leghino alle molecole di mTHPC localizzate vicino alla superficie, e successivamente si dissocino dalla NP come complesso proteina-mTHPC. Per questo motivo, in una seconda parte del lavoro, è stata utilizzata una nuova strategia basata sul rivestimento superficiale delle ORMOSIL NP con catene di PEG. I risultati hanno dimostrato che la PEGilazione inibisce fortemente, ma non completamente, il rilascio della mTHPC incorporata fisicamente nelle NP. Per evitare completamente il rilascio sono state sintetizzate e studiate ORMOSIL NP PEGilate con la mTHPC legata covalentemente alla matrice silanica, prendendo spunto dal lavoro di Ohulchanskyy et al. (2007). Attraverso esperimenti di PDT *in vitro* è stato dimostrato che il legame covalente non altera l'efficienza fotodinamica della mTHPC. Dalla valutazione degli effetti biologici indotti dalle NP PEGilate, caricate fisicamente o covalentemente con la mTHPC, nelle cellule di carcinoma polmonare umano A549 e nei fibroblasti polmonari umani CCD-34Lu, è stata notata una diminuzione della citotossicità della mTHPC, al buio e dopo irradiazione, quando è veicolata in NP rispetto al solvente standard. Ciò è risultato in accordo col minor accumulo intracellulare del PS quando veicolato in NP PEGilate. I saggi di vitalità cellulare dopo esposizione delle cellule A549 e CCD-34Lu alle NP PEGilate vuote hanno evidenziato una risposta diversa tra le due linee. Mentre nei fibroblasti non si ha alcuna significativa induzione di mortalità, nelle cellule tumorali la vitalità diminuisce significativamente all'aumentare della dose di NP PEGilate somministrata. Tale diverso comportamento potrebbe dipendere dalla presenza nelle cellule CCD-34Lu di efficienti sistemi di protezione dallo stress ossidativo in quanto presentano una elevata produzione endogena di ROS. Saranno necessarie ulteriori indagini su tale aspetto per poter comprendere nel dettaglio le cause di questa diversa risposta cellulare. Gli studi di microscopia di fluorescenza con la mTHPC covalentemente legata nelle NP PEGilate hanno permesso di individuare i compartimenti endosomali acidi come effettivi siti di accumulo delle NP, dando un'ulteriore conferma al rilascio del PS dalla NP quando vi è fisicamente intrappolato.

Oltre alle ORMOSIL NP sono state studiate anche delle formulazioni liposomiali PEGilate (Fospeg) per la veicolazione della mTHPC, diverse tra loro per densità e lunghezza delle catene di PEG. L'incorporazione della mTHPC in Fospeg riduce la tossicità al buio in cellule A549 e CCD-34Lu rispetto alla sua veicolazione in solvente standard, e riduce anche l'efficienza fotodinamica nelle cellule tumorali, in accordo col minore accumulo cellulare della clorina rispetto alla somministrazione in forma libera. Inoltre, una minore percentuale di PEGilazione superficiale del liposoma determina una minore protezione dalla citotossicità della mTHPC incorporata, indicando che i liposomi con elevata densità di PEG sono migliori come nanoveicoli. La mTHPC, indipendentemente dalla modalità di veicolazione (solvente standard o Fospeg), viene internalizzata rapidamente e si localizza nel citosol, in entrambe le linee cellulari, suggerendo pertanto, come visto per le ORMOSIL NP, un possibile rilascio della mTHPC dai liposomi. Tale fuoriuscita è stata confermata mediante analisi della distribuzione intracellulare di liposomi PEGilati marcati con un lipide fluorescente, che hanno mostrato una localizzazione lisosomiale del liposoma.

In conclusione, le ORMOSIL NP ed i liposomi PEGilati possono essere utilizzati come nanosistemi di *drug delivery* per la terapia fotodinamica delle neoplasie, legando covalentemente il farmaco al nanoveicolo per evitarne il rilascio precedente all'accumulo cellulare. Studi futuri saranno focalizzati sul miglioramento dell'accumulo intracellulare del PS e della specificità e selettività della terapia mediante funzionalizzazione superficiale di questi nanoveicoli con ligandi o anticorpi specificamente riconosciuti da recettori sovraespressi esclusivamente dalle cellule tumorali, come anche tramite aumento della concentrazione di farmaco incorporata nei nanoveicoli. Un esempio di ligando utilizzabile per la funzionalizzazione è la vitamina acido folico, i cui recettori si trovano sovraespressi in numerose tipologie di carcinomi. Studi *in vitro* relativi all'applicazione di nanosistemi funzionalizzati con l'acido folico potranno essere condotti utilizzando in parallelo linee cellulari negative alla sovraespressione del recettore del folato, come la linea A549, e cellule positive alla sua sovraespressione, come la linea KB.

7

***ABBREVIAZIONI***

**ADPA:** acido disodico 9,10-antracenedipropionico

**AOT:** dioctil-sodiosulfosuccinato

**APTES:** 3-aminopropiltrietossisilano

**BCA:** acido biconinico

**Carbossi-DCFH:** carbossi-diclorofluoresceina

**Carbossi-H<sub>2</sub>DCFDA:** 5-(e 6)-carbossi-2',7'-diclorodiidrofluoresceina diacetato

**DCM:** diclorometano

**DLS:** Dynamic Light Scattering

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DMF:** N,N-dimetilformammide

**DMSO:** dimetilsolfossido

**DPPC:** dipalmitoilfosfatidilcolina

**DPPG:** dipalmitoilfosfatidilglicerolo

**EDTA:** acido etilen-diammino-tetracetico

**FBS:** Foetal Bovine Serum

**Fospeg:** formulazioni liposomiali PEGilate contenenti mTHPC

**FR:** Folate Receptor

**FRET:** Fluorescence Resonance Energy Transfer

**HEPES:** acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico

**IR775:** 2-[2-[2-cloro-3-[2-(1,3-diidro-1,3,3-trimetil-2H-indol-2-ilidene)-etilidene]-1-cicloesene-1-il]-etenil]-1,3,3-trimetil-3H-indolio cloride

**LDL:** Low Density Lipoprotein

**MeOH:** metanolo

**mPEG-DSPE:** N-(carbonil-metossipolietileneglicole)-1,2-distearoilfosfatidil etanolamina

**mTHPC:** *meta*-tetra(idrossifenil)clorina

**MTS:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio

**NEAA:** aminoacidi non essenziali

**NP:** nanoparticelle

**ORMOSIL NP:** ORganically MODified SILica NanoParticles

**PBS:** Phosphate Buffered Saline

**PDT:** PhotoDynamic Therapy

**PEG:** poli(etilene glicole)

**PES:** fenazina etosolfato

**PS:** fotosensibilizzatore

**PVDF:** polivinilidene fluoride

**Rodamina-DPPE:** 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(lissamina rodamina B solfonil

**ROS:** Reactive Oxygen Species

**RPMI-1640:** Roswell Park Memorial Institute-1640

**SDS:** sodio dodecil solfato

**TEM:** Transmission Electron Microscopy

**VTES:** viniltrietossisilano



8

***BIBLIOGRAFIA***

- ✓ Akerman M.E., Chan W.C., Laakkonen P., Bhatia S.N., Ruoslahti E. (2002) "Nanocrystal targeting in vivo" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 12617-12621.
- ✓ Allen T.M., Chonn A. (1987) "Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system" *FEBS Lett.* **223**, 42-46.
- ✓ Allen T.M., Cullis P.R. (2004) "Drug delivery systems: entering the mainstream" *Science* **303**, 1818-1822.
- ✓ Allison B.A., Pritchard P.H., Levy J.G. (1994) "Evidence for low-density lipoprotein receptor-mediated uptake of benzoporphyrin derivative" *Br. J. Cancer* **69**, 833-839.
- ✓ Atlante A., Passarella S., Quagliariello E. (1989) "Hematoporphyrin derivative (Photofrin II) photosensitization of isolated mitochondria: inhibition of ADP/ATP translocator" *J. Photochem. Photobiol.* **4**, 35-46.
- ✓ Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C. (1965) "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids" *J. Mol. Biol.* **13**, 238-252.
- ✓ Bechet D., Couleaud P., Frochot C., Viriot M.L., Guillemin F., Barberi-Heyob M. (2008) "Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents" *Trends Biotechnol.* **26**, 612-621.
- ✓ Berg K., Moan J. (1997) "Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer" *Photochem. Photobiol.* **65**, 403-409.
- ✓ Berg K., Steen H.B., Winkelman J.W., Moan J. (1992) "Synergistic effects of photoactivated tetra(4-sulfonatophenyl)porphine and nocodazole on microtubule assembly, accumulation of cells in mitosis and cell survival" *J. Photochem. Photobiol.* **13**, 59-70.
- ✓ Brancaloni L., Moseley H. (2002) "Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy" *Lasers Med. Sci.* **17**, 173-186.
- ✓ Buchholz J., Kaser-Hotz B., Khan T., Rohrer Bley C., Melzer K., Schwendener R.A., Roos M., Walt H. (2005) "Optimizing photodynamic therapy: in vivo pharmacokinetics of liposomal meta-(tetrahydroxyphenyl)chlorin in feline squamous cell carcinoma" *Clin. Cancer Res.* **11**, 7538-7544.
- ✓ Buytaert E., Dewaele M., Agostinis P. (2007) "Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy" *Biochem. Biophys. Acta* **1776**, 86-107.
- ✓ Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. (2004) "Mechanisms in photodynamic therapy: Part two-photosensitizers, photochemistry and cellular localization" *Photodiag. Photodyn. Ther.* **1**, 279-293.
- ✓ Castranova V., Vallyathan V. (2000) "Silicosis and coal workers' pneumoconiosis" *Environ. Health Perspect.* **108**, 675-684.
- ✓ Chen Q., Chen H., Hetzel F.W. (1996) "Tumor oxygenation changes post-photodynamic therapy" *Photochem. Photobiol.* **63**, 128-131.

- ✓ Cheng Y., Samia A.C., Meyers J.D., Panagopoulos I., Fei B.W., Burda C. (2008) "Highly efficient drug delivery with gold nanoparticle vectors for in vivo photodynamic therapy of cancer" *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 10643-10647.
- ✓ Choi H.S., Liu W., Misra P., Tanaka E., Zimmer J.P., Ity Ipe B., Bawendi M.G., Frangioni J.V. (2007) "Renal clearance of quantum dots" *Nat. Biotechnol.* **25**, 1165-1170.
- ✓ Compagnin C., Baù L., Mognato M., Celotti L., Miotto G., Arduini M., Moret F., Fede C., Selvestrel F., Rio Echevarria IM., Mancin F., Reddi E. (2009) "The cellular uptake of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin entrapped in organically modified silica nanoparticles is mediated by serum proteins" *Nanotechnology* **20**, 345101-345112.
- ✓ Coppola A., Rasile G. (1981) "The photodynamic effects of hematoporphyrin and light on the cytoplasm of human leukemic cells" *Cancer Detect. Prev.* **4**, 611-617.
- ✓ Cuenca A.G., Jiang H., Hochwald S.N., Delano M., Cance W.G., Grobmyer S.R. (2006) "Emerging implications of nanotechnology on cancer diagnostics and therapeutics" *Cancer* **107**, 459-466.
- ✓ Dailey L.A., Jekel N., Fink L., Gessler T., Schmehl T., Wittmar M., Kissel T., Seeger W. (2006) "Investigation of the proinflammatory potential of biodegradable nanoparticle drug delivery systems in the lung" *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **215**, 100-108.
- ✓ Davis M.E., Chen Z.G., Shin D.M. (2008) "Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer" *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 771-782.
- ✓ Decuzzi P., Pasqualini R., Arap W., Ferrari M. (2009) "Intravascular delivery of particulate systems: does geometry really matter?" *Pharm. Res.* **1**, 235-243.
- ✓ Dellinger M. (1996) "Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol" *Photochem. Photobiol.* **64**, 182-187.
- ✓ Dhar S., Gu F.X., Langer R., Farokhzad O.C., Lippard S.J. (2008) "Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 17356-17361.
- ✓ Dolmans D.E.J.G.J., Fukumura D., Jain R.K. (2003) "Photodynamic therapy for cancer" *Nat. Rev. Cancer* **3**, 380-387.
- ✓ Dolmans D.E.J.G.J., Kadambi A., Hill J.S., Waters C.A., Robinson B.C., Walker J.P., Fukumura D., Jain R.K. (2002) "Vascular accumulation of a novel photosensitizer, MV6401, causes selective thrombosis in tumor vessels after photodynamic therapy" *Cancer Res.* **62**, 2151-2156.
- ✓ Dougherty T.J. (2002) "An update on photodynamic therapy applications" *J. Clin. Laser Med. Surg.* **20**, 3-7.
- ✓ Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korblik M., Moan J., Peng Q. (1998) "Photodynamic therapy" *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 889-905.

- ✓ Dougherty T.J., Sumlin A.B., Greco W.R., Weishaupt K.R., Vaughan L.A., Pandey R.K. (2002) "The role of the peripheral benzodiazepine receptor in photodynamic activity of certain pyropheophorbide ether photosensitizers: albumin site II as a surrogate marker for activity" *Photochem. Photobiol.* **76**, 91-97.
- ✓ Edell E.S., Cortese D.A. (1992) "Photodynamic therapy in the management of early superficial squamous cell carcinoma as an alternative to surgical resection" *CHEST* **102**, 1319-1322.
- ✓ Farokhzad O.C., Cheng J., Teply B.A., Sherifi I., Jon S., Kantoff P.W., Richie J.P., Langer R. (2006) "Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 6315-6320.
- ✓ Farokhzad O.C., Langer R. (2009) "Impact of nanotechnology on drug delivery" *ACS Nano* **3**, 16-20.
- ✓ Ferrari M. (2005) "Cancer nanotechnology: opportunities and challenges" *Nat. Rev. Cancer* **5**, 161-171.
- ✓ Foote C.S. (1976) "Photosensitized oxidation and singlet oxygen in biological system" in: "*Free Radicals in Biology*" (ed. Pryor W.A.) pp. 85 Academic Press, New York.
- ✓ Frank M.M. (1993) "The reticuloendothelial system and bloodstream clearance" *J. Lab. Clin. Med.* **122**, 487-488.
- ✓ Friedrich S.W., Lin S.C., Stoll B.R., Baxter L.T., Munn L.L., Jain R.K. (2002) "Antibody-directed effector cell therapy of tumors: analysis and optimization" *Neoplasia* **4**, 449-463.
- ✓ Gabizon A.A. (2001) "Stealth liposomes and tumor targeting: one step further in the quest for the magic bullet" *Clin. Cancer Res.* **7**, 223-225.
- ✓ Gao D., Xu H., Philbert M.A., Kopelman R. (2007) "Ultrafina hydrogel nanoparticles: synthetic approach and therapeutic application in living cells" *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 2224-2227.
- ✓ Gibson S.L., Murant R.S., Hilf R. (1988) "Photosensitizing effects of hematoporphyrin derivative and Photofrin II on the plasma membrane enzymes 5'-nucleotidase, Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>-ATPase, and Mg<sup>2+</sup>-ATPase in R3230AC rat mammary adenocarcinomas" *Cancer Res.* **48**, 3360-3366.
- ✓ Goff B.A., Bamberg M., Hasan T. (1991) "Photoimmunotherapy of human ovarian carcinoma cells ex vivo" *Cancer Res.* **51**, 4762-4767.
- ✓ Gomer C.J. (1991) "Preclinical examination of first and second generation photosensitizers used in photodynamic therapy" *Photochem. Photobiol.* **54**, 1093-1107.
- ✓ Gomer C.J., Ferrario A., Luna M.C., Rucker N., Wong S. (1990) "Basic mechanisms and subcellular targets related to PDT" *SPIE* **6**, 139.
- ✓ Gomer C.J., Luna M., Ferrario A., Rucker N. (1991) "Increased transcription and translation of heme oxygenase in Chinese hamster fibroblasts following

- photodynamic stress or Photofrin II incubation” *Photochem. Photobiol.* **53**, 275-279.
- ✓ Gomer C.J., Ryter S.W., Ferrario A., Rucker N., Wong S., Fisher A.M. (1996) “Photodynamic therapy-mediated oxidative stress can induce expression of heat shock proteins” *Cancer Res.* **56**, 2355-2360.
  - ✓ Gu F., Zhang L., Teply B.A., Mann N., Wang A., Radovic-Moreno A.F., Langer R., Farokhzad O.C. (2008) “Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 2586-2591.
  - ✓ Gref R., Minamitake Y., Peracchia M.T., Trubetskoy V., Torchilin V., Langer R. (1994) “Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres” *Science* **263**, 1600-1603.
  - ✓ Hadjur C., Lange N., Rebstein J., Monnier P., van den Bergh H., Wagnières G. (1998) “Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta(tetrahydroxyphenyl)chlorine (mTHPC) used in photodynamic therapy. The production of singlet oxygen by mTHPC” *J. Photochem. Photobiol. B* **45**, 170-178.
  - ✓ Hamaguchi T., Matsumura Y., Suzuki M., Shimizu K., Goda R., Nakamura I., Nakatomi I., Yokoyama M., Kataoka K., Kakizoe T. (2005) “NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend in vivo antitumour activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel” *Br. J. Cancer* **92**, 1240-1246.
  - ✓ He X., Nie H., Wang K., Tan W., Wu X., Zhang P. (2008) “In vivo study of biodistribution and urinary excretion of surface-modified silica nanoparticles” *Anal. Chem.* **80**, 9597-9603.
  - ✓ Henderson B.W. and Dougherty T.J. (1992) “How does photodynamic therapy work?” *Photochem. Photobiol.* **55**, 145-157.
  - ✓ Hilf R., Smail D.B., Murant R.S., Gibson S.L. (1984) “Hematoporphyrin derivative-induced photosensitivity of mitochondrial succinate dehydrogenase and selected cytosolic enzymes of R323OAC mammary adenocarcinomas” *Cancer Res.* **44**, 1483-1488.
  - ✓ Hilgenbrink A.R., Low P.S. (2005) “Folate receptor-mediated drug targeting: from therapeutics to diagnostics” *J. Pharm. Sci.* **94**, 2135-2146.
  - ✓ Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C.C. (1991) “p53 mutation in human cancers” *Science* **253**, 49-53.
  - ✓ Hopkinson H.J., Vernon D.I., Brown S.B. (1999) “Identification and partial characterization of an unusual distribution of the photosensitizer meta-tetrahydroxyphenylchlorin (temoporphin) in human plasma” *Photochem. Photobiol.* **69**, 482-488.
  - ✓ Hornung R., Jentsch B., Crompton N.E., Haller U., Walt H. (1997) “In vitro effects and localisation of the photosensitizers m-THPC MD on carcinoma cells of the human breast (MCF-7) and Chinese hamster fibroblasts (V-79)” *Lasers Surg. Med.* **20**, 443-450.

- ✓ Jain R.K. (1987) "Transport of molecules across tumor vasculature" *Cancer Metastasis Rev.* **6**, 559-593.
- ✓ Jia G., Wang H., Yan L., Wang X., Pei R., Yan T., Zhao Y., Guo X. (2005) "Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene" *Environ. Sci. Technol.* **39**, 1378-1383.
- ✓ Jones B.U., Helmy M., Brenner M., Serna D.L., Williams J., Chen J.C., Milliken J.C. (2001) "Photodynamic therapy for patients with advanced non-small-cell carcinoma of the lung" *Clin. Lung Cancer* **3**, 37-41.
- ✓ Jones M.C., Leroux J.C. (1999) "Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers" *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **48**, 101-111.
- ✓ Jong W.H.D., Borm P.J.A. (2008) "Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards" *Int. J. Nanomed.* **3**, 133-149.
- ✓ Jori G. (1980) "The molecular biology of photodynamic action" in: "*Laser in Photomedicine and Photobiology*" (ed. Pratesi R., Sacchi C.A.) pp. 58 Springer-Verlag, Berlin.
- ✓ Joshi P.G., Joshi K., Mishra S., Joshi N.B. (1994) "Ca<sup>2+</sup> influx induced by photodynamic action in human cerebral glioma (U-87 MG) cells: possible involvement of a calcium channel" *Photochem. Photobiol.* **60**, 244-248.
- ✓ Juzeniene A., Moan J. (2007) "The history of PDT in Norway. Part one-identification of basic mechanisms of general PDT" *Photodiag. Photodyn. Ther.* **4**, 3-11.
- ✓ Kaewamatawong T., Shimada A., Obajima M., Inov H., Morita T., Inov K. (2006) "Acute and subacute pulmonary toxicity of low dose of ultrafine colloidal silica particles in mice after intratracheal instillation" *Toxicol. Pathol.* **34**, 956-958.
- ✓ Kato H. (1990) "Photodynamic therapy of early cancer" in: "*Phototherapy of Cancer*" (ed. Morstyn G., Kaye A.H.) pp. 133, Harwood Academic Publishers, Chur.
- ✓ Ketabchi A., MacRobert A., Speight P.M., Bennett J.H. (1998) "Induction of apoptotic cell death by photodynamic therapy in human keratinocytes" *Arch. Oral Biol.* **43**, 143-149.
- ✓ Kennedy J.C., Pottier R.H., Pross D.C. (1990) "Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience" *J. Photochem. Photobiol.* **6**, 143-148.
- ✓ Kennedy J.C., Marcus S.L., Pottier R.H. (1996) "Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): mechanisms and clinical results" *J. Clin. Laser Med. Surg.* **14**, 289-304.
- ✓ Kessel D., Luo Y. (1999) "Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis" *Cell Death Differ.* **6**, 28-35.

- ✓ Kessel D., Luo Y., Deng Y., Chang C.K. (1997) "The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy" *Photochem. Photobiol.* **65**, 422-426.
- ✓ Kessel D., Oleinick N.L. (2009) "Initiation of autophagy by photodynamic therapy" *Methods Enzymol.* **453**, 1-16.
- ✓ Kessel D., Woodburn K., Henderson B.W., Chang C.K. (1995) "Sites of photodamage *in vivo* and *in vitro* by a cationic porphyrin" *Photochem. Photobiol.* **62**, 875-881.
- ✓ Khalil M.Y., Grandis J.R., Shin D.M. (2003) "Targeting epidermal growth factor receptor: novel therapeutics in the management of cancer" *Expert Rev. Anticancer Ther.* **3**, 367-380.
- ✓ Kipen H.M., Laskin D.L. (2005) "Smaller is not always better: nanotechnology yields nanotoxicology" *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **289**, L696-L697.
- ✓ Klajnert B., Bryszewska M. (2001) "Dendrimers: properties and applications" *Acta Biochim. Pol.* **48**, 199-208.
- ✓ Klibanov A.L., Maruyama K., Torchilin V.P., Huang L. (1990) "Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes" *Febs Lett.* **268**, 235-237.
- ✓ Konan Y.N., Berton M., Gurny R., Allemann E. (2003) "Enhanced photodynamic activity of meso-tetra(4-hydroxyphenyl)porphyrin by incorporation into sub-200 nm nanoparticles" *Eur. J. Pharm. Sci.* **18**, 241-249.
- ✓ Konan Y.N., Gurny R., Allemann E. (2002) "State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy" *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **66**, 89-106.
- ✓ Kumar R., Roy I., Ohulchanskyy T.Y., Goswami L.N., Bonoiu A.C., Bergey E.J., Trampusch K.M., Maitra A., Prasad P.N. (2008) "Covalently dye-linked, surface-controlled, and bioconjugated organically modified silica nanoparticles as targeted probes for optical imaging" *ACS Nano* **2**, 449-456.
- ✓ Kuwano H., Kato H., Miyazaki T., Fukuchi M., Masuda N., Nakajima M., Fukai Y., Sohda M., Kimura H., Faried A. (2005) "Genetic alterations in esophageal cancer" *Surg. Today* **35**, 7-18.
- ✓ Leroux J.C., Allemann E., De Jaeghere F., Doelker E., Gurny R. (1996) "Biodegradable nanoparticles from sustained release formulations to improved site specific drug delivery" *J. Control. Release* **39**, 339-350.
- ✓ Lesniak W., Bielinska A.U., Sun K., Janczak K.W., Shi X., Baker J.R., Balogh L.P. (1995) "Silver/dendrimer nanocomposites as biomarkers: fabrication, characterization, *in vitro* toxicity and intracellular detection" *Nano Lett.* **5**, 2123-2130.
- ✓ Levy J.G. (1995) "Photodynamic therapy" *Trends Biotechnol.* **13**, 14-18.
- ✓ Lewansk C.R., Stewart S. (1999) "PEGylated liposomal adriamycin: a review of current and future applications" *Pharma. Sci. Technol. Today* **2**, 473-477.

- ✓ Leung W.N., Sun X., Mak N.K., Yow C.M. (2002) "Photodynamic effects of mTHPC on human colon adenocarcinoma cells: photocytotoxicity, subcellular localization and apoptosis" *Photochem. Photobiol.* **75**, 406-411.
- ✓ Lin W., Huang Y., Zhou X.D., Ma Y. (2006) "In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells" *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **217**, 252-259.
- ✓ Liong M., Lu J., Kovoichich M., Xia T., Zink J.I. (2008) "Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery" *ACS Nano* **2**, 889-896.
- ✓ Luna M.C., Ferrario A., Wong S., Fisher A.M.R., Gomer C.J. (2000) "Photodynamic therapy-mediated oxidative stress as a molecular switch for the temporal expression of genes ligated to the human heat shock promoter" *Cancer Res.* **60**, 1637-1644.
- ✓ Luna M.C., Wong S., Gomer C.J. (1994) "Photodynamic therapy mediated induction of early response genes" *Cancer Res.* **54**, 1374-1380.
- ✓ Marcon N.E. (1994) "Photodynamic therapy and cancer of the esophagus" *Semin. Oncol.* **21**, 20-23.
- ✓ Mathur P.N., Edell E., Sutedja T., Vergnon J.M. (2003) "Treatment of early stage non-small cell lung cancer" *CHEST* **123**, 176-180.
- ✓ Matsumura Y., Gotoh M., Muro K., Yamada Y., Shirao K., Shimada Y., Okuwa M., Matsumoto S., Miyata Y., Ohkura H., Chin K., Baba S., Yamao T., Kannami A., Takamatsu Y., Ito K., Takahashi K. (2004) "Phase I and pharmacokinetic study of MCC-465, a doxorubicin (DXR) encapsulated in PEG immunoliposome, in patients with metastatic stomach cancer" *Ann. Oncol.* **15**, 517-525.
- ✓ McAteer M.A., Sibson N.R., von Zur Muhlen C., Schneider J.E., Lowe A.S., Warrick N., Channon K.M., Anthony D.C., Choudhury R.P. (2007) "In vivo magnetic resonance imaging of acute brain inflammation using microparticles of iron oxide" *Nat. Med.* **13**, 1253-1258.
- ✓ McBride G. (2002) "Studies expand potential uses of photodynamic therapy" *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 1740-1742.
- ✓ MedBiopharm Co. L. (2008) "Safety study of MBP-426 (liposomal oxaliplatin suspension for injection) to treat advanced or metastatic solid tumors" *Clinical Trials.gov [web site]*, <http://www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00355888>.
- ✓ Medina C., Santos-Martinez M.J., Radomski A., Corrigan O.I., Radomski M.W. (2007) "Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance" *Br. J. Pharmacol.* **150**, 552-558.
- ✓ Medintz I.L., Uyeda H.T., Goldman E.R., Mattoussi H. (2005) "Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing" *Nat. Mater.* **4**, 435-446.
- ✓ Melnikova V.O., Bezdetnaya L.N., Bour C., Festor E., Gramain M.P., Merlin J.L., Potapenko A., Guillemin F. (1999) "Subcellular localisation of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin in human tumor cells subjected to photodynamic treatment" *J. Photochem. Photobiol. B* **49**, 96-103.

- ✓ Moan J. (1986) "Porphyrin photosensitization and phototherapy" *Photochem. Photobiol.* **43**, 681-690.
- ✓ Moan J., Berg K. (1991) "The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen" *Photochem. Photobiol.* **53**, 549-553.
- ✓ Moan J., Christensen T. (1981) "Cellular uptake and photodynamic effect of hematoporphyrin" *Photobiochem. Photobiophys.* **2**, 291-299.
- ✓ Moan J., McGhie J., Jacobsen P.B. (1983) "Photodynamic effects on cells *in vitro* exposed to hematoporphyrin derivative and light" *Photochem. Photobiol.* **37**, 599-604.
- ✓ Moan J., Sommer S. (1985) "Oxygen dependence of the photosensitizing effect of hematoporphyrin derivative in NHIK 3025 cells" *Cancer Res.* **45**, 1608-1610.
- ✓ Monteiller C., Tran L., MacNee W., Faux S., Jones A., Miller B., Donaldson K. (2007) "The pro-inflammatory effects of low toxicity low solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cell *in vitro*: the role of surface area" *Occup. Environ. Med.* **64**, 609-615.
- ✓ Moor A.C.E. (2000) "Signaling in cell death and survival after photodynamic therapy" *J. Photochem. Photobiol.* **57**, 1-13.
- ✓ Morlière P., Mazière J.C., Santus R., Smith C.D., Prinsep M.R., Stobbe C.C., Fenning M.C., Golberg J.L., Chapman J.D. (1998) "Tolyporphin: a natural product from cyanobacteria with potent photosensitizing activity against tumor cells *in vitro* and *in vivo*" *Cancer Res.* **58**, 3571-3578.
- ✓ Murrer L.H.P., Marijnissen J.P.A., Star W.M. (1997) "Improvements in the design of linear diffusers for photodynamic therapy" *Phys. Med. Biol.* **42**, 1461-1464.
- ✓ Nel A., Xia T., Mädler L., Li N. (2006) "Toxic potential of materials at the nanolevel" *Science* **311**, 622-667.
- ✓ Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. (2005) "Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles" *Environ. Health Perspect.* **113**, 823-839.
- ✓ Ochsner M. (1997) "Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors" *J. Photochem. Photobiol.* **39**, 1-18.
- ✓ Ohulchanskyy T.Y., Roy I., Goswami L.N., Chen Y., Bergey E.J., Pandey R.K., Oseroff A.R., Prasad P.N. (2007) "Organically modified silica nanoparticles with covalently incorporated photosensitizer for photodynamic therapy of cancer" *Nano Lett.* **7**, 2835-2842.
- ✓ Oleinick N.L., Evans H.H. (1998) "The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms" *Radiat. Res.* **150**, 146-156.
- ✓ Oleinick N.L., Morris R.L., Belichenko I. (2002) "The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how" *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**, 1-21.
- ✓ Orive G., Anitua E., Pedraz J.L., Emerich D.F. (2009) "Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration" *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 682-692.

- ✓ Owens D.E. 3rd, Peppas N.A. (2006) "Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles" *Int. J. Pharm.* **307**, 93-102.
- ✓ Pagona G. e Tagmatarchis N. (2006) "Carbon nanotubes: materials for medicinal chemistry and biotechnological applications" *Curr. Med. Chem.* **13**, 1789-1798.
- ✓ Palumbo G. (2007) "Photodynamic therapy and cancer: a brief sightseeing tour" *Expert Opin. Drug Deliv.* **4**, 131-148.
- ✓ Pass H.I. (1993) "Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use" *J. Natl. Cancer Inst.* **85**, 443-456.
- ✓ Pazos M.D.C., Nader H.B. (2007) "Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components" *Braz. J. Med. Biol. Res.* **40**, 1025-1035.
- ✓ Pegaz B., Debeve E., Ballini J.P., Wagnières G., Spaniol S., Albrecht V., Scheglmann D.V., Nifantiev N.E., van den Bergh H., Konan-Konakou Y.N. (2006) "Photothrombic activity of mTHPC-loaded liposomal formulations: pre-clinical assessment on chick chorioallantoic membrane model" *Eur. J. Pharm. Sci.* **28**, 134-140.
- ✓ Peng Q., Moan J., Nesland J.M. (1996) "Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy" *Ultrastruct. Pathol.* **20**, 109-129.
- ✓ Peng Q., Warloe T., Berg K., Moan J., Kongshaug M., Giercksky K.E., Nesland J.M. (1997) "5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: clinical research and future challenges" *Cancer* **79**, 2282-2308.
- ✓ Plaetzer K., Krammer B., Berlanda J., Berr F., Kiesslich T. (2008) "Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects" *Laser Med. Sci.* **1**, 1-15.
- ✓ Polizu S., Savadogo O., Poulin P., Yahia L. (2006) "Applications of carbon nanotubes-based biomaterials in biomedical nanotechnology" *J. Nanosci. Nanotechnol.* **6**, 1883-1904.
- ✓ Portney N.G., Ozkan M. (2006) "Nano-oncology: drug delivery, imaging, and sensing" *Anal. Bioanal. Chem.* **384**, 620-630.
- ✓ Pytel A., Schmeller N. (2002) "New aspect of photodynamic diagnosis of bladder tumours: fluorescence cytology" *Urology* **59**, 216-219.
- ✓ Qiu L.Y., Bae Y.H. (2006) "Polymer architecture and drug delivery" *Pharma Res.* **23**, 1-30.
- ✓ Radomski A., Jurasz P., Alonso-Escolano D., Drews M., Morandi M., Malinski T., Radomski M.W. (2005) "Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis" *Br. J. Pharmacol.* **146**, 882-893.
- ✓ Radu A., Wagnieres G., van den Bergh H., Monnier P. (2000) "Photodynamic therapy of early squamous cell cancers of the esophagus" *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.* **10**, 439-460.

- ✓ Richter A.M., Waterfield E., Jain A.K., Canaan A.J., Allison B.A., Levy J.G. (1993) "Liposomal delivery of a photosensitizer, benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD), to tumor tissue in a mouse tumor model" *Photochem. Photobiol.* **57**, 1000-1006.
- ✓ Ris H.B., Altermatt H.J., Nachbur B., Stewart J.C., Wang Q., Lim C.K., Bonnett R., Althaus U. (1993) "Effect of drug-light interval on photodynamic therapy with meta-tetrahydroxyphenylchlorin in malignant mesothelioma" *Int. J. Cancer.* **53**, 141-146.
- ✓ Roland C.L., Harken A.H., Sarr M.G., Barnett C.C. (2007) "Evidence-based surgical hypothesis: ICAM-1 expression determines malignant potential of cancer" *J. Surg.* **141**, 705-707.
- ✓ Roy I., Ohulchanskyy T.Y., Pudavar H.E., Bergey E.J., Oseroff A.R., Morgan J., Dougherty T.J., Prasad P.N. (2003) "Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy" *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 7860-7865.
- ✓ Saffiotti U. (1992) "Lung cancer induction by crystalline silica" *Prog. Clin. Biol. Res.* **374**, 51-69.
- ✓ Salet C., Moreno G. (1995) "Photodynamic action increases leakage of the mitochondrial electron transport chain" *Int. J. Radiat. Biol.* **67**, 477-480.
- ✓ Salet C., Moreno G., Vinzens F. (1983) "Effects of photodynamic action on energy coupling of Ca<sup>2+</sup> uptake in liver mitochondria" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**, 76-81.
- ✓ Santonocito C., Concolino P., Lavieri M.M., Ameglio F., Gentileschi S., Capizzi R., Rocchetti S., Amerio P., Castagnola M., Zuppi C., Capoluongo E. (2005) "Comparison between three molecular methods for detection of blood melanoma tyrosinase mRNA. Correlation with melanoma stages and S100B, LDH, NSEbiochemical markers" *Clin. Chim. Acta* **362**, 85-95.
- ✓ Sanvicens N., Marco M.P. (2008) "Multifunctional nanoparticles-properties and prospects for their use in human medicine" *Trends Biotechnol.* **26**, 425-433.
- ✓ Sasnouski S., Zorin V., Khludeyev I., D'Hallewin M.A., Guillemin F., Bezdetnaya L. (2005) "Investigation of Foscan interactions with plasma proteins" *Biochim. Biophys. Acta* **1725**, 394-402.
- ✓ Savary J.F., Monnier P., Fontolliet C., Mizeret J., Wagnières G., Braichotte D., van den Bergh H. (1997) "Photodynamic therapy for early squamous cell carcinomas of the esophagus, bronchi, and mouth with meta-tetrahydroxyphenylchlorin" *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **123**, 162-168.
- ✓ Sawai H., Hannun Y.A. (1999) "Ceramide and sphingomyelinases in the regulation of stress responses" *Chem. Phys. Lipids* **102**, 141-147.
- ✓ Schuitmaker J.J., Baas P., van Leengoed H.L.L.M., van der Meulen F.W., Star W.M., van Zandwijk N. (1996) "Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment of cancer" *J. Photochem. Photobiol.* **34**, 3-12.

- ✓ Sharman W.M., Allen C.M., van Lier J.E. (1999) "Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications" *Drug. Discov. Today* **4**, 507-517.
- ✓ Short B., Barr F.A. (2000) "The Golgi apparatus" *Curr. Biol.* **10**, R583-R585.
- ✓ Shvedova A.A., Castranova V., Kisin E.R., Shwegler-Berry D., Murray A.R., Gandelsman V.Z., Maynard A., Baron P. (2003) "Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells" *J. Toxicol. Environ. Health A* **66**, 1909-1926.
- ✓ Sibata C.H., Colussi V.C., Oleinick N.L., Kinsella T.J. (2001) "Photodynamic therapy in oncology" *Expert. Opin. Pharmacother.* **2**, 917-927.
- ✓ Singh R., Lillard J.W. (2009) "Nanoparticle-based targeted drug delivery" *Exp. Mol. Pathol.* **86**, 215-223.
- ✓ Specht K.G., Rodgers M.A. (1990) "Depolarization of mouse myeloma cell membranes during photodynamic action" *Photochem. Photobiol.* **51**, 319-324.
- ✓ Sutedja T.G., Postmus P.E. (1996) "Photodynamic therapy in lung cancer. A review" *J. Photochem. Photobiol.* **36**, 199-204.
- ✓ Svaasand L.O., Martinelli E., Gomer C.G., Profio A.E. (1990) "Optical characteristics of intraocular tumours in the visible and near-infrared" *Photodynamic Therapy: mechanism II* SPIE, Bellingham, Washington, **1203**, p. 2.
- ✓ Swamy N., James D.A., Mohr S.C., Hanson R.N., Ray R. (2002) "An estradiol-porphyrin conjugate selectively localizes into estrogen receptor-positive breast cancer cells" *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 3237-3243.
- ✓ SynerGene Therapeutics I. (2008) "Safety study of infusion of SGT-53 to treat solid tumors" *ClinicalTrials.gov* [web site], <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00470613>.
- ✓ Tang W., Xu H., Kopelman R., Philbert M.A. (2005) "Photodynamic characterization and in vitro application of methylene blue-containing nanoparticle platforms" *Photochem. Photobiol.* **81**, 242-249.
- ✓ Tanielian C., Schweitzer C., Mechin R., Wolff C. (2001) "Quantum yield of singlet oxygen production by monomeric and aggregated forms of hematoporphyrin derivative" *Free Radical Bio. Med.* **30**, 208-212.
- ✓ Tannock I.F., Rotin D. (1989) "Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation" *Cancer Res.* **49**, 4373-4384.
- ✓ Teiten M.H., Bezdetnaya L., Merlin J.L., Bour-Dill C., Pauly M.E., Dicato M., Guillemin F. (2001) "Effect of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorine (mTHPC)-mediated photodynamic therapy on sensitive and multidrug-resistant human breast cancer cells" *J. Photochem. Photobiol. B* **62**, 146-152.
- ✓ Teiten M.H., Bezdetnaya L., Morlière P., Santus R., Guillemin F. (2003) "Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan® localisation in cultured tumour cells" *Br. J. Cancer* **88**, 146-152.

- ✓ Terasaki M., Song J., Wong J.R., Weiss M.J., Chen L.B. (1984) "Localisation of endoplasmic reticulum in living and glutaraldehyde-fixed cells with fluorescent dyes" *Cell* **38**, 101-108.
- ✓ Thomas J.P., Girotti A.W. (1989) "Role of lipid peroxidation in hematoporphyrin derivative-sensitized photokilling of tumor cells: protective effects of glutathione peroxidase" *Cancer Res.* **49**, 1682-1686.
- ✓ Tong R., Cheng J.J. (2007) "Anticancer polymeric nanomedicines" *Polym. Rev.* **47**, 345-381.
- ✓ Torchilin V.P. (2005) "Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers" *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 145-160.
- ✓ Unfried K., Albrecht C., Klotz L., von Mikecz A., Grether-Beck S., Schins R.P.F. (2007) "Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms" *Nanotoxicol.* **1**, 52-71.
- ✓ Verma A., Facchina S.L., Hirsch D.J., Song S.Y., Dillahey L.F., Williams J.R., Snyder S.H. (1995) "Photodynamic tumor therapy: mitochondrial benzodiazepine receptor ligands" *Br. J. Cancer* **71**, 300-305.
- ✓ Vrouwenraets M.B., Visser G.W.M., Stewart F.A., Stigter M., Oppelaar H., Postmus P.E., Snow G.B., van Dongen G.A.M.S. (1999) "Development of meta-tetrahydroxyphenylchlorin-monoclonal antibody conjugates for photoimmunotherapy" *Cancer Res.* **59**, 1505-1513.
- ✓ Wang X., Wang Y., Chen Z., Shin D.M. (2009) "Advances of cancer therapy by nanotechnology" *Cancer Res. Treat.* **41**, 1-11.
- ✓ Weissleder R., Elizondo G., Wittenberg J., Lee A.S., Josephson L., Brady T.J. (1990) "Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: an intravenous contrast agent for assesing linph nodes with MR imaging" *Radiology* **175**, 494-498.
- ✓ Wistuba I.I., Bryant D., Behrens C., Milchgrub S., Virmani A.K., Ashfaq R., Minna J.D., Gazdar A.F. (1999) "Comparison of features of human lung cancer cell lines and their corresponding tumors" *Clin. Cancer Res.* **5**, 991-1000.
- ✓ Xu C.J., Sun S.H. (2007) "Monodisperse magnetic nanoparticles for biomedical applications" *Polym. Int.* **56**, 821-826.
- ✓ Xue L.Y., Chiu S.M., Oleinick N.L. (2001) "Photodynamic therapy-induced death of MCF-7 human breast cancer cells: a role for caspase-3 in the late steps of apoptosis but not for the critical lethal event" *Exp. Cell Res.* **263**, 145-155.
- ✓ Xue L.Y., He J., Oleinick N.L. (1997) "Rapid tyrosine phosphorylation of HS1 in the response of mouse lymphoma L5178-R cells to photodynamic treatment sensitized by the phthalocyanine Pc 4" *Photochem. Photobiol.* **66**, 105-113.
- ✓ Xue Z.G., Zhu S.H., Pan Q., Liang D.S., Li Y.M., Liu X.H., Xia K., Xia J.H. (2006) "Biototoxicology and biodynamics of silica nanoparticle" *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* **31**, 6-8.
- ✓ Yan F., Kopelman R. (2003) "The embedding of meta-tetra(hydroxyphenyl)-chlorin into silica nanoparticles platforms for photodynamic therapy and their singlet

- oxygen production and pH-dependent optical properties” *Photochem. Photobiol.* **78**, 587-591.
- ✓ Yang J., Bhalla K., Kim C.N., Ibrado A.M., Peng T.I., Jones D.P., Wang X. (1997) “Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked” *Science* **275**, 1129-1132.
  - ✓ Yang J., Lee C.H., Ko H.J., Suh J.S., Yoon H.G., Lee K., Huh Y.M., Haam S. (2007) “Multifunctional magneto-polymeric nanohybrids for targeted detection and synergistic therapeutic effects on breast cancer” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **46**, 8836-8839.
  - ✓ Yow C.M.N., Chen J.Y., Mak N.K., Cheung N.H., Leung A.W.N. (2000) “Cellular uptake, subcellular localization and photodamaging effect of temoporfin (mTHPC) in nasopharyngeal carcinoma cells: comparison with hematoporphyrin derivative” *Cancer Lett.* **157**, 123-131.
  - ✓ Zaidi S.I., Oleinick N.L., Zaim M.T., Mukhtar H. (1993) “Apoptosis during photodynamic therapy-induced ablation of RIF-1 tumors in C3H mice: electron microscopic, histopathologic and biochemical evidence” *Photochem. Photobiol.* **58**, 771-776.
  - ✓ Zhang Y., Chen W., Zhang J., Liu J., Chen G., Pope C. (2007) “In vitro and in vivo toxicity of CdTe nanoparticles” *J. Nanosci. Nanotechnol.* **7**, 497-503.
  - ✓ Zimmermann A., Ritsch-Marte M., Kostron H. (2002) “In vitro investigation on the pH dependence of the absorption and fluorescence properties of the photosensitizer mTHPC” *Photochem. Photobiol.* **75**, 335-338.

## PUBBLICAZIONI

1. **Compagnin C.**, Baù L., Mognato M., Celotti L., Miotto G., Arduini M., Moret F., Fede C., Selvestrel F., Rio Echevarria IM., Mancin F., Reddi E. “The cellular uptake of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin entrapped in organically modified silica nanoparticles is mediated by serum proteins”. *Nanotechnology*. 2009 Aug 26; 20(34):345101-345112.
2. **Compagnin C.** and Mognato M., Celotti L., Canti G., Palumbo G., Reddi E. “Cell proliferation and cell cycle alterations in oesophageal p53-mutated cancer cells treated with cisplatin combined with photodynamic therapy”. *Cell Proliferation*. Accepted Aug-2009, in press.

## IL CONTENUTO DI QUESTA TESI E' STATO PRESENTATO A CONGRESSI NAZIONALI ED INTERNAZIONALI

1. **C. Compagnin**, M. Mognato, L. Baù, F. Mancin, L. Celotti and E. Reddi “*Organic-modified silica (ORMOSIL) nanoparticles for the delivery of photosensitizers to cancer cells*”. Joint Conference on “Nanotechnology: implications for human health, the environment and food safety”, Dublin (Ireland), 2 novembre 2007.  
**Premiato come “Best Poster Presentation”.**
2. **C. Compagnin**, C. Fede, F. Moret, M. Mognato, E. Reddi and L. Celotti “*Organic modified silica (ORMOSIL) nanoparticles for the delivery of photosensitizer mTHPC to cancer cells*”. Conference on “Nanotec2008.it-Nanotechnology for Industry 2015”, Venezia, 10-14 marzo 2008.
3. **C. Compagnin**, M. Mognato, L. Baù, F. Mancin, L. Celotti, E. Reddi “*Delivery of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorine (mTHPC) in organically-modified silica (ORMOSIL) nanoparticles to cancer cells*”.  
**Premiato come “Best Poster Presentation”.**  
**C. Compagnin**, L. Celotti, M. Mognato, E. Reddi “*Photosensitizer-loaded nanoparticles for improving the efficacy and selectivity of photodynamic therapy of tumours*”.  
**Presentato come comunicazione orale.**  
5<sup>th</sup> Conference on “Experimental and Translational Oncology”, Kranjska gora (Slovenia), 26-30 marzo 2008.
4. C. Fede, **C. Compagnin**, M. Mognato, A. Lembo, F. Selvestrel, E. Reddi, L. Celotti “*Cytotoxicity of nanostructures*”. 38<sup>th</sup> Annual Meeting on “Environmental Mutagens and Human Health”, Cavtat (Croazia), 21-25 settembre 2008.

5. **C. Compagnin**, F. Moret, M. Mognato, L. Baù, F. Mancin, L. Celotti and E. Reddi “*Organically-modified silica nanoparticles for the delivery of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin*”. 7<sup>th</sup> International Symposium on “Photodynamic Therapy and Photodiagnosis in Clinical Practice”, Bressanone, 7-11 ottobre 2008.
  6. F. Moret, **C. Compagnin**, I. Rio, F. Selvestrel, M. Mognato, L. Celotti, F. Mancin, E. Reddi “*Nanovehicles loaded with meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorine for photodynamic treatment of cancer*”. 6<sup>th</sup> International Workshop on “Biomedical Applications of Nanotechnology”, Berlin (Germany), 4-6 marzo 2009.
  7. **C. Compagnin**, F. Mancin, F. Moret, E. Papini, I. Rio Echevarria, D. Segat, F. Selvestrel, R. Tavano, E. Reddi “*Nanosistemi per ottimizzare la terapia fotodinamica dei tumori: vantaggi e limitazioni*”. Congresso Annuale 2009 Società Italiana di Fotobiologia, Locorotondo, 4-5 giugno 2009.  
**Presentato come comunicazione orale.**
  8. **C. Compagnin**, F. Mancin, F. Moret, E. Papini, I. Rio Echevarria, D. Segat, F. Selvestrel, R. Tavano, E. Reddi “*PEGylated ORMOSIL nanoparticles as potential nanocarriers of photodynamic agents for tumours*”.  
**Presentato come comunicazione orale.**
- C. Compagnin**, F. Moret, L. Celotti, D. Scheglmann, S. Iratni and E. Reddi “*PEGylated liposomes as nanovehicles of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin*”.
- 13<sup>th</sup> Congress of the European Society for Photobiology in conjunction with the 2<sup>nd</sup> Conference of the European Platform for Photodynamic Medicine, Wroclaw (Poland), 5-10 settembre 2009.