



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : BIOCHIMICA E BIOTECNOLOGIE

INDIRIZZO: BIOCHIMICA E BIOFISICA

CICLO XX

***STUDIO DI DERIVATI TETRAPIRROLICI BORONATI COME AGENTI FOTO- E RADIO-
SENSIBILIZZANTI PER IL TRATTAMENTO DEL MELANOMA MELANOTICO
MEDIANTE TERAPIA COMBINATA PDT-BNCT.***

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Zanotti

Supervisore : Ch.mo Prof. Giulio Jori

Dottorando : Dott.ssa Elisabetta Friso

31 Dicembre 2008

Riassunto

La terapia fotodinamica (PDT) e la terapia per cattura di neutroni da parte del boro (BNCT) sono due modalità terapeutiche attualmente utilizzate in campo antitumorale. In entrambi i casi, un sensibilizzatore intrinsecamente privo di effetti citotossici viene somministrato per via sistemica al paziente che successivamente viene irradiato con luce rossa ($\lambda > 600$ nm) nel caso della PDT o neutroni termici nel caso della BNCT. L'attività di ricerca svolta durante questa tesi era finalizzata ad accertare la possibilità di utilizzare un unico agente come foto- e radio-sensibilizzante per il trattamento del melanoma melanotico. Il melanoma melanotico è un tumore molto aggressivo e difficilmente curabile con le terapie attualmente in uso.

La PDT consiste nell'utilizzo di due principi attivi (luce e fotosensibilizzatore), la cui azione combinata promuove una serie di eventi fotofisici che risultano nella generazione di una specie iperreattiva dell'ossigeno, noto come ossigeno di singoletto. Questo può diffondere entro distanze assai brevi (dell'ordine di $0.1 \mu\text{m}$) dal sito di produzione in quanto reagisce molto efficacemente con numerosi costituenti cellulari quali lipidi insaturi, amminoacidi aromatici e nucleotidi presenti nel suo microintorno. La necessità di combinare questi due fattori consente di ottenere un'elevata selettività negli effetti del fotodanno e nell'attività fototerapeutica.

La BNCT è basata sull'elevata selettività di interazione del ^{10}B , un isotopo non radioattivo del boro, con neutroni termici a bassa energia per dare ^{11}B ; tale specie è instabile e la sua fissione produce due particelle molto veloci ^7Li ed ^4He (o particella α), che provocano morte cellulare agendo in un microintorno minore del diametro cellulare a causa del loro breve cammino libero. L'azione citotossica circoscritta sia dell'ossigeno di singoletto che delle particelle veloci permette ad entrambi i trattamenti di garantire una localizzazione dell'effetto terapeutico a livello del tessuto in cui viene accumulata la molecola. Di

conseguenza, per minimizzare il danno a livello dei tessuti sani, è molto importante ottenere un'elevata concentrazione della sostanza nel tessuto tumorale rispetto al tessuto peritumorale.

Le molecole attualmente studiate in BNCT sono la borofenilalanina (BPA) ed il borocaptato (BSH) che presentano una scarsa selettività per il tessuto tumorale e una veloce clearance dal tumore. Per questo motivo è necessario individuare nuovi carriers per il ^{10}B . Porfirine, clorine e ftalocianine, già utilizzate in PDT, potrebbero rappresentare, per la buona selettività di accumulo a livello tumorale, una nuova classe di veicolanti per atomi di boro ad esse legati ed aprirebero la possibilità di attuare una terapia antitumorale combinata BNCT + PDT utilizzando un singolo agente sensibilizzante. A tal fine, sono state sviluppate alcune strategie sintetiche per introdurre un numero elevato di sostituenti periferici contenenti boro e quindi aumentando la probabilità di interazione con neutroni termici. Nella presente tesi, sono state studiate ftalocianine con metalli diversi al centro dell'anello tetraazaisoindolico (Zn nel caso di ZnB_4Pc , MeOks, OHks, PEGks, Diks o Si nel caso di SiB_2Pc) e con diverse quantità di atomi di boro per ciascuna molecola (18 atomi in MeOks, OHks, PEGks e SiB_2Pc o 36 atomi in ZnB_4Pc e Diks).

Per capire anche come l'anello tetrapirrolico potesse influire sulle capacità foto- e radio-sensibilizzanti della molecola sono state sintetizzate e studiate una porfirina (H_2TCP) e una clorina (TPFC).

In ogni caso ftalocianine, porfirine e clorine caricate con atomi di boro mostrano una buona affinità per le cellule di melanoma melanotico B16F1, anche se la capacità di accumulo viene influenzata dalla natura del macrociclo tetrapirrolico (clorina > porfirina), dalle proprietà chimico-fisiche dei sostituenti periferici e dallo ione coordinato all'interno del macrociclo.

La distribuzione intracellulare dei composti boronati avviene prevalentemente a livello delle membrane subcellulari e l'efficienza fotosensibilizzante risulta essere proporzionale alla quantità di sensibilizzatore accumulato dalle cellule B16F1.

Gli studi *in vivo* su topi C57BL/6, portatori di melanoma melanotico sottocutaneo, hanno evidenziato che la ftalocianina ZnB₄Pc, la porfirina H₂TCP e la clorina TPCF possiedono una buona selettività per il tessuto tumorale rispetto ai tessuti sani circostanti, ma mentre la porfirina non sembra avere una buona attività fotosensibilizzante, la ftalocianina e la clorina agiscono invece da buoni sensibilizzatori.

In particolare entrambe provocano un rallentamento della crescita tumorale di topi irradiati con luce rossa dopo 3 h dall'iniezione i.v. della molecola, suggerendo che la risposta indotta nella lesione neoplastica sia prevalentemente di tipo vascolare.

La clorina agisce sul tumore melanotico anche dopo un irradiazione effettuato a 24 h dall'iniezione i.v. e in questo caso interviene una risposta di tipo cellulare.

La ftalocianina ZnB₄Pc e la porfirina H₂TCP sembrano essere promettenti radio-sensibilizzatori in quanto causano un rallentamento della crescita tumorale di topi irradiati con neutroni termici dopo 24 h dalla somministrazione.

Concludendo è possibile supporre che combinando la PDT con la BNCT utilizzando un unico sensibilizzatore si ottenga un effetto additivo o sinergistico per il trattamento del melanoma melanotico.

Summary

Photodynamic therapy (PDT) and boron neutron capture therapy (BNCT) represent two therapeutic modalities which are presently used for the treatment of a variety of solid tumours. Both techniques involve the systemic administration of an intrinsically non-cytotoxic sensitising agent to the tumour-bearing patient, followed by irradiation with red light ($\lambda > 600$ nm) for PDT and thermal neutrons for BNCT. The research activities described in this dissertation were aiming at assessing the possibility to utilize one agent as both a photo- and a radio-sensitising agent in the treatment of melanotic melanoma. This tumour is known as being very aggressive and is characterized by a poor prognosis, at least by using the currently available therapeutic modalities.

In particular, PDT involves the use of a physical (visible light) and a chemical (the photosensitizer) active principle, whose concerted action promotes a sequence of photophysical processes, eventually leading to the generation of a hyper-reactive derivative of oxygen, named singlet oxygen. This oxygen derivative can diffuse within generally very short distances (around $0.1 \mu\text{m}$) from its production site, since it can be chemically intercepted by a large number of cell/tissue constituents, such as unsaturated lipids, aromatic amino acid residues and nucleotides, which are present in its microenvironment. The possibility to combine the action of the two factors (light+sensitizer) is at the basis of the observed selectivity of the photoinduced biological damage and the consequent biological effects.

BNCT is based on the selective interaction of ^{10}B , a non radioactive boron isotope, with low energy thermal neutrons yielding ^{11}B . This boron derivative is highly unstable and undergoes decomposition into two very fast particles, namely ^7Li and ^4He (or α particles), which are very reactive and induce cell death within a range shorter than the cell diameter owing to their short average pathway. The strictly limited field of action of singlet oxygen and fast particles could guarantee a

therapeutic effect which is localized in the tissue where the sensitizer molecule has been accumulated. In this connection, one should achieve a large ratio of sensitizer concentration in the tumour to the peritumoural normal tissues.

At present, two molecules are largely used as radiosensitizer for BNCT applications, that is boron-phenylalanine (BPA) and borocaptate (BSH), both of which exhibit a reduced selectivity of tumour targeting, as well as a fast clearance from the tumour. Thus, new carriers for boron are being explored for BNCT applications. Porphyrins, chlorins and phthalocyanines are already used as efficient PDT agents and show a large affinity for various tumours; hence, these molecules could represent interesting carriers of ^{10}B associated with them: in this case, the added advantage would be represented by the possibility to use just one compound for both PDT and BNCT and consequently develop a combination PDT+BNCT therapy. Towards this goal, new synthetic strategies have been defined for the introduction of boronated substituents in the peripheral positions of the tetraazaisoindole macrocycle of phthalocyanines and the tetrapyrrole macrocycle of porphyrins in an effort to achieve large endocellular boron concentrations, which enhance the probability of thermal neutron capture.

In the present dissertation, we studied some phthalocyanines coordinated with different metal ions (Zn for ZnB_4Pc , MeOks, OHks, PEGks, Diks or Si in the case of SiB_2Pc) and different numbers of boron atoms per sensitizer molecule (18 atoms in MeOks, OHks, PEGks and SiB_2Pc or 36 atoms in ZnB_4Pc and Diks). In order to explore the possible effect of the chemical characteristics of the central macrocycle on the photo-/radio-sensitising efficacy, also a one porphyrin (H_2TCP) and one chlorin (TPFC) have been investigated.

In all cases, the boron-loaded phthalocyanines, porphyrins and chlorins studied by us showed a good affinity for melanotic melanoma B16F1 cells, even though the amount of sensitizer bound with the cells was dependent on the nature of the central macrocycle (e.g., chlorin >

porphyrin), the physico-chemical properties of the peripherally bound moieties and the nature of the coordinated metal ion. The boronated compounds were preferentially partitioned in the subcellular membranous systems and their photosensitising efficiency was related with the total amount of cell-bound sensitizer.

In vivo studies performed on C57BL/6 mice bearing a subcutaneously transplanted B16F1 melanotic melanoma demonstrated that all the boronated phthalocyanines, chlorins and porphyrins had a good affinity for the tumour and some selectivity of tumour targeting as compared with peritumoural compartments. However, H₂TCP appeared to be devoid of any significant phototherapeutic activity at a difference from TPFC and ZnB₄Pc. Both the latter derivatives photoinduce a significant decrease in the rate of tumour growth when the neoplastic lesion is irradiated with red light at 3 h after sensitizer injection. This suggests that PDT under these conditions largely acts via induction of vascular damage. The chlorin is also efficient as a phototherapeutic agent at 24 h after injection, and in this case it acts mainly through direct damage of the malignant cells.

Lastly, TPFC and ZnB₄Pc appear to be also promising radiosensitising agents, since they induce an important response of the melanotic melanoma to thermal neutron irradiation at 24 h after sensitizer injection.

Overall, our data support the possibility to obtain a synergistic or additive effect against melanotic melanoma by a combined PDT + BNCT therapeutic approach in the presence of one photo-/radio-sensitising agent.

Indice

Abbreviazioni	pagina 1
Scopo della tesi	pagina 3
1. Introduzione	pagina 5
1.1 Melanoma melanotico: caratteristiche generali ed approcci terapeutici	" 5
1.2 Porfirine e loro analoghi: proprietà chimico-fisiche	" 8
1.3 Processi foto-sensibilizzati in sistemi biologici	" 12
1.4 Principi-base della terapia fotodinamica (PDT)	" 19
1.5 Interazione tra boro e neutroni termici	" 25
1.6 Principi base della terapia neutronica del boro (BNCT)	" 26
2. Parte sperimentale	pagina 29
2.1 Composti boronati	" 29
2.2 Materiali	" 30
2.3 Determinazione di ossigeno di singoletto (DMA)	" 31
2.4 Fotostabilità	" 32
2.5 Preparazione di liposomi	" 33
2.6 Accumulo di derivati boronati da cellule	" 34
2.7 Studi di distribuzione subcellulare in microscopia di fluorescenza	" 36
2.8 La colonna termica	" 37
2.9 Studi di foto-/radio-sensibilizzazione in cellule	" 38
2.10 Studi farmacocinetici in topi portatori di tumore	" 39

2.11 Osservazione di sezioni di tumore mediante microscopia di fluorescenza	" 40
2.11 Studi di PDT sperimentale	" 41
2.12 Studi di BNCT sperimentale	" 42
3. Risultati	Pagina 43
3.1 Caratterizzazione spettroscopica degli agenti foto- e radio-sensibilizzanti	" 43
3.2 Resa quantica di determinazione delle specie $^1\text{O}_2$	" 45
3.3 Studi di fotostabilità	" 47
3.4 Le ftalocianine come agenti foto- /radio-sensibilizzanti	" 49
3.4.a. Accumulo in cellule tumorali	" 49
3.4.b. Fotosensibilizzazione di cellule tumorali	" 51
3.4.c. Proprietà farmacocinetiche	" 53
3.4.d. Studi di PDT	" 54
3.4.e. Studio di BNCT	" 56
3.5 Porfirine	" 57
3.5.a. Accumulo in cellule tumorali	" 57
3.5.b. Fotosensibilizzazione di cellule tumorali	" 59
3.5.c. Proprietà farmacocinetiche	" 60
3.5.d. Studi di PDT	" 64
3.5.e. Studi di BNCT	" 65
3.6 Clorine	" 66
3.6.a. Accumulo in cellule tumorali	" 66
3.6.b. Fotosensibilizzazione di cellule tumorali	" 67
3.6.c. Proprietà farmacocinetiche	" 68
3.6.d. Studi di PDT	" 69
Discussione	pagina 71
Conclusioni	pagina 79
Bibliografia	pagina 81
Pubblicazioni	pagina 91

Abbreviazioni

$^1\text{O}_2$,	ossigeno di singoletto
^1S ,	primo singoletto eccitato
BPA,	borofenilalanina
BSH,	borocaptato
BCA,	acido bicinconinico
BNCT,	terapia per cattura dei neutroni da parte del boro
DMEM,	mezzo di Eagle modificato da Dulbecco
DMF,	dimetilformammide
DMSO,	dimetilsolfossido
DOPC,	dioliofosfatidilcolina
DPPC,	dipalmitoilfosfatidilcolina
EDTA,	acido etilen-diamino-tetraacetico
FBS,	siero fetale bovino
Hp,	ematoporfirina
HpD,	derivato dell'ematoporfirina
H_2TCP ,	meso-tetra(4- <i>nido</i> -carboranilfenil)porfirina
PBS,	tampone fosfato Dulbecco
PDT,	terapia fotodinamica
PEG,	polietilenglicole
PII,	Photofrin
PpIX,	protoporfirina IX
SiB_2Pc ,	Silico ftalocianina di(3- <i>O</i> -carboranilpropanossido)
SDS,	sodiododecilsolfato
TPFC,	tetrakis(p-carboraniltio-tetrafluorofenil)-clorin
ZnB_4Pc ,	tetrakis-4-(B- <i>O</i> -carboranil)metilfenossi-ftalocianinato zinc(II)
UV,	ultravioletto
ϵ ,	coefficiente di estinzione molare
τ_f ,	tempo di vita di fluorescenza
τ_t ,	tempo di vita di tripletto
Φ_f ,	resa quantica di fluorescenza

Φ_t , resa quantica di generazione di tripletto

Scopo della tesi

La terapia fotodinamica (PDT) e la terapia per cattura di neutroni da parte del boro (BNCT) sono attualmente due metodologie cliniche che vengono utilizzate per il trattamento di diversi tipi di tumore, in particolare tumori superficiali o localizzati in siti endocavitari raggiungibili dall'esterno con la PDT e il glioma o l'astrocitoma con la BNCT. In entrambi i casi viene utilizzato un sensibilizzatore non tossico che viene attivato da una fonte di luce visibile nel caso della PDT o di neutroni termici nel caso della BNCT. La possibilità di combinare queste due terapie per renderle entrambe più efficaci è un'idea che rientra in un progetto più ampio studiato nei laboratori del Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova in collaborazione con l'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare e con l'ENEA di Roma.

Il modello sperimentale scelto per esplorare la possibilità di sviluppare una terapia combinata PDT + BNCT è il melanoma melanotico che risulta essere uno dei tumori più aggressivi e difficilmente curabili con le terapie attualmente in uso in campo medico; la terapia di elezione consiste nell'asportazione chirurgica del tessuto neoplastico. Non sempre, tuttavia, la resezione risulta completa e in alcuni casi si presentano delle recidive; inoltre, il melanoma ha una forte tendenza a dare metastasi.

L'utilizzo esclusivo della PDT in questo caso viene molto limitato dalla presenza della melanina che assorbe la luce a lunghezze d'onda dell'intero spettro visibile, quindi la combinazione con la BNCT potrebbe essere la soluzione meno invasiva per rendere la terapia più efficace.

Lo scopo della tesi che si inserisce in questo progetto è di individuare una molecola che sia in grado di fungere da foto- e radio-sensibilizzatore per il trattamento del melanoma melanotico.

La collaborazione con i due laboratori di sintesi chimica, la R&S appartenente alla ditta Molteni Farmaceutici di Firenze e il Dipartimento di Chimica dell'Università di Baton Rouge in Louisiana, ci ha permesso

di testare diversi composti boronati per mettere a punto la terapia combinata PDT+BNCT.

I sensibilizzatori sono stati sintetizzati prendendo come molecole di partenza delle specie chimiche già note come buoni foto-sensibilizzanti, in particolare clorine, porfirine e ftalocianine, alle quali sono stati legati dei clusters contenenti boro per renderle anche radio-sensibilizzanti.

Così costruiti i sensibilizzatori sono stati testati sul modello cellulare prescelto (melanoma melanotico murino B16F1) singenico ai topi C57BL/6 utilizzati per gli esperimenti *in vivo*.

Ogni sensibilizzatore ha dimostrato le proprie peculiarità sia negli studi *in vitro* che *in vivo* evidenziando che i clusters di boro sono relativamente influenti sulla loro efficacia, mentre le caratteristiche chimiche dell'anello tetrapirrolico varia la loro capacità foto- e radio-sensibilizzante.

1. INTRODUZIONE

1.1 Melanoma pigmentato: caratteristiche generali ed approcci terapeutici

Il melanoma melanotico è stato identificato da lungo tempo come la più importante e pericolosa tra le malattie della pelle.

La cute, l'organo che ricopre la superficie del corpo, svolge varie funzioni: protegge l'organismo dall'ambiente esterno dal quale a sua volta viene stimolato; secerne sostanze di vario genere; contribuisce alla termoregolazione e al mantenimento dell'equilibrio idrico. L'epidermide, lo strato più superficiale che compone la cute, è un epitelio pavimentoso stratificato corneificato con uno spessore compreso tra 70 μM e 120 μM . Al di sotto dell'epidermide e separato da essa dalla membrana basale, si trova il derma il quale si solleva in pieghe formando le papille dermiche che si interdigitano con l'epidermide formando le creste epidermiche.

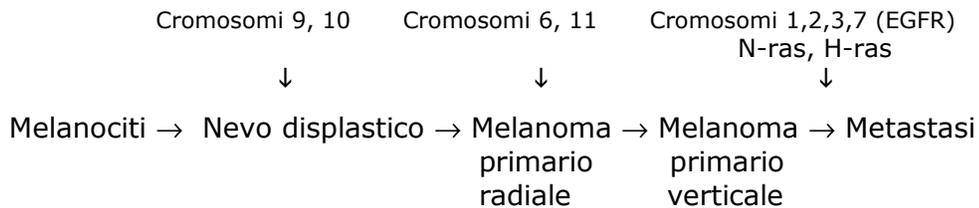
L'epidermide è costituita da tre linee cellulari: i *cheratinociti*, detti anche cellule proprie dell'epidermide, che hanno origine ectodermica ed in seguito alla proliferazione vanno incontro a corneificazione; i *melanociti*, che derivano dalle creste neurali dell'embrione, migrano prima nel derma e poi fino agli strati profondi dell'epidermide, sono presenti in numero minore rispetto ai cheratinociti, non subiscono corneificazione e sono deputati alla sintesi di melanina; le *cellule di Langerhans*, presenti in numero variabile nelle diverse regioni del corpo, presentano in superficie recettori per le immunoglobuline. L'epidermide è un tessuto in continuo rinnovamento. Uno strato di cellule in continua mitosi alla base dell'epidermide dà origine a cellule

che si sostituiscono a quelle che sono migrate verso gli strati più superficiali per formare, andando incontro ad un processo di corneificazione, lo strato corneo.

L'epidermide viene suddivisa dallo strato più profondo a quello più superficiale in base alle caratteristiche morfologiche che i cheratinociti assumono durante il processo di differenziazione: *strato basale*, *strato spinoso*, *strato granuloso* e *strato corneo*. Nello strato basale, che consiste in un unico strato di cellule cubiche ancorate alla membrana basale, si trovano i melanociti, cellule specializzate distinguibili dalle altre in quanto sono caratterizzate da due o più processi dendritici e un sistema membranoso simile a quello di cellule secernenti. Esse contengono, nella loro forma pigmentata, numerosi granuli ricchi di melanina, i *melanosomi* che sono costituiti da piccole sub-unità di varie forme (bastoncellari, granulari o lamellari). I melanosomi osservati in melanociti di mammifero (uomo, topo e cavia) presentano le stesse caratteristiche di quelli osservati in cellule di melanoma melanotico (Hu, 1963). Mediante i loro processi dendritici, i melanociti stabiliscono numerosi contatti con le altre cellule epidermiche e in questo modo riescono a trasferire i granuli di melanina nei cheratinociti i quali migrano verso lo strato corneo trasportando anche la melanina che si dispone nella parte dorsale della cellula incappucciandone il nucleo (Boissy, 1988) e assume non più una forma granulare, ma simile a particelle pigmentate e irregolari (Fitzpatrick e Szabò, 1959).

La biosintesi dei melanosomi consiste in un processo bipartito in cui un pre-melanosoma (che deriva da una dilatazione del reticolo endoplasmatico liscio) interagisce con l'enzima tirosinasi (che proviene dal reticolo endoplasmatico ruvido) per produrre due granuli pigmentati: gli eumelanosomi che sono marroni/neri e i feomelanosomi che sono giallo/rossi. Entrambi i melanosomi contengono una matrice costituita da melanofilamenti organizzati in maniera ordinata negli eumelanosomi e in maniera disordinata nei feomelanosomi (Boissy, 1988).

La melanina, com'è noto, svolge un effetto foto-protettivo per l'organismo sia assorbendo la luce visibile e la luce UV, sia agendo da scavenger per le specie reattive dell'ossigeno ed altri radicali liberi. Essa stessa, però, è in grado di produrre O_2^- e H_2O_2 quando viene irradiata con luce UV (Korytowski, 1987). Infatti i raggi UV sono stati designati come causa primaria scatenante il melanoma melanotico anche se è stato riscontrato un certo grado di familiarità nell'insorgenza del melanoma nell'uomo con il coinvolgimento di diversi geni di diversi cromosomi (Fountain, 1990). Lo sviluppo del melanoma è un processo multistep che inizia spesso a livello di nevi melanocitici pigmentati che degenerano evidenziando una morfologia atipica alla quale viene associata una citologia atipica (nevo displastico). I nevi displastici possono degenerare fino a melanoma melanotico primario il quale può crescere in due fasi: radiale creando lesioni in grado di invadere il tessuto circostante, ma non di creare metastasi; verticale in cui le cellule si muovono verso strati tissutali profondi e rendono il melanoma primario capace di metastatizzare.



Il melanoma melanotico viene classificato in base ai "livelli di invasione" (Liotta, 1987) delle cellule neoplastiche:

1. quando si trovano sopra lo strato basale dell'epidermide;
2. quando migrano al di là dello strato basale invadendo parzialmente il derma papillare, ma non il reticolo dermico;
3. quando invadono completamente il derma papillare raggiungendo l'interfaccia tra il derma papillare e reticolare;
4. quando si estendono nel derma reticolare;
5. quando invadono il tessuto sottocutaneo adiposo.

Il melanoma metastatico risulta essere uno dei tumori più devastanti che colpisce milioni di persone ogni anno. Fin dagli anni '40 veniva asportato chirurgicamente insieme ai linfonodi circostanti (*Grichnik, 2008*), ma questa pratica era soggetta ad un alto rischio di recidive. È stato necessario quindi rivolgere l'attenzione a nuovi approcci terapeutici e tra i più avanzati studi attualmente in corso si stanno testando varie strategie immunoterapeutiche che includono vaccini anti-melanoma (interferone alfa, interleuchina-2) e vaccini anti cellule dendritiche (*Kalani, 2008*) i quali, però, presentano limitazioni che non li rendono ancora applicabili in clinica (*Kirkwood, 2008*).

1.2 Porfirine e loro analoghi: proprietà chimico-fisiche

La reattività dei componenti cellulari ai processi fotosensibilizzati, promossi da irradiazione con luce visibile, dipende dalla loro struttura chimica, ma anche dalle caratteristiche del fotosensibilizzatore e dalle condizioni sperimentali in cui si svolge il fototrattamento.

Tra gli agenti fotosensibilizzanti di origine naturale un ruolo molto importante è svolto da derivati come le clorofille, le flavine, i chinoni, le porfirine e gli psoraleni.

Di particolare importanza nel campo della fotomedicina attuale sono le porfirine, classe di composti tetrapirrolici a cui appartengono alcuni fotosensibilizzatori antitumorali sia di prima che di seconda generazione. A livello clinico vengono attualmente utilizzate l'ematoporfirina IX (Hp), un suo derivato ottenuto per trattamento dell'ematoporfirina con una miscela di acido acetico ed acido solforico (HpD) ed il Photofrin II (PII), in quanto queste porfirine presentano bande di assorbimento nella regione rossa dello spettro visibile ($\lambda > 600$ nm) dove i cromofori endogeni di cellule e tessuti risultano essere

relativamente trasparenti, consentendo una penetrazione relativamente profonda fino a 1-2 cm) nella maggior parte dei tessuti umani. Tuttavia l'assorbanza di queste porfirine alla lunghezza d'onda di 630 nm, che è utilizzata in applicazioni cliniche è piuttosto bassa e caratterizzata da un coefficiente di estinzione molare inferiore a $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Tutte queste caratteristiche limitanti dei fotosensibilizzatori di prima generazione hanno spinto la ricerca verso l'individuazione di nuovi agenti fotosensibilizzanti che avessero un elevato grado di purezza, che fossero capaci di assorbire con buona efficienza le lunghezze d'onda nell'intervallo spettrale del rosso e del rosso lontano, in cui si ha una migliore penetrazione della luce attraverso i tessuti di mammifero. L'attenzione è stata rivolta a *clorine*, *ftalocianine*, *naftalocianine* e derivati della benzoporfirina.

Attualmente vengono sperimentate a livello clinico le ftalocianine che possiedono caratteristiche chimico-fisiche e spettroscopiche più vantaggiose delle porfirine.

Le ftalocianine (Pc) sono composti chimici derivati dalla condensazione ciclica di quattro unità isoindoliche legate tra loro da atomi di azoto. Esse:

- ✓ sono resistenti alla degradazione chimica e fotochimica;
- ✓ sono caratterizzate da bassi livelli di tossicità al buio;
- ✓ possono esistere sia come basi libere che come complessi stabili con una varietà di ioni metallici come Al, Zn, Si e Ga. Questi ioni formano legami coordinativi con i quattro atomi centrali di azoto degli anelli pirrolici;

✓ sono semplici da sintetizzare e quindi disponibili come composti puri.

Un'importante caratteristica che rende le ftalocianine più vantaggiose come agenti fotosensibilizzanti rispetto alle porfirine è una più estesa delocalizzazione degli elettroni π e questo comporta uno spostamento dell'assorbimento a lunghezze d'onda comprese tra 650-750 nm e un maggiore coefficiente di estinzione molare ($\epsilon = 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Le ftalocianine sono essenzialmente insolubili in solventi acquosi o in mezzi polari se non presentano sostituenti periferici. Al contrario si mostrano idrosolubili se a livello delle posizioni periferiche isoindoliche legano gruppi carbossilici, amminici o solfonici che sono gruppi funzionali elettricamente carichi a pH fisiologico. Tuttavia, le ftalocianine idrosolubili tendono a formare aggregati in mezzi acquosi in quanto l'anello tetraazaisoindolico presenta un carattere idrofobico ed inoltre sono possibili interazioni tra le nuvole elettroniche $n-n$ delocalizzate sul macrociclo. L'aggregazione, solitamente, determina allargamento delle bande di assorbimento, ipocromicità e diminuzione dell'attività fotosensibilizzatrice (Jori, 1984; Spikes, 1986).

Ci sono due strategie per favorire la monomerizzazione delle specie aggregate: l'aggiunta alla soluzione acquosa di ftalocianina di solventi organici come metanolo, etanolo e tetraidrofurano, i quali sono pienamente miscibili con acqua e possiedono una costante dielettrica più bassa; oppure tramite l'incorporazione di ftalocianina nella matrice idrofobica di micelle o liposomi.

Gli spettri di assorbimento delle ftalocianine sono determinati dal particolare sistema di legami coniugati del macrociclo tetraazaisoindolico e sono caratterizzati da una banda di Soret compresa fra 300 e 350 nm, da una banda di bassa intensità verso i 600 nm e da una banda più intensa nella regione spettrale del rosso tra 650 e 750 nm (banda Q). La forma e la posizione di queste bande di assorbimento è influenzata dalla formazione di aggregati (spostamento della banda di Soret a lunghezze d'onda più corte ed allargamento della banda Q). Le ftalocianine basi libere e le metallo-ftalocianine con ioni metallici diamagnetici presentano una tipica fluorescenza rossa il cui massimo di emissione è localizzato intorno a 680-710 nm. Anche gli spettri di emissione di fluorescenza sono influenzati dal grado di aggregazione delle ftalocianine. Per esempio il tempo di vita di fluorescenza (τ_f) della Zn(II)-ftalocianina monomera varia da 3 a 3.5 ns, mentre per quella in forma aggregata varia da 1.2-1.5 ns per i dimeri a 0.4-0.5 ns per le specie oligomeriche (Valduga et

al., 1992). In generale, le ftalocianine monomere possiedono una resa quantica di fluorescenza variabile tra 0.1 e 0.2. La resa quantica viene abbassata dalla formazione di specie aggregate o dalla coordinazione di ioni metallici paramagnetici; infatti complessi delle ftalocianine con ioni Cu (II) e Fe (II) presentano Φ_f inferiore a 0.01.

L'efficienza fotosensibilizzatrice di un fotosensibilizzante è strettamente correlata ad alcuni parametri fotofisici quali: la resa quantica di generazione dello stato di tripletto (Φ_t), il tempo di vita di questa specie eccitata (τ_t) e l'efficienza di formazione di ossigeno di singoletto (1O_2) per trasferimento di energia elettronica dal più basso tripletto eccitato all'ossigeno nel suo stato fondamentale. Allo stato monomero le ftalocianine presentano Φ_Δ variabili tra 0.5 e 0.9, mentre l'aggregazione e la presenza di ioni paramagnetici influenzano la resa quantica di formazione dello stato di tripletto ed il suo tempo di vita. L'energia posseduta dal tripletto delle ftalocianine varia tra 26-30 kcal/mole, infatti possono generare ossigeno di singoletto con elevata efficienza. La specie 1O_2 rappresenta l'intermedio reattivo probabilmente più importante nelle reazioni fotosensibilizzate dalle ftalocianine. La capacità di produrre ossigeno di singoletto è influenzata anche dal tipo di metallo inserito nel macrociclo: le ftalocianine coordinate con ioni metallici paramagnetici (es., Co, Fe, Cu, Ni) non producono 1O_2 quindi non manifestano alcuna attività fotosensibilizzatrice; quelle invece coordinate con ioni metallici diamagnetici producono 1O_2 con diversa efficienza secondo la scala Ga > Al > Zn > Mg (Langlois, 1986). E' stato dimostrato che solamente le ftalocianine monomere, che producono 1O_2 con rese quantiche elevate, possiedono una buona attività fotosensibilizzatrice. Sono in grado di fotosensibilizzare efficientemente substrati modello quali idrochinone, metilviologeno e dimetilfurano; possono inoltre fotodegradare alcune classi importanti di biomolecole tra cui amminoacidi e colesterolo (Spikes e Bommer, 1986). Le forme aggregate dei fotosensibilizzatori determinano invece un'inefficiente produzione di 1O_2 in conseguenza di una resa di formazione di tripletto estremamente bassa rispetto alle

corrispondenti forme monomere. Sono state osservate buone proprietà fotosensibilizzatrici sia su cellule sia su modelli tumorali, tanto da proporre questi composti come una promettente categoria di fotosensibilizzatori di seconda generazione che potranno competere con le porfirine in molte applicazioni della fotomedicina (*Reddi et al., 1990; Selman et al., 1986*).

1.3 Processi foto-sensibilizzati in sistemi biologici

L'interazione della luce solare con i sistemi biologici rappresenta un processo molto complesso, specialmente se la luce incidente è policromatica, vale a dire è costituita da un insieme di lunghezze d'onda. In effetti il fotoprocesso complessivo può essere considerato come la risultante di tre eventi paralleli:

- ✓ la riflessione dei fotoni incidenti sulla superficie del tessuto biologico;
- ✓ lo scattering, ovvero la deviazione del raggio luminoso dalla sua direzione originaria di propagazione;
- ✓ l'assorbimento da parte di uno o più cromofori presenti nel sistema.

Nella maggior parte dei tessuti animali il processo di riflessione interessa non più del 10 % della radiazione incidente ed è in prima approssimazione indipendente dalla lunghezza d'onda (*Ishimaru, 1978*).

Nel caso di scattering ed assorbimento la lunghezza d'onda svolge un ruolo importante. Infatti lo scattering è determinato dalle dimensioni delle particelle con cui i fotoni interagiscono; in particolare, per particelle di dimensioni inferiori o confrontabili con quelle delle lunghezze d'onda incidenti (ad esempio proteine o acidi nucleici

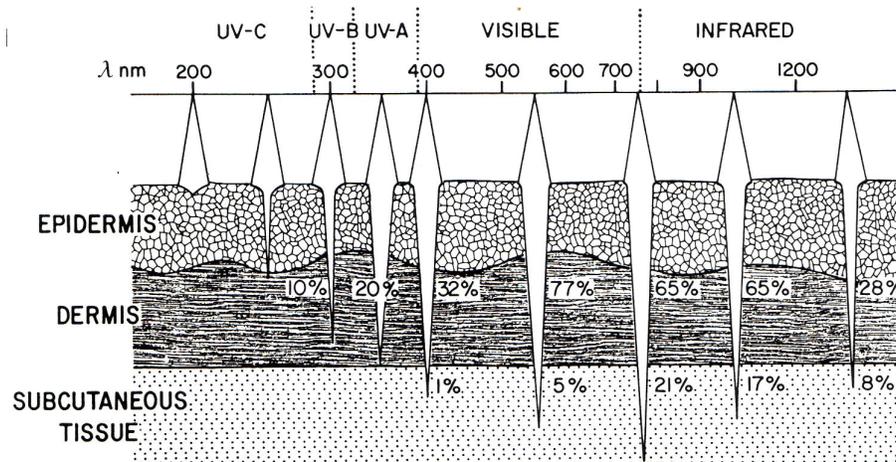
rispetto alle radiazioni UV o visibili), esso varia in modo inversamente proporzionale alla quarta potenza della lunghezza d'onda ($S = k \lambda^{-4}$).

L'assorbimento luminoso avviene ad opera di specifici cromofori ed è un processo selettivo in quanto ogni cromoforo assorbe solo determinati intervalli di lunghezze d'onda e la sua distribuzione è eterogenea nei tessuti biologici (*Spikes, 1989*).

L'intervallo di lunghezze d'onda che raggiungono la superficie terrestre e che svolgono un ruolo molto importante in campo biologico si suddividono in raggi infrarossi (900-4000 nm), raggi visibili (380-900 nm) e raggi ultravioletti (290-380 nm).

L'assorbimento da parte di cellule e tessuti presenta un'intensità molto elevata per quanto riguarda le radiazioni ultraviolette comprese tra 260 e 310 nm, UV-B, che sono assorbite da componenti ubiquitari di cellule e tessuti come acidi nucleici e proteine (*McLaren et al., 1964*); tra 320 e 400 nm, UV-A, assorbono prevalentemente alcuni cofattori come il piridossale, il nicotinammide adenin dinucleotide in forma ridotta (NADH), le flavine e i chinoni; tra 400 e 800 nm, regione del visibile, tetrapirroli come la bilirubina, le clorine, e le porfirine (che costituiscono il gruppo prostetico della mioglobina e dell'emoglobina) sono importanti cromofori. Un cromoforo endogeno particolare è la melanina che assorbe l'intera gamma di lunghezze d'onda anche se, all'aumentare di queste, l'assorbanza diminuisce.

In letteratura è noto che la luce nei tessuti biologici penetra maggiormente all'aumentare della lunghezza d'onda in conseguenza della diminuzione di scattering e assorbimento che potrebbero limitarla (*Wilson et al., 1985*). Si può individuare un intervallo spettrale compreso tra 600 e 900 nm, in cui si ha il minimo assorbimento da parte dei tessuti ed una notevole diminuzione dello scattering; di conseguenza, si ha la massima trasparenza alla luce nei tessuti di mammifero. Questo intervallo di lunghezze d'onda viene denominato "finestra terapeutica" e viene utilizzato nelle applicazioni fototerapeutiche in cui è richiesto l'assorbimento di luce da parte di cromofori che si trovano in siti relativamente profondi del tessuto.

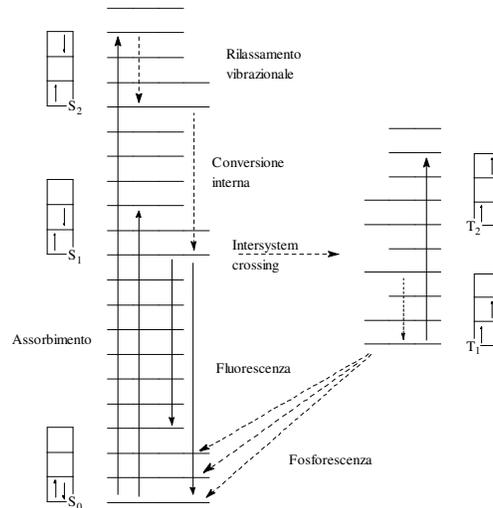


Le molecole si trovano, in assenza di luce, allo stato fondamentale in cui gli elettroni occupano gli orbitali disponibili a più bassa energia ed all'interno di ogni orbitale assumono spin opposti. Questo stato elettronico è detto di singoletto. Alcune eccezioni sono rappresentate da molecole che allo stato fondamentale presentano uno stato elettronico di tripletto in cui gli elettroni più esterni sono distribuiti in due orbitali degeneri con spin paralleli.

L'assorbimento di un fotone da parte di una molecola corrisponde alla transizione di un elettrone da un orbitale a più bassa energia ad uno a più alta energia senza cambiamento di spin. La molecola quindi passa da uno stato fondamentale di singoletto ad uno stato eccitato di singoletto.

Schematicamente rappresentati dal diagramma semplificato di Jablonsky si possono osservare i vari eventi fotofisici. Dopo l'interazione con il fotone la molecola si trova nel livello di primo singoletto eccitato (S_1) o in stati di singoletto eccitati più elevati (S_2, S_3, \dots). Tramite processi estremamente rapidi di conversione interna e rilassamento vibrazionale ($10^{-12} - 10^{-15}$ s) la molecola viene riportata al livello vibrazionale più basso di S_1 . Quest'ultimo può decadere allo stato fondamentale tramite emissione di fluorescenza, f (via radiativa) o conversione interna, ic (via non radiativa). Esiste anche un processo

chiamato intersystem crossing, isc , attraverso il quale la molecola può passare ad uno stato eccitato di tripletto (T_1) in conseguenza dell'inversione di uno spin elettronico e da questo può tornare allo stato fondamentale attraverso la via non radiativa o radiativa (fosforescenza).



I processi di decadimento elettronico avvengono generalmente secondo cinetiche del primo ordine, cioè in ogni momento la loro velocità è proporzionale al numero di molecole ancora presenti nello stato eccitato secondo una costante di velocità specifica per ogni processo (k_f, k_{ic}, k_{isc}). Il parametro che caratterizza l'efficienza delle diverse vie di decadimento è costituito dalla resa quantica (Φ) il cui valore corrisponde al rapporto tra il numero di eventi relativi al processo considerato e il numero totale di fotoni assorbiti dalla molecola. La resa quantica è anche equivalente al rapporto tra la costante di velocità relativa ad un determinato processo di decadimento e la somma di tutte le costanti di velocità che competono nella disattivazione di quel particolare stato eccitato. Quindi la resa quantica di fluorescenza è pari a:

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

dove k_f si riferisce all'emissione di fluorescenza, k_{ic} alla conversione interna e k_{isc} all'intersystem crossing.

Un altro parametro basilare è il tempo di vita dello stato eccitato (τ), che è la misura di quanto a lungo la molecola possa rimanere in quel particolare stato. Esso è definito come il reciproco della somma di tutte le costanti di velocità che intervengono nel decadimento di tale stato eccitato, come per esempio il tempo di vita del primo stato eccitato di singoletto:

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

I tempi di fluorescenza delle molecole organiche e di interesse biologico sono, generalmente, nell'ordine dei nanosecondi ($10^{-9} - 10^{-10}$), mentre i tempi di vita di tripletto sono più lunghi, nell'ordine dei millisecondi od anche, in condizioni particolari, dei secondi. Questa differenza è dovuta al fatto che il ritorno della molecola dallo stato T_1 allo stato fondamentale implica una ulteriore inversione di spin elettronico, una transizione proibita. E' possibile però ridurre questo valore all'ordine di millisecondi (10^{-3}) se la molecola si trova in un mezzo fluido, poiché esiste una elevata probabilità che si disattivi per interazione con il suo microintorno. Essendo particolarmente lenta la velocità di depopolamento dello stato di tripletto ed elevata la probabilità di diffusione nelle zone circostanti il suo microintorno, il tripletto rappresenta il principale intermedio fotoreattivo nei processi fotosensibilizzati (*Jori, 1980*).

I cromofori possono sia essere responsabili dell'assorbimento della luce sia essere coinvolti e modificati nelle reazioni fotochimiche; oppure, in alcuni casi, essi non vengono modificati nei processi successivi all'assorbimento dei fotoni e fungono soltanto da antenne per captare le radiazioni.

Quindi in alcune reazioni fotochimiche il cromoforo responsabile dell'assorbimento non viene modificato nei processi successivi, ma, nel suo stato elettronico eccitato, interagisce con altre molecole presenti

nel suo microintorno che vengono modificate in modo irreversibile. In questi casi si parla di "reazioni di fotosensibilizzazione" ed il cromoforo viene definito "fotosensibilizzatore".

Il tripletto del fotosensibilizzatore può originare processi ossidativi mediante due meccanismi competitivi definiti di "tipo I" e di "tipo II" (*Spikes, 1989*).

Il meccanismo di "tipo I" prevede il trasferimento di elettroni o protoni tra il fotosensibilizzatore allo stato di tripletto ed un substrato oppure l'ossigeno molecolare con la conseguente formazione di una coppia di radicali. In particolare nel caso di trasferimento elettronico all'ossigeno molecolare si ha formazione di anione superossido (O_2^-) il quale può dare origine in presenza di H^+ , ad altre specie altamente reattive come H_2O_2 ed il radicale ossidrilico $OH\bullet$ (*Rodgers, 1985*).

Il meccanismo di "tipo II" consiste nel trasferimento di energia elettronica dal tripletto del fotosensibilizzatore ad un substrato o all'ossigeno molecolare. La condizione necessaria affinché possa avvenire questo trasferimento energetico è che la differenza di energia tra lo stato eccitato e quello fondamentale del fotosensibilizzatore sia maggiore o uguale alla differenza di energia tra lo stato fondamentale e quello eccitato del substrato in questione. Ossia:

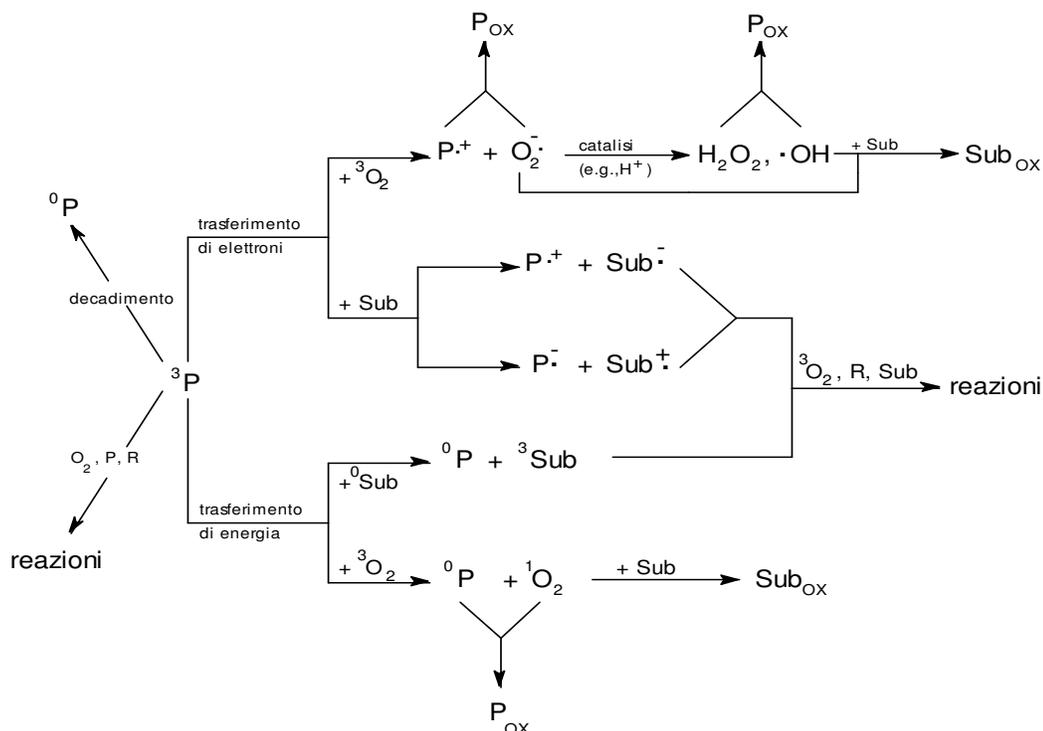
$$\Delta E (*P \rightarrow P) \geq \Delta E (*S \rightarrow S)$$

dove P è il fotosensibilizzatore ed S il substrato.

Il processo di reazione diretta tra fotosensibilizzatore e substrati biologici avviene soprattutto attraverso un meccanismo di "tipo I" con eventuale coinvolgimento dell'ossigeno molecolare. Infatti il meccanismo di "tipo II" è difficilmente attuabile in substrati come amminoacidi, proteine ed acidi nucleici per limitazioni energetiche.

L'ossigeno molecolare nel suo stato fondamentale è un tripletto che può accettare l'energia di eccitazione del fotosensibilizzatore passando al suo più basso stato eccitato di singoletto 1O_2 il quale ha un'energia

pari a 22,5 kcal/mole (Turro, 1978). La maggior parte dei fotosensibilizzatori possiede energia di tripletto sufficiente a promuoverne la formazione (Rodgers, 1985).



L'azione combinata di luce, fotosensibilizzatore ed ossigeno su un substrato è detta "azione fotodinamica".

In un determinato ambiente di reazione la modificazione del substrato può avvenire tramite entrambi i meccanismi che sono fra loro competitivi e le loro velocità di reazione dipendono dalle rispettive costanti di velocità (che cambiano a seconda del pH, della polarità del mezzo di reazione e dalla natura dell'ambiente), dalla concentrazione di substrato e dalla concentrazione di O_2 . Quindi variazioni dell'ambiente di reazione e/o della concentrazione dei reagenti possono spostare il fotoprocesso da un meccanismo all'altro.

Tutti i prodotti intermedi delle reazioni fotosensibilizzate, come le specie radicaliche e l'ossigeno di singoletto, possiedono uno spiccato

carattere elettrofilo e quindi risultano particolarmente reattive verso siti ricchi di elettroni come alcuni amminoacidi (triptofano, tirosina, istidina, metionina e cisteina), gli acidi grassi insaturi, il colesterolo e le basi azotate, soprattutto la guanina (*Krinsky, 1982*). Risultano invece inerti alla fotosensibilizzazione mono- e poli-saccaridi che non presentano alcun grado di insaturazione.

1.4 Principi base della terapia fotodinamica (PDT)

Il fotosensibilizzatore è un cromoforo in grado di promuovere una serie di reazioni fotofisiche e fotochimiche nel momento in cui assorbe luce. Queste reazioni implicano anche la presenza di ossigeno molecolare dal quale si forma ossigeno di singoletto $^1\text{O}_2$ che può diffondere, ma che, a causa del suo breve tempo di vita, svolge la sua azione citotossica solo nel microintorno in cui è stato generato ($< 0,02 \mu\text{m}$). Per questo motivo è importante conoscere la localizzazione subcellulare del fotosensibilizzatore in modo da poter poi dedurre quale sarà il fotodanno provocato alla cellula dalla PDT. Bisogna tener conto anche che la risposta di un tessuto al fototrattamento dipende dal tipo di fotosensibilizzatore e di luce utilizzati, dal tipo di cellule trattate e dallo stato di ossigenazione del tessuto. Molti componenti cellulari possono essere considerati potenziali bersagli della PDT: membrana plasmatica e sistemi di membrana endocellulari, mitocondri, lisosomi e DNA. Mentre i fotosensibilizzatori idrofilici sembrano localizzarsi soprattutto nei lisosomi (*Moan et al., 1989*), i fotosensibilizzatori lipofili, come alcune porfirine e ftalocianine, tendono a localizzarsi soprattutto a livello dei sistemi di membrana cellulare (membrana plasmatica, mitocondriale, reticolo endoplasmatico, apparato di Golgi).

In questi siti, il fotodanno si può tradurre in: fotoossidazione di specifici enzimi di membrana quali, ad es. acetil-colinesterasi, ATPasi, gliceraldeide-3-P deidrogenasi; produzione di composti chetonici ed aldeidici derivanti dall'ossidazione iniziale di istidina e triptofano; fotoossidazione di steroidi e lipidi insaturi: in particolare, dalla perossidazione del colesterolo si formano idroperossidi lipidici che reagiscono con amminoacidi e ammine causando, di conseguenza, un danno alle proteine di membrana (*Moan e Vistnes 1986; Reyftman et al., 1986; Valenzano, 1987*). Se le cellule vengono incubate per brevi periodi (< 1 h) con fotosensibilizzatori lipofilici e poi irradiate si possono osservare danni soprattutto concentrati a livello della membrana plasmatica a differenza di cellule incubate per tempi più lunghi (18-24 h) (*Moan et al., 1984*). Le principali alterazioni funzionali e morfologiche a danno della membrana comprendono: aumento della permeabilità, come evidenziato dal rilascio di CrO_4^{2-} o accumulo di Trypan blue (*Moan et al., 1983*); depolarizzazione del potenziale di membrana (*Specht e Rodgers, 1991*); inattivazione di alcuni enzimi tra cui Na^+/K^+ -ATPasi e Mg^{2+} -ATPasi; alterazione del trasporto ionico; fotoperossidazione del colesterolo e dei lipidi insaturi; formazione di legami crociati lipide-proteina (*Girotti, 1990*); cambiamenti nell'espressione di antigeni e rigonfiamento cellulare con riduzione del numero di microvilli (*Moan et al., 1982*). Queste alterazioni determinano la perdita di integrità di membrana cui segue uno shock osmotico che comporta la fuoriuscita di materiale dalla cellula. Anche i mitocondri possono essere un bersaglio di fotosensibilizzatori cationici, del derivato dell'ematoporfirina (HpD) e di Photofrin. Ognuno determina un danno diverso: i fotosensibilizzatori cationici indirizzano la loro azione sul complesso I della catena respiratoria (*Ara et al., 1987*); HpD e Photofrin invece inibiscono l'attività della succinico deidrogenasi, della citocromo c ossidasi e dell'ATPasi. Porfirine anioniche ed altri fotosensibilizzatori si accumulano preferenzialmente in lisosomi (*Woodburn et al., 1991*) e ciò può portare, in alcuni casi, al rilascio di enzimi e del fotosensibilizzatore stesso, i quali vengono

ridistribuiti e possono andare ad agire su altri bersagli extralisosomiali (Berg *et al.*, 1990, 1991). Alcune porfirine si legano alla tubulina e ne inibiscono la polimerizzazione sia in assenza che in presenza di luce (Boekelheide *et al.*, 1987). In cellule sottoposte a PDT ciò provoca il blocco della mitosi poiché i costituenti dei microtubuli nella forma non polimerica vengono danneggiati a seguito del fototrattamento (Berg, 1992). I fotosensibilizzatori più frequentemente utilizzati in PDT (Photofrin, ematoporfirina e ftalocianine) si localizzano, normalmente, al di fuori del nucleo, per cui, solo componenti esterni alla membrana nucleare possono essere danneggiati. Un danno indiretto al DNA si può verificare grazie all'attivazione di endonucleasi conseguente all'induzione di stimolo apoptotico (Agarwal *et al.*, 1993). Comunque, la sintesi del DNA viene drasticamente inibita in cellule dopo PDT con ematoporfirina come dimostrato dalla diminuita incorporazione di timidina triziata nel DNA (Moan *et al.*, 1983). In alcune cellule sottoposte a PDT, è stata osservata anche la formazione di legami crociati tra DNA e proteine ed alterazioni delle proteine della membrana nucleare (Dubbelman *et al.*, 1982). La PDT ha un effetto citotossico che determina la morte delle cellule sottoposte a tale trattamento. Inizialmente erano stati raccolti dati che avvaloravano l'ipotesi di una morte per necrosi, mentre è stato più recentemente scoperto che può indurre anche una morte di tipo apoptotico. Il tipo di morte indotta dalla PDT sembra dipendere da una serie di fattori tra cui la linea cellulare, la dose e la localizzazione del fotosensibilizzatore all'interno della cellula e la dose di luce utilizzata. Uno dei tanti esempi che si possono fare per suffragare questa affermazione è costituito da studi fatti utilizzando come fotosensibilizzatore l'acido 5-aminolevulinico (5-ALA). Questo precursore naturale della biosintesi dell'eme è in grado di stimolare la produzione di protoporfirina IX endogena e può indurre morte cellulare tramite necrosi o apoptosi a seconda della linea cellulare utilizzata. Recenti studi hanno dimostrato, infatti, che l'ALA-PDT è in grado di uccidere fibroblasti di criceto V79 tramite meccanismo apoptotico, mentre lo stesso trattamento

fotodinamico in cellule di adenocarcinoma umano WiDr portava a morte per necrosi (Noodt et al., 1996). Esperimenti condotti su fibroblasti embrionali di ratto trasformati (4R) hanno dimostrato che, almeno in vitro, è possibile modulare il tipo di morte cellulare indotta da ZnPc attraverso la scelta di un appropriato protocollo sperimentale; in particolare intervenendo sul tempo di incubazione e sulla dose di luce si può indurre un preferenziale meccanismo di morte nella stessa linea cellulare (Fabris, et al., 2001). Bisogna tener presente, tuttavia, che in alcuni casi uno stimolo di natura apoptotica può concludersi con un tipico quadro necrotico se si verifica un ulteriore danno cellulare tale da provocare la lisi (Oleinick, 1998). Va sottolineato inoltre che in seguito a trattamento fotodinamico non tutte le cellule vanno incontro a morte, alcune, mediante segnali intracellulari, innescano un meccanismo di sopravvivenza. Per esempio è stato scoperto che numerose stress-proteins (Heat shock proteins e Glucose-regulated proteins) sono indotte nella cellula dopo PDT e queste potrebbero prendere parte al processo di sopravvivenza cellulare (Moor, 2000). Ciò porta ad una minore efficacia della PDT che può essere migliorata solamente approfondendo gli studi sulle vie cellulari di trasduzione del segnale che conducono alla sopravvivenza queste cellule trattate. Attualmente le proprietà intrinseche della luce vengono sommate alla reattività fotoindotta di fotosensibilizzatori esogeni e da ciò deriva che la terapia fotodinamica rappresenta una nuova tecnica sperimentale per il trattamento di una grande varietà di tumori solidi. Il trattamento di tumori superficiali od endocavitari con terapia fotodinamica è già utilizzato in paesi come il Giappone, la Cina, gli Stati Uniti ed il Canada, mentre è in fase di applicazione in alcuni paesi europei tra cui la Svizzera, la Francia, la Gran Bretagna, la Germania e in qualche caso anche in Italia. Inoltre, essendo una terapia non invasiva si presta molto bene per trattamenti dermatologici, infatti si sono ottenuti successi nel trattamento di lesioni sia maligne che pre-maligne come il morbo di Bowen, la cheratosi attinica (Aks) e il carcinoma delle cellule

basali (*Leman e Morton, 2002*). Il fotosensibilizzatore più usato a livello clinico è il Photofrin. La PDT viene utilizzata nel trattamento di:

- ✓ tumori superficiali, in cui l'irradiazione è effettuato mediante sorgenti luminose esterne il cui fascio luminoso raggiunge direttamente l'area tumorale. Le applicazioni, in questo caso, riguardano i tumori della cute come, ad esempio, il trattamento di carcinomi recidivanti delle cellule basali, soprattutto se localizzati in aree difficili da resecare e che necessitano di un buon risultato estetico;
- ✓ tumori localizzati in cavità raggiungibili dall'esterno (cavità orale, esofago, polmoni, bronchi, colon utero, vescica, retto); la luce emessa dalla sorgente viene convogliata sino al tumore con fibre ottiche inserite in endoscopi. Nel caso di trattamenti a campi tissutali relativamente vasti, sono anche utilizzate fibre ottiche con terminazioni di geometria cilindrica o conica;
- ✓ masse voluminose, per le quali la fibra ottica è inserita all'interno del tumore per mezzo di aghi infissi nello stesso. In questo modo è possibile raggiungere strati di tessuto situati molto in profondità.

I maggiori successi si sono riscontrati in tumori primari di dimensioni relativamente piccole (diametro 1-2 cm circa). In caso di lesioni multiple o di recidivazione dei tumori già trattati è possibile ripetere la PDT. Inoltre la PDT in campo oncologico può essere utilizzata anche:

- ✓ per fini palliativi, ad esempio disostruzione delle vie respiratorie o della trachea, o per ridurre la massa neoplastica nel caso di tumori inoperabili;
- ✓ in combinazione con altre tecniche, ad esempio sterilizzazione del letto tumorale dopo rimozione chirurgica della neoplasia nel caso di tumori cerebrali o gastrointestinali per i quali la chirurgia è, tendenzialmente, conservativa. Ciò consente di ridurre l'entità dell'intervento chirurgico garantendo una miglior qualità di vita del paziente.

Attualmente in fase di sperimentazione clinica si trovano:

- ✓ la Sn-eziopurpurina (SnET2) una clorina che attualmente è in fase II di sperimentazione negli USA per il trattamento di metastasi

cutanee del tumore della mammella e del sarcoma di Kaposi in pazienti con sindrome dell'immunodeficienza acquisita (HIV);

✓ la tetra-(meso-idrossifenil)clorina (mTHPC), un fotosensibilizzatore clorinico in sperimentazione in Europa e negli Stati Uniti per il trattamento di tumori facciali e bronco-polmonari;

✓ la mono-aspartil clorina e6 (Npe6) in uso in Giappone per il trattamento del cancro polmonare; la BPD-MA, un derivato della benzoporfirina, in fase di sperimentazione per il trattamento di tumori cutanei (*Leung, 1994*), anche se più interessante è l'applicazione in campo oftalmologico. A questo proposito viene usata la verteporfirina (una benzoporfirina attivata da luce a lunghezza d'onda di 689 nm) che danneggia selettivamente le cellule endoteliali delle neovascolarizzazioni nei pazienti con degenerazione senile della macula (AMD), la più comune causa di cecità in persone che superano i 50 anni di età (*Scott e Goa, 2000*).

Il carcinoma delle cellule squamose (SCC) è un'ipercheratosi, può derivare da una degenerazione della cheratosi attinica ed appare sotto forma di papule rosse o color carne, noduli o placche. Queste lesioni facilmente possono causare metastasi e dopo asporto della parte danneggiata c'è il rischio di una ricaduta. Diversi studi hanno avvalorato la tesi che la PDT in questi casi funziona ed il rapporto più recente dimostra che su 28 casi trattati il 79% risponde completamente (*Fritsch et al., 1998*). Altri sviluppi si attendono per migliorare l'efficienza della sorgente luminosa in modo da diminuire il tempo di irradiazione, nuovi fotosensibilizzatori topici che forniscano nuove garanzie e vantaggi e, infine, nuovi fotosensibilizzatori sistemici che non determinino una fotosensibilità sistemica prolungata.

1.5 Interazione tra boro e neutroni termici

Il ^{10}B si trova nella tavola periodica al quinto posto tra il carbonio (non metallo) e l'alluminio (metallo), il suo nucleo è costituito da cinque protoni e da cinque neutroni e attorno ad esso ruotano cinque elettroni che ne determinano la reattività. In natura è possibile trovare anche l'isotopo ^{11}B che si differenzia dal ^{10}B per la presenza di un neutrone in più nel nucleo. L'isotopo ^{10}B è l'unico elemento con un basso peso molecolare caratterizzato da un'elevata propensione a legare neutroni lenti (termici) nel nucleo in quanto è caratterizzato da un'elevata cross section che risulta essere di 3837 barn per il boro mentre per la maggior parte degli altri elementi si aggira tra 0.1 e 50 barn. L'interazione tra ^{10}B e neutroni termici determina la formazione di ^{11}B in uno stato eccitato e instabile la cui fissione provoca la formazione di due particelle pesanti ^7Li ed ^4He (particella α), più fotoni γ .



Mentre il fotone viene rilasciato, litio ed elio si muovono molto velocemente in direzioni opposte distruggendo quello che incontrano lungo il loro percorso, ma, essendo molto energetiche, high-Linear Energy Transfer (high LET) possono diffondere in uno spazio molto piccolo, nell'ordine di un diametro cellulare (particella α , 9 μm ; ^7Li , 5 μm).

Il boro in natura si trova spesso sotto forma di ossidi come il borace, l'acido borico e l'anidride borica, invece non si trova mai combinato con l'idrogeno. Nel 1910 Alfred Stock riuscì a sintetizzare idrati di boro (*borani*): diborano (B_2H_6), pentaborano (B_5H_9) e decaborano ($\text{B}_{10}\text{H}_{14}$). Successivamente sono state create alcune strutture poliedriche contenenti non solo atomi di boro, ma anche metalli e questo ha

ampliato le conoscenze sulla chimica del boro evidenziando la possibilità di sintetizzare nuove molecole utilizzabili come portatori di boro nei tessuti (*Hawthorne, 1995*).

I neutroni vennero scoperti nel 1932 e poco dopo venne ipotizzato l'utilizzo dei prodotti di fissione del ^{10}B per trattare i tumori (radioterapia). I neutroni si possono ottenere da reattori nucleari, acceleratori di protoni o anche da radionuclidi come il ^{252}Cf . Attualmente, per trattamenti BNCT di tumori non-superficiali come il glioma, vengono utilizzate sorgenti di neutroni epitermici che possiedono una maggiore energia rispetto ai termici e quindi riescono a penetrare più in profondità nei tessuti. Durante il percorso essi perdono parte della loro energia diventando neutroni termici. Le sorgenti di neutroni epitermici, tuttavia, sono sempre contaminate da neutroni ad elevata energia, neutroni veloci, che provocano, come i raggi γ una serie di effetti non localizzati e non specifici nei tessuti e di conseguenza non ottimali per il trattamento di un tumore solido.

1.6 Principi base della terapia per cattura neutronica da parte del boro (BNCT)

BNCT è una terapia binaria che si svolge in due tempi:

1. il composto boronato viene somministrato al paziente nel momento in cui si ha il massimo accumulo di boro nel tumore,
2. il tumore viene irradiato con neutroni termici.

L'atomo di ^{10}B risulta ideale per la radioterapia per diverse ragioni:

- ✓ non è radioattivo;
- ✓ le particelle emesse dalla sua fissione, ^7Li ed ^4He , hanno un elevato LET e quindi sono in grado di distruggere le cellule tumorali ;

✓ può essere incorporato in molte diverse strutture chimiche anche se non tutte possono essere utilizzate in BNCT.

I protocolli clinici approvati in USA prevedono l'utilizzo del sodio mercaptododecaborano (BSH) per il trattamento del glioma e dell'aminoacido p-borofenilalanina (BPA) per il trattamento del melanoma melanotico.

Il BSH è un composto piccolo idrofilico che non è in grado di attraversare la BBB (blood-brain barrier) quando è integra, ma dove la barriera encefalica è danneggiata, ossia a livello del tumore primario, riesce a penetrare e viene accumulato abbondantemente dalla materia bianca mielinica del cervello (*Gavin, 1993*). Sembra inoltre che BSH sia in grado di accumularsi nella parte centrale del tumore, ossia dove la vascolarizzazione è pressoché assente (*Petterson, 1992*).

La BPA è meno idrofilica del BSH e viene utilizzata per il trattamento del melanoma melanotico. La sua struttura chimica è molto simile a quella della tirosina che è un precursore della melanina e proprio questa somiglianza ha spinto i ricercatori a pensare che potrebbe venire accumulata selettivamente in cellule di melanoma (*Matalka, 1992*). La scarsa idrofilicità di BSA rende più difficili i protocolli clinici in quanto è indispensabile complessarla con fruttosio per riuscire a migliorare la sua idrosolubilità (*Coderre, 1994*).

Attualmente, altri composti boronati sono stati sintetizzati e si stanno studiando. Si possono dividere in due categorie:

- a. ad alto peso molecolare;
- b. a basso peso molecolare (in cui sono incluse BSH e BPA).

Composti ad alto peso molecolare che possono essere caricati con atomi di boro sono:

- liposomi, microsfeere e LDL (*Hawthorne, 1990*);
- anticorpi monoclonali (*Rodriguez, 1991*);
- fattori di crescita e ormoni (*Barth, 1990*);
- oligonucleotidi antisenso (*Spiegelvogel, 1993*).

Composti a basso peso molecolare sono:

- nucleosidi che vengono convertiti in nucleotidi e successivamente incorporati nel DNA o RNA (*Rong, 1994*);
- tiourea che si localizza nella melanina durante la sua sintesi. Essa lega il dopa chinone e lentamente viene intrappolata nel polimero di melanina (*Larsson, 1991*);
- porfirine (*Fairchild, 1990*) che come è noto si localizzano selettivamente nel tumore e vengono eliminate molto velocemente dal sangue. Alcuni studi su una porfirina (BOPP) avevano dimostrato che veniva accumulata dal tumore 20 volte di più rispetto a BSH e veniva eliminata in tempi più brevi dall'organismo (*Ceberg, 1995*).

Su queste basi è stato possibile ipotizzare l'utilizzo di un'unica molecola che agisse contemporaneamente da foto- e radio-sensibilizzatore: le porfirine e i loro derivati (ftalocianine e clorine) caricate nei sostituenti periferici con carborani diventano allo stesso tempo cromofori in grado di foto-sensibilizzare le cellule, ma anche carriers per il boro. Esse rispettano inoltre le caratteristiche fondamentali richieste in entrambe le terapie: non sono intrinsecamente tossiche, agiscono in un limitato microintorno e vengono eliminate dal sangue in tempi brevi.

2. PARTE SPERIMENTALE

2.1 Composti boronati

I diversi derivati boronati studiati nel corso della presente tesi, come radio- e foto-sensibilizzanti, sono stati sintetizzati in due diversi laboratori: le ftalocianine ZnB_4Pc e SiB_2Pc presso il laboratori R&S appartenente alla ditta Molteni Farmaceutici di Firenze (Dr. Gabrio Roncucci), mentre le altre ftalocianine, la porfirina e la clorina presso il Department of Chemistry dell'Università di Baton Rouge in Louisiana (Dr. Maria G. Vicente). Tutte le ftalocianine, la porfirina e la clorina ci sono state fornite sotto forma di polveri cristalline e le loro strutture chimiche con le relative abbreviazioni utilizzate sono mostrate in **Tabella 1**. Il coefficiente di estinzione molare è stato calcolato per ogni molecola dopo avere sciolto ciascuna polvere nel suo solvente di preferenza, in particolare DMF per ZnB_4Pc e SiB_2Pc , DMSO per le altre ftalocianine e la clorina TPCF e infine MeOH per la porfirina H_2TCP , e la lunghezza d'onda alla quale sono state effettuate le analisi spettrofotometriche corrispondeva per ciascuna molecola al suo picco massimo di assorbimento. Gli spettri di assorbimento sono stati ottenuti con uno spettrofotometro Cary Eclipse 50 Scan, utilizzando cuvette di quarzo con cammino ottico pari ad 1 cm. L'emissione di fluorescenza è stata misurata mediante uno spettrofotofluorimetro Cary Eclipse Varian. I campioni venivano diluiti fino ad ottenere un'assorbanza inferiore a 0.1 al picco massimo di assorbimento e poi eccitati con luce ad una lunghezza d'onda corrispondente al picco massimo di assorbimento, la fluorescenza era quindi registrata nell'intervallo tra 600 e 800 nm.

Per gli esperimenti su colture cellulari le polveri venivano sciolte nel loro solvente per poi essere portate alla concentrazione desiderata nel mezzo cellulare costituito da DMEM e il 10% di FBS mentre le ftalocianine ZnB₄Pc e SiB₂Pc sono state somministrate a cellule e animali in forma liposomiale.

2.2 Materiali

Il materiale plastico usato per le colture cellulari è stato fornito dalla ditta Falcon. Il siero fetale bovino (FBS) era un prodotto della Gibco BRL. Il mezzo di Eagle modificato da Dulbecco (DMEM) e gli antibiotici (penicillina, streptomina, anfotericina e glutamina) provenivano dalla Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). La tripsina è stata fornita dalla Seromed (Berlino). I liposomi utilizzati erano costituiti da 1,2 dioleoil-sn-glicerolo-3-fosfolina (DOPC) o da dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC): entrambi i lipidi erano forniti da Avanti Polar Lipids, Inc. I coloranti utilizzati per la microscopia a fluorescenza erano Hoëchst33342 (HO342) prodotto dalla Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) e Lucifer Yellow CH (Molecular Probes). Il kit per il dosaggio delle proteine mediante il metodo dell'acido bicinonico (BCA) è stato prodotto dalla Pierce (Illinois, USA). Il kit ApoAlert CPP32 contenente i reagenti per il saggio dell'attività della caspasi-3 (CPP32) è stato acquistato dalla Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, California). Tutti i sali e solventi utilizzati sono prodotti commerciali di grado analitico.

La linea cellulare B16F1 utilizzata per gli esperimenti *in vitro* proveniva da melanoma melanotico murino di topi C57BL/6. Le cellule venivano coltivate usando il mezzo di Eagle modificato da Dulbecco (DMEM) contenente il 10% di siero fetale bovino (FCS) inattivato con il calore (56°C per 30 min). Al mezzo venivano aggiunti a

completamento 100 unità/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomina, 0.25 µg/ml di anfotericina e glutamina 2 mM. Le colture cellulari venivano mantenute a 37°C in un'atmosfera contenente il 5% di CO₂. Le cellule venivano tripsinizzate a raggiungimento della confluenza utilizzando tripsina allo 0.05% in soluzione di EDTA allo 0.02%. L'azione della tripsina veniva bloccata con l'aggiunta di siero fetale bovino (FCS).

Gli studi in vivo sono stati eseguiti con topi C57BL/6 di sesso femminile e del peso corporeo di circa 20 g. Gli animali provenivano dalla ditta Charles River (Como) e venivano allevati e controllati secondo le normative previste dal comitato etico dell'Università di Padova per la sperimentazione animale. L'anestesia utilizzata negli esperimenti di foto-e radio-sensibilizzazione era Zoletil (Virbac, Milano, Italia) ad una concentrazione di 40 mg/kg secondo le dosi consigliate dai produttori.

2.3 Determinazione della resa quantica di generazione di ossigeno di singoletto (DMA)

La resa quantica di produzione di ossigeno di singoletto da parte dei vari fotosensibilizzatori utilizzati è stata valutata *in vitro* seguendo la foto-ossidazione del substrato modello 9,10-dimetilantracene che reagisce con questa specie reattiva dell'ossigeno dando luogo alla produzione di 9,10-endoperossidi con efficienza di "quenching" chimico pari al 100% (Gross, 1992). Le soluzioni sottoposte a questo tipo di studio contenevano una concentrazione di DMA pari a 10 µM in N,N-dimetilformammide, dimetilsofossido o metanolo e una concentrazione

dei fotosensibilizzatori tale da avere un'assorbanza pari a 0.2 al massimo di assorbimento. La soluzione era posta in una cuvetta di quarzo con cammino ottico pari a 1 cm, e veniva irradiata sotto agitazione magnetica per vari intervalli di tempo ad una velocità di fluensa pari a 100 o 50 mW/cm² con luce di lunghezza d'onda pari a 600-700 nm per quanto riguarda la ftalocianina. La resa quantica di formazione di ¹O₂ è stata valutata seguendo la diminuzione di fluorescenza del DMA in funzione del tempo d'irradiazione. Le misure di fluorescenza sono state effettuate eccitando la soluzione a 360 nm e osservando l'emissione nell'intervallo spettrale tra 380 e 550 nm. La costante di velocità, per la foto-ossidazione del DMA, (che segue una cinetica di primo ordine) è uguale alla pendenza della retta ottenuta mettendo in grafico il $\ln F_0/F$ in funzione del tempo d'irradiazione espresso in secondi. F_0 ed F rappresentano, rispettivamente, l'intensità di emissione di fluorescenza al tempo 0 e al tempo t d'irradiazione (Gross, 1992). La costante cinetica viene convertita in resa quantica di produzione di ossigeno di singoletto confrontando le costanti di foto-ossidazione in presenza dei vari fotosensibilizzatori con quella ottenuta nelle stesse condizioni sperimentali utilizzando un fotosensibilizzatore di riferimento: Zn(II)-ftalocianina, la cui resa quantica di produzione di ¹O₂ è stata misurata essere pari a 0.55 (Valduga, 1992).

2.4 Fotostabilità

La fotostabilità delle molecole di fotosensibilizzatore esposte a specifiche lunghezze d'onda dello spettro visibile è stata valutata in soluzione nei loro solventi di preferenza. A tal fine, i campioni sono stati irradiati per determinati tempi d'irradiazione ed è stata seguita la diminuzione di assorbanza in corrispondenza del picco di massimo

assorbimento. In questi esperimenti, i vari fotosensibilizzatori in soluzione omogenea od incorporati in liposomi sono stati posti in una cuvetta di quarzo con cammino ottico pari ad 1 cm, e sotto agitazione magnetica, sono stati irradiati, per diversi intervalli di tempo, compresi tra 0 e 30 min. La luce utilizzata aveva una lunghezza d'onda compresa tra 600 e 700 nm e l'irradiazione veniva effettuato ad una velocità di fluenza pari a 100 mW/cm^2 , utilizzando una lampada ad alogeni (Waldmann, Schwenningen, Germania). A tempi prefissati la soluzione veniva prelevata ed era eseguito uno spettro di assorbimento nell'intervallo tra 300 e 850 nm mediante uno spettrofotometro Cary Eclipse 50 Scan. La fotostabilità veniva determinata misurando il calo di assorbanza in prossimità del massimo del monomero rispetto al valore di assorbanza misurata al $t=0$.

2.5 Preparazione dei liposomi

Le vescicole unilamellari di liposomi DPPC aventi un diametro di circa 100 nm sono state preparate mediante iniezione etanolica secondo il metodo di Kremer (Kremer et al., 1977), co-solubilizzando in etanolo la ftalocianina con il fosfolipide desiderato. In una tipica preparazione, 0.75 ml di questa soluzione sono iniettati in 10 ml di PBS 10 mM a pH 7.4, alla temperatura di 56°C per i DPPC, vale a dire a temperatura superiore alla temperatura critica. A temperatura ambiente le vescicole di DPPC sono in fase gel. La sospensione liposomiale ottenuta è dializzata contro PBS per 3 h.

I liposomi DOPC, che invece si trovano sotto forma di polvere, venivano risospesi in cloroformio (20 mg/ml) ed un'aliquota di questa soluzione veniva aggiunta ad una di ftalocianina sciolta anch'essa in cloroformio. Il rapporto molare tra lipidi e ftalocianina doveva essere

200:1. Le due soluzioni venivano quindi poste in un rotavapor ed essiccate a temperatura ambiente e sotto un costante flusso di azoto. La pellicola costituita da ftalocianina e fosfolipidi veniva in seguito risospesa in PBS e sonicata per 30 minuti con un sonicatore Rapidis 300 (Paul Funke e Co., Milano). Anche questa operazione avveniva sotto costante flusso di azoto. Infine, la sospensione ottenuta veniva filtrata (0,2 μm) per ottenere una popolazione di liposomi uniforme.

Per entrambi i tipi di liposomi sono stati effettuati gli spettri di assorbimento e fluorescenza per accertarsi della monomericità del fotosensibilizzatore incorporato.

2.6 Accumulo di derivati boronati da cellule

L'efficienza di accumulo di boro-porfirine ed analoghi nelle cellule è stata studiata in funzione della concentrazione di derivato boronato nel mezzo di coltura e in funzione del tempo di incubazione. In questo tipo di esperimento venivano seminate 3×10^5 cellule in fiasche di superficie pari a 25 cm^2 e lasciate crescere per circa 24 h in DMEM contenente il 10% di FCS. Lo studio delle ftalocianine (MeOKs, OHKs, PEGKs, DiKs), della porfirina H_2TCP e della clorina TPCF prevedeva che alcune fiasche venissero incubate per 24 h con 4 ml di soluzione contenente DMEM e il sensibilizzatore, già sciolto nel suo solvente, a concentrazione variabile da 1 μM a 100 μM , mentre altre fiasche venivano incubate per tempi variabili da 1 a 24 h con una soluzione a una concentrazione costante di 20 μM . L'incubazione veniva effettuata al buio ad una temperatura di 37°C e in atmosfera contenente il 5% di CO_2 . Per quanto riguarda le ftalocianine ZnB_4Pc e SiB_2Pc gli esperimenti si svolgevano alla concentrazione 7 μM che era la più alta raggiungibile dalla soluzione liposomale DPPC. Quindi variavano esclusivamente i

tempi di incubazione da 1 a 24 h. Alla fine del periodo di incubazione, il mezzo di coltura contenente il sensibilizzatore veniva rimosso e il monostrato cellulare veniva lavato due volte con PBS contenente Ca^{2+} e Mg^{2+} per rimuovere il sensibilizzatore non legato alle cellule. Alle fiasche venivano poi aggiunti 2 ml di una soluzione acquosa di SDS al 2%. Questo detergente permette la lisi delle cellule e impedisce la formazione di aggregati intermolecolari di sensibilizzatore incorporandolo, allo stato di monomero, nell'interno apolare delle micelle. La sospensione era sottoposta ad agitazione meccanica per 1 h e poi ad agitazione magnetica per 30 min a temperatura ambiente. Successivamente, da ogni campione venivano ricavate due aliquote, di cui una veniva utilizzata per il dosaggio della quantità di sensibilizzatore accumulato dalle cellule, mentre l'altra veniva diluita 1:2 (v/v) con acqua milli-Q e utilizzata per il dosaggio delle proteine cellulari. Dalla prima aliquota si misurava la fluorescenza emessa nell'intervallo compreso tra 650 e 800 nm in seguito ad eccitazione a 630 nm con l'utilizzo di uno spettrofotofluorimetro Cary Eclipse Varian. La concentrazione di composto boronato nei campioni era poi calcolata mediante interpolazione con una retta di taratura ottenuta misurando l'intensità di fluorescenza emessa da soluzioni contenenti concentrazioni note di sensibilizzatore in SDS al 2%.

Il contenuto proteico del lisato cellulare era determinato mediante un saggio inizialmente descritto da *Smith (1985)*. Il metodo combina la proprietà delle proteine di ridurre, in mezzo alcalino, lo ione Cu^{2+} a Cu^{1+} (*Lowry, 1951*) con la caratteristica dell'acido biconinico (BCA) di interagire con lo ione rameoso (Cu^{1+}). Il prodotto della reazione è un complesso tra due molecole di BCA e una molecola di rame. Il complesso è solubile in acqua e assorbe intensamente alla lunghezza d'onda di 562 nm.

L'accumulo delle molecole nelle cellule veniva espresso come nmoli di sensibilizzatore per mg di proteine cellulari.

2.7 Studi di distribuzione subcellulare in microscopia di fluorescenza

La localizzazione intracellulare di composti boronati è stata studiata mediante microscopia di emissione di fluorescenza sfruttando la tipica fluorescenza emessa dai sensibilizzatori dopo eccitazione con una lunghezza d'onda pari ai rispettivi picchi di assorbimento.

I campioni per le osservazioni al microscopio venivano preparati seminando 5×10^4 cellule su vetrini coprioggetto preventivamente sterilizzati e posti all'interno di dischetti aventi 3.5 cm di diametro. Dopo circa 24 h le cellule venivano incubate con il sensibilizzatore ad una concentrazione precedentemente scelta in base alle capacità di accumulo e di sensibilizzazione di ciascun composto. Al termine del tempo di incubazione (24 h), il mezzo veniva rimosso e il monostrato cellulare veniva lavato per due volte con PBS contenente Ca^{2+} e Mg^{2+} . Per le osservazioni al microscopio il vetrino con le cellule adese veniva trasferito in una cameretta contenente PBS con Ca^{2+} e Mg^{2+} . Il microscopio utilizzato era un Olympus IMT-2 equipaggiato con lampada Xenon (75 W) e una telecamera CCD (Micromax, Princeton Instruments). Le immagini delle cellule fluorescenti erano ottenute con un obiettivo 60x (Nikon) ad immersione ad olio, NA 1.4, e analizzate con software Metamorph (Universal Imaging). La fluorescenza delle molecole nelle cellule è stata osservata utilizzando filtri che selezionano lunghezze d'onda centrate a 655 e 710 nm, rispettivamente per l'eccitazione e l'emissione nel caso delle ftalocianine, ed a 400 e 620 nm per la porfirina e la clorina.

Inoltre, per identificare in modo più preciso qual è il compartimento cellulare in cui la molecola si concentra, è stato usato il colorante fluorescente endosomiale Lucifer yellow CH. La fluorescenza della sonda, in questo caso, è stata osservata mediante un set di filtri che

seleziona lunghezze d'onda centrate a 425 nm per l'eccitazione ed a 520 nm per l'emissione.

2.8 La colonna termica

La colonna termica utilizzata per gli esperimenti di BNCT è stata realizzata dall'INFN di Legnaro durante lo svolgimento di questo progetto valutando la necessità di ottenere una sorgente neutronica il più possibile pulita da raggi gamma e neutroni veloci, dato che i primi esperimenti *in vivo* avevano sottolineato il grande danno provocato da tali componenti del fascio. È stata costruita quindi HYTHOR, una colonna termica facilmente inseribile nel reattore TAPIRO (ENEA Casaccia, Roma) utilizzato per tutti gli studi BNCT effettuati.

HYTHOR si può suddividere in due parti: una necessaria alla produzione di neutroni termici (beam shaping assembly, BSA), l'altra a contenere i campioni da irradiare. Il BSA viene inserito vicino al centro del reattore, dove avviene la produzione di neutroni veloci, ossia ad alta energia, ed è costituito da una lastra di piombo (Pb) che blocca i raggi gamma prodotti dal nucleo del reattore e diminuisce l'energia dei neutroni, da una di teflon (CF₂) che porta l'energia dei neutroni a livello di epitermici ($E < 10$ keV) ed infine uno strato di grafite fa decadere ulteriormente l'energia dei neutroni epitermici ottenendo neutroni termici ($E < 0.4$ eV). La camera di irradiazione è costituita da pareti di bismuto e teflon che termalizzano ulteriormente i neutroni. I topi venivano posizionati, dopo essere stati anestetizzati, su due tavolette di plexiglass infilate orizzontalmente nelle pareti di bismuto. Allo stesso modo i dischetti contenenti le cellule venivano adagiati sulle tavolette ed inseriti nella camera che poteva quindi essere inserita ed estratta ad ogni irradiazione.

2.9 Studi di foto-/radio-sensibilizzazione in cellule

Per questi esperimenti venivano preparati un certo numero di dischetti Petri del diametro pari a 3.5 cm in ognuno dei quali venivano seminate 10^5 cellule in 2 ml di DMEM con il 10% di FCS. Le cellule venivano lasciate crescere per circa 24 h, da ogni dischetto veniva poi rimosso il mezzo di crescita e sostituito con 1 ml di DMEM contenente la molecola a concentrazioni variabili e lasciate per tempi variabili al buio a 37°C. Alla fine del tempo di incubazione, il mezzo contenente il sensibilizzatore veniva rimosso ed ogni dischetto Petri veniva lavato due volte con 2 ml di PBS contenente Ca^{2+} e Mg^{2+} e riempito con 1 ml di PBS.

A questo punto per quanto riguarda gli esperimenti di foto-sensibilizzazione i dischetti venivano irradiati per un tempo variabile utilizzando una sorgente luminosa Waldmann (Schwenningen, Germania) costituita da lampada ad alogeni munita di filtro ottico a larga banda per isolare l'intervallo di lunghezze d'onda pari a 600-700 nm. La velocità di fluensa impiegata era di 20 o 50 mW/cm².

Per quanto concerne gli esperimenti di radio-sensibilizzazione, invece, i dischetti venivano irradiati per vari tempi utilizzando un flusso di neutroni termici prodotti dal reattore nucleare Tapiro (ENEA Casaccia, Roma) con una potenza di 5 kW.

Al termine di entrambe le modalità di irradiazione veniva rimosso da ogni dischetto il PBS e sostituito con 2 ml di DMEM contenente FCS al 10%. Alcuni dischetti incubati con il sensibilizzatore non venivano irradiati e servivano come controlli per verificare la non tossicità della molecola in assenza di luce. A distanza di 18/24 h dalla fine dell'irradiazione l'effetto del trattamento sulle cellule veniva valutato mediante il saggio di esclusione del Trypan blue. La percentuale di sopravvivenza cellulare veniva valutata confrontando il numero di

cellule presenti nei dischetti trattati con quello presente nei dischetti né irradiati né incubati usati come controllo.

2.10 Studi farmacocinetici in topi portatori di tumore

I topi C57BL/6 venivano depilati nella zona sottoascellare 24 h prima di subire un inoculo sottocutaneo di 20 μ l di soluzione contenente 10^6 cellule B16F1 sospese in DMEM per ciascun topo. Dopo circa una settimana in cui il melanoma melanotico cresceva, gli animali venivano sottoposti ad iniezione del composto da studiare attraverso la vena caudale allo scopo di valutare la sua distribuzione nel tumore rispetto ai tessuti sani e il tempo di permanenza della sostanza a livello del circolo sanguigno e degli altri organi in cui si accumulano. Le ftalocianine alla concentrazione di 3 mg/kg per ZnB₄Pc e 0,45 mg/kg per SiB₂Pc venivano iniettate negli animali in sospensione liposomiale (rispettivamente in DOPC e DPPC). A tempi diversi, compresi tra 3 h e 1 settimana dopo l'iniezione gli animali venivano sacrificati mediante dislocazione della seconda vertebra cervicale per raccogliere ed analizzare tumore, cute distale, cute peritumorale, sangue, fegato, reni, milza, polmoni e cervello. Il sangue veniva centrifugato a 3,000 rpm per 10 min per consentire la separazione del plasma. I livelli di ftalocianina venivano determinati mediante analisi spettrofotofluorimetrica dopo diluizione dei campioni con una soluzione di cloroformio-metanolo (1:2, v/v).

Gli organi venivano pesati in una bilancia analitica di precisione e in seguito omogenati in 2 ml di SDS al 2% con l'ausilio del Polytron cui seguiva agitazione magnetica per almeno 1 h. I campioni venivano, a questo punto, diluiti 1:5 in una soluzione di cloroformio-metanolo (1:2,

v/v): il metanolo precipitava le proteine ed altri componenti degli organi, mentre il cloroformio risolubilizzava la ftalocianine. La soluzione veniva quindi centrifugata per 15 min a 3,000 rpm. Il dosaggio delle ftalocianine accumulate veniva eseguito allo spettrofotofluorimetro Cary Eclipse Varian registrando lo spettro di emissione di fluorescenza nell'intervallo compreso tra 650 e 800 nm dopo eccitazione a 630 nm. L'intensità di fluorescenza misurata veniva convertita in concentrazioni di ftalocianina mediante interpolazione con una retta di taratura ottenuta misurando la fluorescenza emessa da soluzioni con concentrazioni note di sensibilizzatore. Il recupero della ftalocianina dai suddetti organi veniva espresso come nmoli di sostanza / g di tessuto.

Gli esperimenti di farmacocinetica per la porfirina H₂TCP si sono svolti con le stesse modalità utilizzate per le ftalocianine, ma in questo caso il composto è stato sciolto in diversi veicolanti per poter individuare la formulazione più adatta. Essenzialmente le modalità di somministrazione sono state tre: soluzione in 20% DMSO, 30% PEG400, 50% H₂O; incorporazione in Cremophor EL; soluzione in metanolo (massimo 1%), 20% DMSO, 30% PEG400, 49% H₂O.

Per quanto riguarda la clorina la soluzione iniettata nei topi portatori di tumore era costituita da 20% DMSO, 30% PEG400, 50% H₂O.

Per entrambe la diluizione precedente alla lettura allo spettrofotofluorimetro avveniva esclusivamente con SDS al 2%.

2.11 Osservazione di sezioni di tumore mediante microscopia di fluorescenza

Per valutare l'efficacia della porfirina H₂TCP l'iniezione è stata effettuata sia per via endovenosa (i.v.) che per via intratumorale (i.t.). In alcuni casi gli animali trattati venivano sacrificati 30 min dopo l'i.t. o

24 h dopo l'i.v. e veniva prelevato il tumore con la cute sovrastante. Quindi si procedeva alla criofissazione utilizzando un mezzo da congelamento per tessuti. I campioni sono stati poi tagliati al criostato in modo da ottenere sezioni dello spessore di 8-10 μm . Per poterli osservare al microscopio a fluorescenza i campioni sono stati coperti con una soluzione di glicerolo al 50% in tampone e sopra è stato posto il vetrino coprioggetto. Le osservazioni delle sezioni sono state effettuate con il microscopio a fluorescenza utilizzando obiettivi 20 e 40x e analizzate con il software Metamorph.

2.11 Studi di PDT sperimentale

I topi venivano preparati al trattamento come descritto nel caso degli esperimenti di farmacocinetica. Dopo circa una settimana dall'inoculo del tumore, una soluzione contenente la sostanza da testare veniva iniettata i.v. ed a vari tempi dopo l'iniezione (3, 24, 48 h) i topi venivano anestetizzati ed irradiati utilizzando luce rossa (600-700 nm) ad una velocità di fluensa variabile tra 135 e 180 mW/cm^2 .

Al termine dell'irradiazione ogni topo veniva riposto nella gabbia e nei giorni successivi all'irradiazione venivano monitorate le dimensioni del tumore. Il volume del tumore veniva calcolato considerandolo un semiellissoide, misurando i due assi perpendicolari (a e b) e lo spessore. La formula applicata era la seguente:

$$V = \frac{2}{3}\pi(a/2 b/2 c)$$

La crescita tumorale veniva seguita da un volume iniziale di circa 0.02 cm^3 ad 1.5 cm^3 . L'effetto del trattamento veniva valutato paragonando la velocità di crescita tumorale degli animali trattati con quella di animali non trattati. Per avere la certezza che la luce utilizzata non

avesse nessun effetto sulla crescita tumorale alcuni animali portatori di melanoma melanotico venivano solamente irradiati con le stesse modalità utilizzate per i topi trattati con i composti boronati.

2.12 Studi di BNCT sperimentale

I topi C57BL/6 sono stati inoculati, come negli esperimenti precedenti, con cellule di melanoma melanotico B16F1 circa una settimana prima di venire trasferiti presso il reattore TAPIRO (ENEA Casaccia, Roma). In questa sede gli animali venivano iniettati con la soluzione contenente il composto da testare e dopo 3 o 24 h venivano irradiati con neutroni termici per vari tempi. I gruppi irradiati erano formati da sei animali ciascuno ed ognuno di essi veniva precedentemente anestetizzato ed avvolto da una protezione costituita da acido borico necessaria per proteggere gli eventuali organi interni contenenti boro. Nei giorni successivi il volume del tumore veniva monitorato come nel caso dei foto-trattamenti, e la velocità di crescita veniva paragonata a quella di animali di controllo non iniettati e non irradiati e con quelli solo irradiati. Ovviamente anche gli animali di controllo venivano trasportati per simulare lo stesso livello di stress subito dagli animali trattati.

3. Risultati

3.1 Caratterizzazione spettroscopica degli agenti foto- e radio-sensibilizzanti

Tutti gli esperimenti che non implicassero studi di radio-sensibilizzazione si sono svolti utilizzando le molecole caricate con ^{11}B , l'isotopo del boro più abbondante in natura e di conseguenza meno dispendioso. Ovviamente, gli esperimenti di BNCT invece si sono svolti con molecole caricate con ^{10}B .

Le due ftalocianine ZnB_4Pc e SiB_2Pc , che per la loro natura molto idrofobica sono state utilizzate in soluzione liposomiale negli esperimenti, durante gli studi spettroscopici hanno dimostrato come sia in sospensione liposomiale che in soluzione nel loro solvente di preferenza (DMF), sono stabili almeno per una settimana. Anche gli altri composti boronati hanno dimostrato, mediante studi spettroscopici di essere stabili nel proprio solvente.

In **Figura 1** sono stati riassunti i tipici spettri di assorbimento e di emissione rispettivamente di un ftalocianina, di una porfirina e di una clorina. Le ftalocianine presentano un picco massimo di assorbimento intorno ai 700 nm, mentre porfirine e clorine assorbono maggiormente lunghezze d'onda intorno ai 400 nm. Questo rende le ftalocianine i migliori candidati per quanto riguarda gli studi di PDT, in quanto in questo tipo di terapia la luce utilizzata è di lunghezze d'onda comprese tra 600 e 700 nm, ossia la più penetrante nei tessuti umani. Per quanto riguarda gli studi di BNCT non è molto importante il picco di assorbimento della molecola da utilizzare, ma la sua capacità di essere internalizzata dalle cellule. Poiché porfirine e clorine hanno dimostrato

in precedenti studi la tendenza ad essere selettivamente accumulate dai tessuti tumorali e inoltre possono essere caricate con atomi di boro nei loro sostituenti periferici sono state scelte per lo sviluppo di questo progetto. E' possibile comunque osservare che la porfirina presenta una serie di deboli picchi di assorbimento nella regione del rosso, mentre la clorina ha un intenso picco a 650 nm.

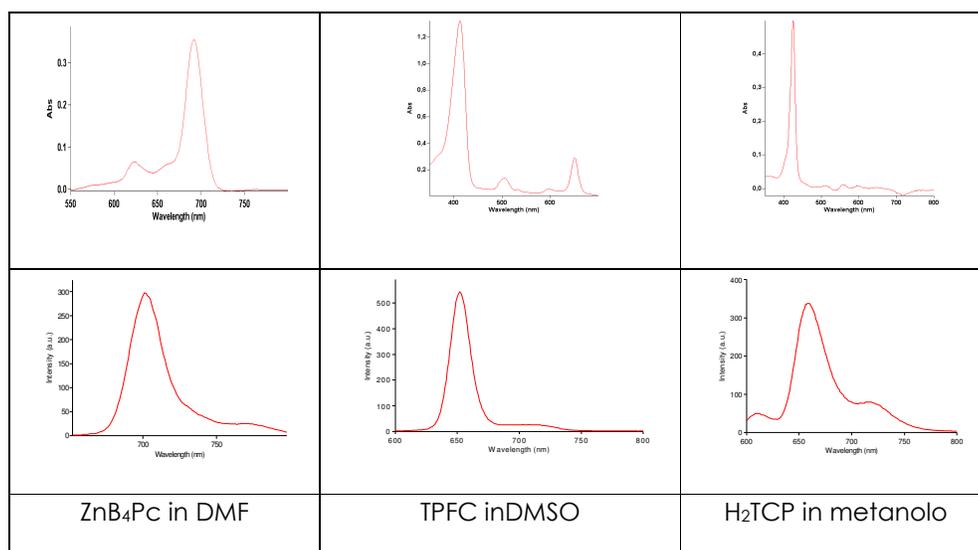


Figura 1 Esempi di spettri di assorbimento e di emissione di alcuni composti boronati.

In **Tabella 1** sono riassunte alcune delle caratteristiche più importanti dei composti studiati. La loro struttura chimica mostra come il macrociclo presente in tutte le molecole sia stato arricchito nei sostituenti periferici con cluster di boro. Ciascun carborano contiene 9 atomi di boro e quindi le molecole con 4 carborani possiedono un totale di 36 atomi ciascuno (ZnB₄Pc, Diks, H₂TCP e TPCF) mentre quelle con 2 carborani possiedono 18 atomi di boro (SiB₂Pc, MeOks, OHks, PEGks).

3.2 Resa quantica di determinazione delle specie $^1\text{O}_2$

Una proprietà molto importante per un foto-sensibilizzatore è la resa quantica di ossigeno di singoletto (ϕ_{Δ}) che si misura seguendo la foto-ossidazione del DMA in presenza del sensibilizzatore da studiare. Come si può vedere in **Figura 2** la fluorescenza del DMA che viene registrata dopo ogni irradiazione diminuisce gradualmente fino a raggiungere un valore di plateau. La velocità di foto-degradazione che viene calcolata è stata poi rapportata a quella della ZnPc di riferimento.

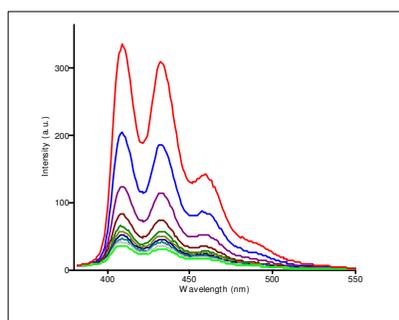
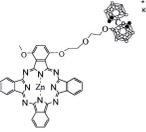
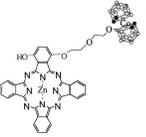
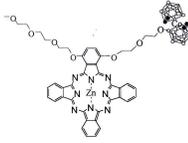
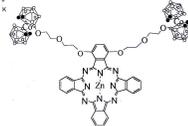


Figura 2 Esempio di foto-ossidazione del DMA irradiato in presenza della ftalocianina OHks

I valori che si sono ottenuti per ciascuna molecola sono riassunti in **Tabella 1** e la resa quantica di ossigeno di singoletto più alta è risultata quella della ftalocianina OHks (0.76), seguita da ZnB₄Pc e SiB₂Pc (rispettivamente 0.67 e 0.66). La più bassa invece è risultata quella della clorina TPCF (0.1). Generalmente le porfirine che risultano fotodinamicamente attive possiedono una ϕ_{Δ} compresa tra 0.5 e 0.6, quindi la clorina TPCF e la ftalocianina Diks, da questa analisi iniziale, non sembrano potersi classificare tra i buoni foto-sensibilizzatori.

Struttura	Peso molecolare	Picco massimo di assorbimento	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	Picco massimo di emissione	ϕ_{Δ}
 ZnB ₄ Pc	1540	690 nm	250.000	700 nm	0.67
 SiB ₂ Pc	943.2	675 nm	240.000	690 nm	0.66
 MeOKs	1074.36	627 nm	158.500	702 nm	0.4
 OHKs	1060.34	709 nm	123.000	715 nm	0.76
 PEGKs	1206.44	626 nm	155.000	702 nm	0.4
 DiKs	1512.61	626 nm	132.000	702 nm	0.23

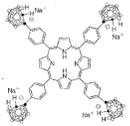
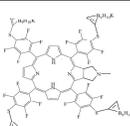
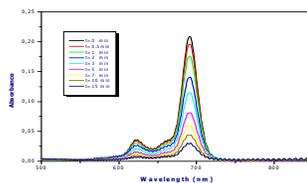
Struttura	Peso molecolare	Picco massimo di assorbimento	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	Picco massimo di emissione	ϕ_{Δ}
 H ₂ TCP	1392.31	420 nm	302.900	670 nm	0.44
 TPCF	1770	410 nm 650 nm	137.000	670 nm	0.1

Tabella 1. Struttura e principali caratteristiche foto-chimiche e foto fisiche dei composti boronati utilizzati

3.3 Studi di fotostabilità

In seguito ad irradiazione è possibile che il macrociclo delle molecole di sensibilizzatore si distrugga formando alcuni fotoprodotti che possono risultare tossici per le cellule. E' quindi necessario studiare la loro stabilità durante l'esposizione alla luce. Nel caso delle ftalocianine ZnB₄Pc e SiB₂Pc, lo studio è stato fatto sia nel caso in cui le due ftalocianine siano sciolte nel loro solvente sia che siano incorporate in liposomi (**Figura 3**).



	Tempo di irradiazione (min)								
	0	0.5	1	2	3	5	7	10	15
ZnB ₄ Pc	100	94	84	67	55	39	28	21	14
ZnB ₄ Pc in DOPC	100	77	60.5	39	25.6	14	-	-	-

Figura 3 Tipico studio sulla foto stabilità di una sostanza, in particolare il grafico e la tabella si riferiscono alla ZnB₄Pc.

Le ftalocianine ZnB₄Pc e SiB₂Pc hanno dimostrato che dopo prolungata esposizione a luce rossa diminuiscono la loro capacità di assorbimento, ma poiché lo spettro non mostra nuovi picchi si può anche dedurre che l'esposizione alla luce rossa provoca una irreversibile modifica del macrociclo tetra-azaisoindolico. Le altre ftalocianine (MeOks, OHks, PEGks e Diks), la porfirina e la clorina sono invece pressochè stabili anche dopo tempi di irradiazione pari a quelli utilizzati per gli esperimenti di PDT (**Figura 4**).

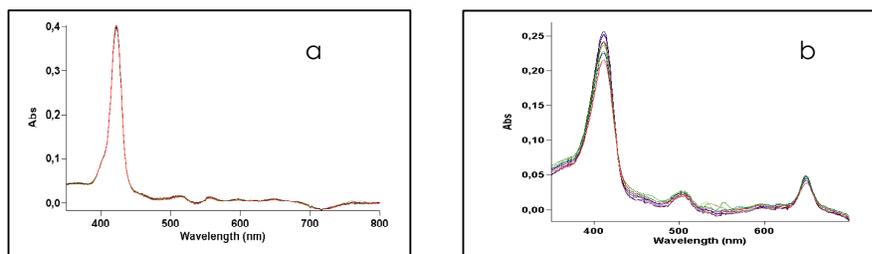


Figura 4 Spettro di assorbimento registrato durante l'irradiazione di una soluzione di H₂TCP (a) e di TPCF (b).

3.4 Le ftalocianine come agenti foto-/radio-sensibilizzanti

3.4.a. Accumulo in cellule tumorali

Gli studi sulla capacità delle cellule di melanoma melanotico murino B16F1 di accumulare le ftalocianine caricate con cluster di boro sono state eseguite utilizzando ZnB_4Pc incorporata in liposomi DOPC, e con SiB_2Pc incorporata in DPPC, mentre MeOks, OHks, PEGks e Diks erano semplicemente sciolte nel loro solvente (DMSO) e aggiunte al terreno di coltura cellulare (DMEM + 10 % FBS). La scelta dei veicolanti liposomiali per ZnB_4Pc e per SiB_2Pc è stata condizionata dalla necessità di cosolubilizzare la ftalocianina ed il fosfolipide nella stessa miscela solvente, come pure dalla stabilità del sistema liposoma-ftalocianina. Il fatto di essere incorporate in liposomi ha a sua volta influito sul valore della concentrazione utilizzabile per quanto riguarda SiB_2Pc in quanto le vescicole di DPPC non permettono di ottenere soluzioni molto concentrate di sostanza e quindi la massima dose di ftalocianina che si poteva somministrare alle cellule era $7 \mu M$. In realtà, nel caso della ZnB_4Pc nelle vescicole fluide di DOPC, sarebbe stato possibile utilizzare anche concentrazioni di sensibilizzatore più elevate; tuttavia, ci siamo limitati alla dose $7 \mu M$ al fine di ottenere dati paragonabili con quelli ottenuti negli studi svolti in presenza di SiB_2Pc . Com'è possibile vedere in **Figura 5** il tempo di incubazione influisce sull'accumulo di entrambe le ftalocianine da parte delle cellule. Mentre ZnB_4Pc raggiunge un livello di plateau a 0.6 nmoli / mg di proteine cellulari dopo 6 h di incubazione, anche SiB_2Pc mostra un plateau a 0.6 nmoli / mg di proteine tra le 3 e le 6 h, ma la concentrazione endocellulare di questa ftalocianina aumenta ulteriormente per tempi di incubazione dell'ordine delle 18-20 h fino a raggiungere valori di 1.5 nmoli / mg di proteine cellulari a 24 h.

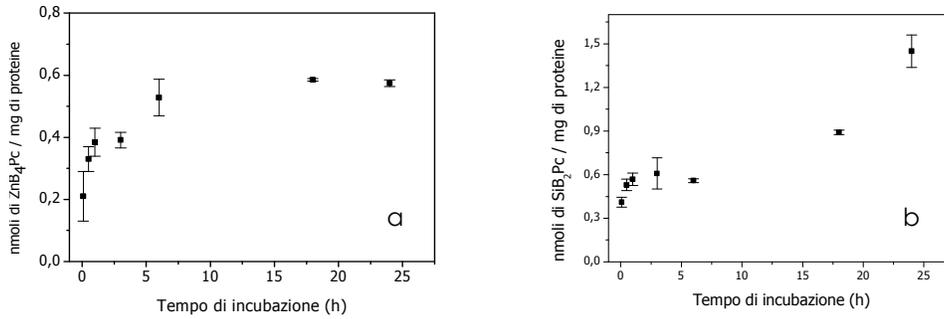


Figura 5 Esempi di esperimenti di accumulo di ftalocianine:
 a) cellule incubate per tempi diversi con ZnB₄Pc 7 μ M;
 b) cellule incubate per tempi diversi con SiB₂Pc 7 μ M.

Le prove di accumulo con le ftalocianine MeOks, OHks, PEGks e Diks sono state eseguite non solo in funzione del tempo di incubazione, ma anche variando la concentrazione del composto da analizzare. Osservando il grafico della **Figura 6**, è possibile notare come a 10 e 20 μ M i valori di accumulo siano simili tra i vari composti, mentre per valori pari a 50 μ M Diks venga accumulata in quantità che sono circa il doppio rispetto alle altre tre ftalocianine. In tutti i casi all'aumentare della concentrazione aumenta anche la quantità di sostanza recuperata dal lisato cellulare.

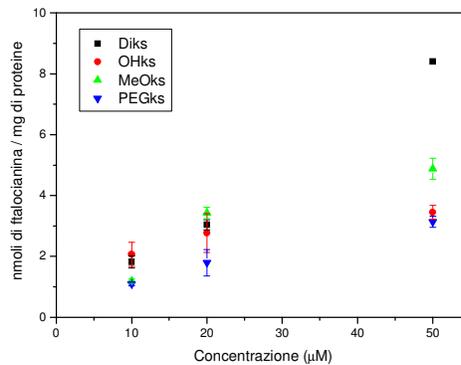


Figura 6 Accumulo di ftalocianine da parte di cellule B16F1 in funzione della concentrazione.

3.4.b. Fotosensibilizzazione di cellule tumorali

Dagli studi di fotosensibilizzazione di cellule tumorali è apparso subito evidente come il grado di foto inattivazione indotto da ZnB₄Pc dipendesse sia dal tempo di incubazione che dal tempo di irradiazione. E' possibile osservare in **Figura 7** che all'aumentare di entrambi i parametri la sopravvivenza cellulare diminuisce e risulta quasi nulla (< 5 %) già dopo 1 h di incubazione e 15 min di irradiazione con luce di 600-700 nm ad una velocità di fluensa di 50 mW/cm².

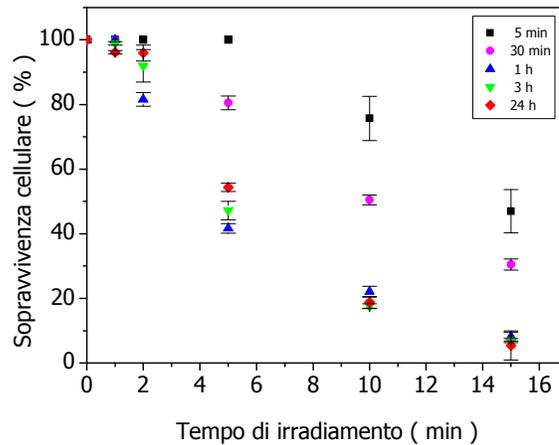


Figura 7 Effetto del tempo di irradiazione sulla sopravvivenza di cellule B16F1 incubate per tempi diversi con ZnB₄Pc 7 μM e irradiate con luce di 600-700 nm a 50 mW/cm².

Le cellule B16F1 incubate con SiB₂Pc 7 μM e irradiate nelle stesse condizioni sperimentali precedentemente utilizzate per ZnB₄Pc (600-700 nm, 50 mW/cm²), hanno dimostrato una maggiore sensibilità al foto-trattamento. Infatti, com'è possibile vedere in **Figura 8a**, dopo 24 h di incubazione con SiB₂Pc e 2 min di irradiazione la sopravvivenza cellulare è quasi nulla, mentre alle stesse condizioni le cellule trattate con ZnB₄Pc mostrano una sopravvivenza molto prossima al 100%.

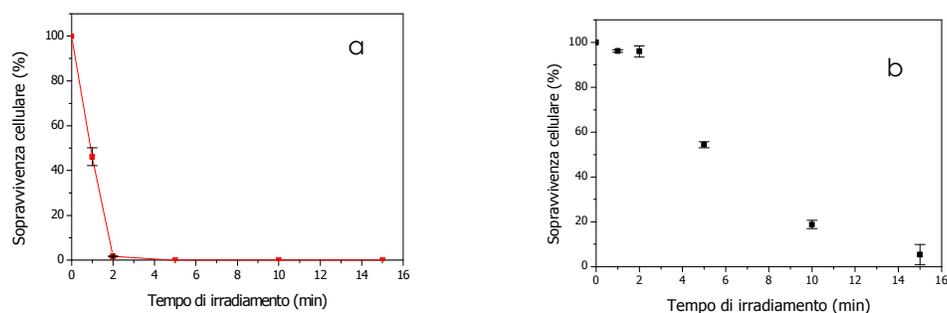


Figura 8 Effetto del tempo di irradiazione sulla sopravvivenza di cellule B16F1 incubate

a) con SiB_2Pc $7 \mu\text{M}$;

b) con ZnB_4Pc $7 \mu\text{M}$

e irradiate con luce di 600-700 nm a $50 \text{ mW}/\text{cm}^2$.

In **Tabella 2** sono stati schematizzati alcuni risultati ottenuti dagli studi di foto-sensibilizzazione delle cellule da parte delle ftalocianine MeOks, OHks, PEGks e Diks. La loro capacità di sensibilizzare le cellule è molto diversa pur mantenendo le stesse condizioni di irradiazione. Poiché l'anello centrale è uguale per tutte le molecole è probabile che la causa di tale variabilità sia dovuta ai sostituenti periferici che le caratterizzano. La più efficace risulta essere OHks che già ad una concentrazione $10 \mu\text{M}$ e 5 min di irradiazione con luce rossa ad una velocità di fluensa di $20 \text{ mW}/\text{cm}^2$ provoca la morte del 50 % delle cellule trattate. La meno efficiente invece risulta essere PEGks non ha nessun effetto sulle cellule trattate alle stesse condizioni.

Ftalocianina	T_{50} ($10 \mu\text{M}$)	T_{50} ($20 \mu\text{M}$)
MeOks	15 min	3 min
OHks	5 min	3 min
PEGks	-	-
Diks	-	15 min

Tabella 2 Tempo di irradiazione (T_{50}) necessario per ridurre del 50% la sopravvivenza di cellule B16F1 trattate con due diverse dosi di ftalocianine boronate.

3.4.c. Proprietà farmacocinetiche

Topi C57BL/6 portatori del melanoma melanotico sottocutaneo sono stati iniettati con 3 mg/kg di ZnB₄Pc incorporata in DOPC o con 0.45 mg/kg di SiB₂Pc incorporata in DPPC. A diversi tempi compresi tra 3 h e una settimana, gli animali sono stati sacrificati e diversi organi sono stati prelevati e preparati per le analisi spettrofotofluorimetriche. I dati ottenuti con ZnB₄Pc sono graficati in **Figura 9** e il più importante risulta essere il recupero di ftalocianina dal tumore rispetto alla cute peritumorale (4:1). La selettività di accumulo nel tumore rispetto ai tessuti sani circostanti è una caratteristica indispensabile per garantire un effetto localizzato sia della PDT e che della BNCT. Un altro dato rilevante è il fatto che l'organo che in assoluto accumula maggiormente la ftalocianina è il fegato (23 nmoli per g di tessuto). Tale risultato concorda con il fatto che generalmente le ftalocianine, analogamente ad altri composti con caratteristiche idrofobiche, vengono eliminate dall'organismo attraverso la via epato-biliare. Dopo circa una settimana la ftalocianina viene quasi completamente eliminata dal fegato, mentre nel siero già dopo 24 h è presente solo in tracce.

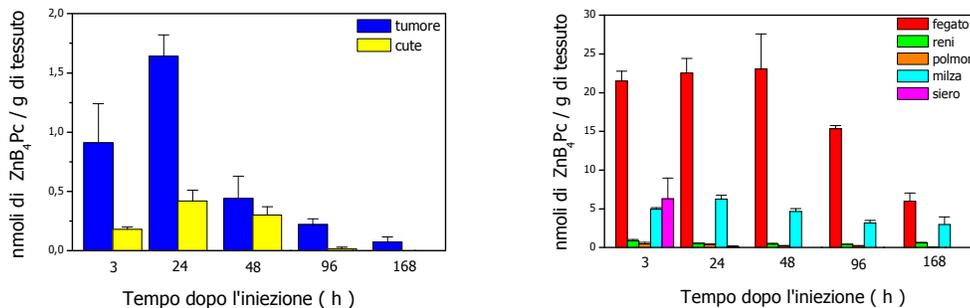


Figura 9 Recupero della ftalocianina a diversi tempi dopo l'iniezione per via i.v. di 3 mg/kg di ZnB₄Pc incorporata in liposomi DOPC da organi di topi C57BL/6 portatori del melanoma melanotico B16F1.

In **Figura 10** sono graficati i valori di recupero della ftalocianina SiB₂Pc ottenuti analizzando gli stessi organi del caso precedente. Anche

in questo caso è apprezzabile una certa selettività di accumulo nel tessuto tumorale rispetto alla cute peritumorale (a 48 h dopo l'iniezione 4:1), mentre gli organi che accumulano maggiormente il sensibilizzatore risultano essere ancora una volta fegato e milza. La diversa distribuzione all'interno dell'organismo e il fatto che permanga nei tessuti sani anche dopo una settimana dall'iniezione potrebbe dipendere dal tipo di liposomi in cui la ftalocianina deve essere incorporata (DPPC).

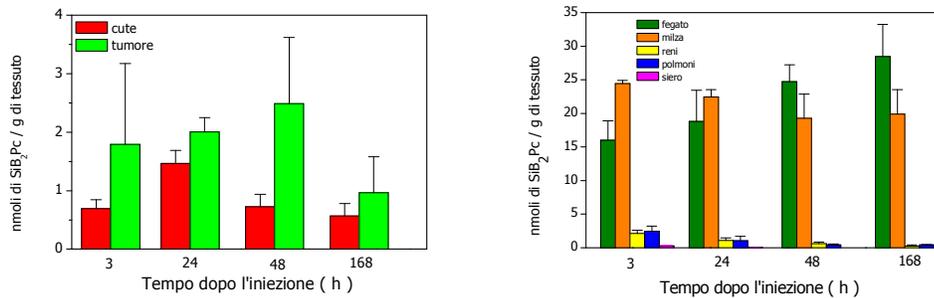


Figura 10 Recupero della ftalocianina a diversi tempi dopo l'iniezione per via i.v. di 0.45 mg/kg di SiB₂Pc incorporata in liposomi DPPC da organi di topi C57BL/6 portatori del melanoma melanotico B16F1.

3.4.d. Studi di PDT

Gli esperimenti di PDT sono stati eseguiti *in vivo* sia con ZnB₄Pc che con SiB₂Pc. Gli animali dopo una settimana dall'inoculo di cellule di melanoma melanotico sono stati iniettati i.v. con 6 mg/kg di ZnB₄Pc incorporata in DOPC o con 0.45 mg/kg di SiB₂Pc incorporata in DPPC. In entrambi i casi gli esperimenti hanno dimostrato che l'irradiamento effettuato a 24 e 48 h dopo l'iniezione i.v. non provoca nessuna variazione nella velocità della crescita tumorale rispetto a quella degli animali di controllo, come si può vedere in **Figura 11**. L'irradiamento fatto dopo 3 h dall'iniezione provoca invece un evidente ritardo nella crescita tumorale com'è ben evidenziato nel grafico di **Figura 12**. Questa risposta al foto trattamento può essere imputata al fatto che a 3 h dopo l'iniezione la ftalocianina si trova in quantità elevate nel siero

(Figura 9 e 10) e questo può provocare una risposta di tipo vascolare con conseguente blocco del rifornimento di ossigeno alle cellule neoplastiche. L'ipotesi è anche avvalorata dal fatto che la parte periferica del tumore è molto irrorata dai vasi sanguigni e questo permette alla ftalocianina di entrare più facilmente in contatto con i diversi distretti del tessuto tumorale.

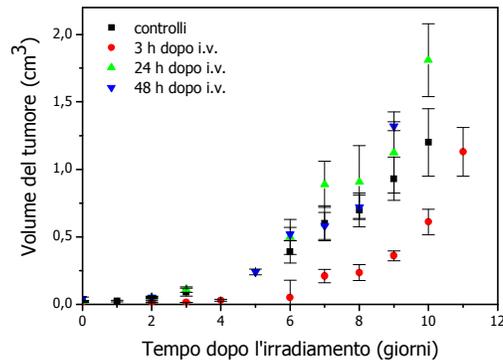


Figura 11 Velocità di crescita del melanoma melanotico B16F1 in topi iniettati con ZnB_4Pc 6 mg/kg incorporata in liposomi DOPC e irradiati (600-700 nm, 200 mW/cm², 250 J/cm²) 3 h (●), 24 h (▲) e 48 h (▼) dopo l'iniezione. Paragone con la crescita tumorale in topi di controllo non trattati e non irradiati (■).

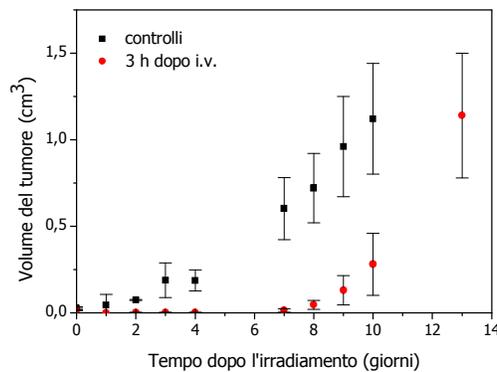


Figura 12 Velocità di crescita del melanoma melanotico B16F1 in topi iniettati con 0.45 mg/kg SiB_2Pc incorporata in liposomi DPPC e irradiati dopo 3 h (●) (600-700 nm, 150 mW/cm², 200 J/cm²). Paragone con la crescita tumorale in topi di controllo non trattati e non irradiati (■).

In ogni caso, appare evidente come, anche in vivo, la ftalocianina coordinata con lo ione Si mostri una attività fototerapeutica nettamente superiore a quella della Zn-ftalocianina.

3.4.e. Studio di BNCT

Gli animali dopo una settimana dall'inoculo delle cellule tumorali venivano trasportati presso il reattore Tapiro e iniettati con 6 mg/kg di ZnB_4Pc incorporata in liposomi DOPC. Dopo 24 h dall'iniezione i topi venivano irradiati per 20 o 30 min con neutroni termici. Alcuni animali invece non venivano iniettati, ma solo irradiati in modo da essere certi che le radiazioni non avessero effetto sulla crescita tumorale indipendentemente dalla presenza del boro nel tumore. In **Figura 13** è possibile osservare come la crescita dei tumori dei topi solo irradiati segua quella degli animali di controllo, mentre in quelli precedentemente trattati con ZnB_4Pc subisce un leggero rallentamento per entrambi i tempi di irradiazione.

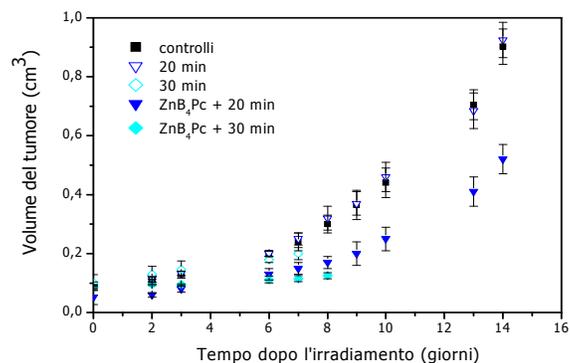


Figura 13 Velocità di crescita del melanoma melanotico B16F1 in topi solo irradiati con neutroni termici per 20 (∇) e 30 min (\diamond) e irradiati 24 h dopo l'iniezione di 6 mg/kg di ZnB_4Pc incorporata in liposomi DOPC (\blacktriangledown , \blacklozenge). Paragone con la crescita tumorale in topi di controllo non trattati e non irradiati (\blacksquare).

Dal grafico della **Figura 13** si osserva anche che i topi irradiati per 30 min muoiono ad una distanza di 8 giorni dal trattamento radiante. Allo

stato attuale delle nostre ricerche, è possibile ipotizzare che la morte di questi animali sia dovuta ad un'eccessiva contaminazione della sorgente neutronica da raggi γ che non vengono molto tollerati dagli organismi a differenza dei neutroni termici che sono invece intrinsecamente innocui. In collaborazione con l'INFN di Legnaro sono state quindi apportate alcune modifiche al reattore nucleare Tapiro inserendo la colonna termica HYTOR, monitorata da micro dosimetri appositamente studiati in modo da avere una valutazione sulla dose di neutroni termici, veloci e raggi γ ai quali gli animali vengono sottoposti durante gli irradiamenti. Quindi sono stati fatti anche numerosi esperimenti per valutare le condizioni migliori per trattare cellule e animali senza effetti dovuti alle radiazioni.

3.5 Porfirine

3.5.a. Accumulo in cellule tumorali

Gli esperimenti di accumulo da parte di cellule di melanoma melanotico eseguiti con la porfirina H_2TCP , sono stati svolti in funzione sia della concentrazione della porfirina che del tempo di incubazione. Nel primo caso, rappresentato in **Figura 14a**, le cellule sono state incubate per 24 h con concentrazioni crescenti di H_2TCP (da 1 a 100 μM) sciolta prima nel suo solvente (metanolo) e poi diluita nel mezzo di incubazione delle cellule (DMEM + 10% FBS). Nel secondo caso, rappresentato in **Figura 14b**, le cellule sono state incubate con H_2TCP 20 μM , per tempi compresi tra 1 e 24 h. Per entrambi gli esperimenti l'accumulo dell'agente sensibilizzante da parte delle cellule non raggiunga un valore di plateau, indicando che il processo di accumulo non viene saturato.

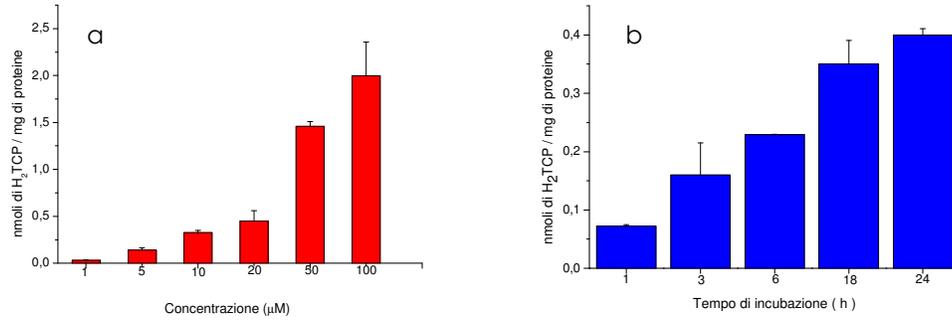


Figura 14 Effetto della concentrazione di H₂TCP (a) e del tempo di incubazione (b) sull'accumulo della porfirina da parte delle cellule B16F1.

Alcune osservazioni al microscopio a fluorescenza hanno mostrato come la fluorescenza tipica di cellule incubate con H₂TCP (10 µM per 24 h) sia molto simile a quella ottenuta osservando cellule caricate con la sonda endosomiale Lucifer Yellow. Dalle immagini in **Figura 15** è evidente che la porfirina si localizza a livello endosomiale in particolare nei prolungamenti cellulari.

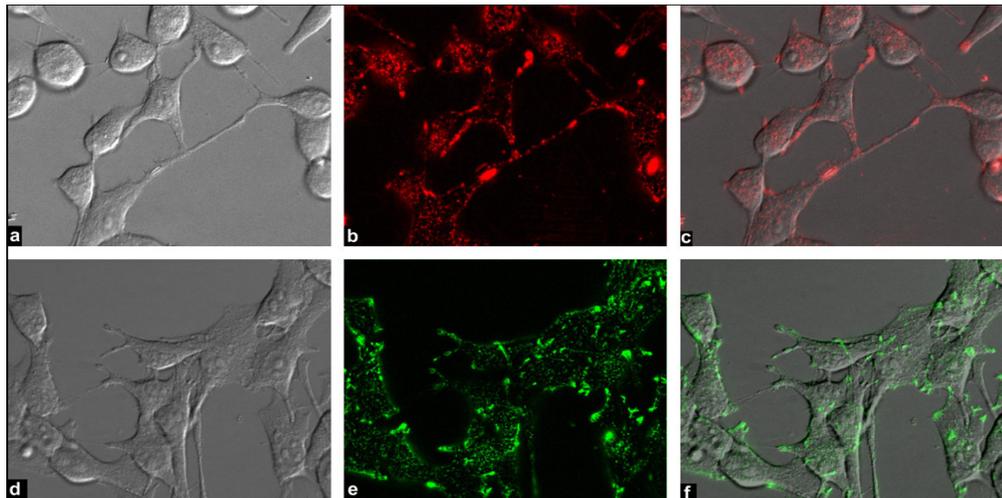


Figura 15 Immagini ottenute al microscopio a fluorescenza di cellule B16F1 dopo 24 h di incubazione con H₂TCP 20 µM (b, c) e dopo incubazione con la sonda endosomiale Lucifer Yellow (e, f). Rispettive immagini in campo chiaro (a, d).

3.5.b. Fotosensibilizzazione di cellule tumorali

Le cellule B16F1, dopo essere state incubate con H₂TCP 10 e 20 µM per 24 h, sono state irradiate per diversi tempi con luce di 600-700 nm ad una velocità di fluena di 20 mW/cm². Nelle condizioni sperimentali utilizzate la curva che descrive la diminuzione della sopravvivenza cellulare è caratterizzata da un andamento molto simile per le due concentrazioni (**Figura 16**), evidenziando una buona capacità fotosensibilizzante della porfirina. Infatti dopo 10 min di irradiazione, la mortalità delle cellule incubate con H₂TCP 10 µM è pressoché completa.

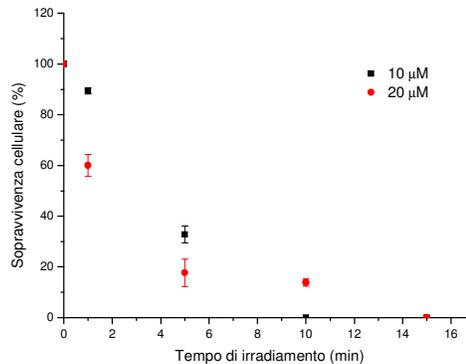


Figura 16 Effetto del tempo di irradiazione (600-700 nm, 20 mW/cm²) nella sopravvivenza di cellule B16F1 incubate per 24 h con H₂TCP 10 e 20 µM in DMEM.

3.5.c. Radiosensibilizzazione di cellule tumorali

Come è possibile dedurre dagli istogrammi mostrati in **Figura 17**, le cellule di melanoma melanotico non mostrano un apprezzabile calo di sopravvivenza anche dopo esposizione per 30 min. a neutroni termici, se l'irradiazione è eseguito in assenza di agente radiosensibilizzante. D'altra parte, se l'irradiazione neutronica è effettuato su cellule che hanno accumulato la porfirina marcata con ¹⁰B si nota una progressiva diminuzione della sopravvivenza a partire da 10 min. (ca. 22%) sino a 30 min. (ca. 50%). E' quindi possibile dedurre come la quantità di boro trasportata all'interno della cellula tumorale da parte della porfirina sia

sufficiente per indurre una buona risposta all'azione dei neutroni termici.

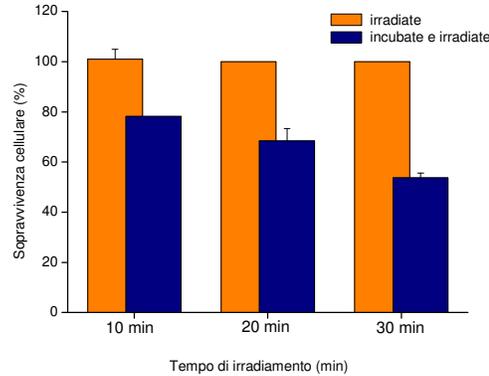


Figura 17 Effetto del tempo di irradiazione sulla sopravvivenza di cellule B16F1 irradiate per diversi periodi di tempo con neutroni termici (2 kW) in assenza di radiosensibilizzatore o dopo incubazione per 1 h con $^{10}\text{B-H}_2\text{TCP}$ alla concentrazione di $10\ \mu\text{M}$.

3.5.c. Proprietà farmacocinetiche

La distribuzione della porfirina, iniettata per via i.v., nei tessuti di topi portatori di melanoma melanotico è stata studiata utilizzando tre veicolanti diversi. I risultati più soddisfacenti si sono ottenuti sciogliendo H_2TCP in metanolo e poi aggiungendola ad una miscela formata da 20 % DMSO, 30 % PEG400 e 49 % H_2O . La percentuale di metanolo presente nella soluzione non può essere maggiore di 1 in quanto i topi da noi usati come modello risultano sensibili a concentrazioni di metanolo più elevate.

In **Figura 18** sono riassunti alcuni dati ottenuti analizzando i tessuti prelevati da topi a tempi compresi tra 3 e 72 h dall'iniezione di 10 mg/kg di H_2TCP . È possibile osservare in **Figura 18a** la buona selettività dimostrata dalla porfirina per il tessuto tumorale rispetto alla cute peritumorale (circa 3:1), mentre in **Figura 18b** si evidenzia che, come per le ftalocianine, il fegato sia l'organo che accumula maggiormente la porfirina, analogamente a quanto osservato per la grande maggioranza dei derivati tetrapirrolici. Infine, dalla **Figura 18c**

in cui è rappresentato il contenuto di H₂TCP nel siero, è chiaro che la cinetica di eliminazione della sostanza dal sangue è piuttosto veloce.

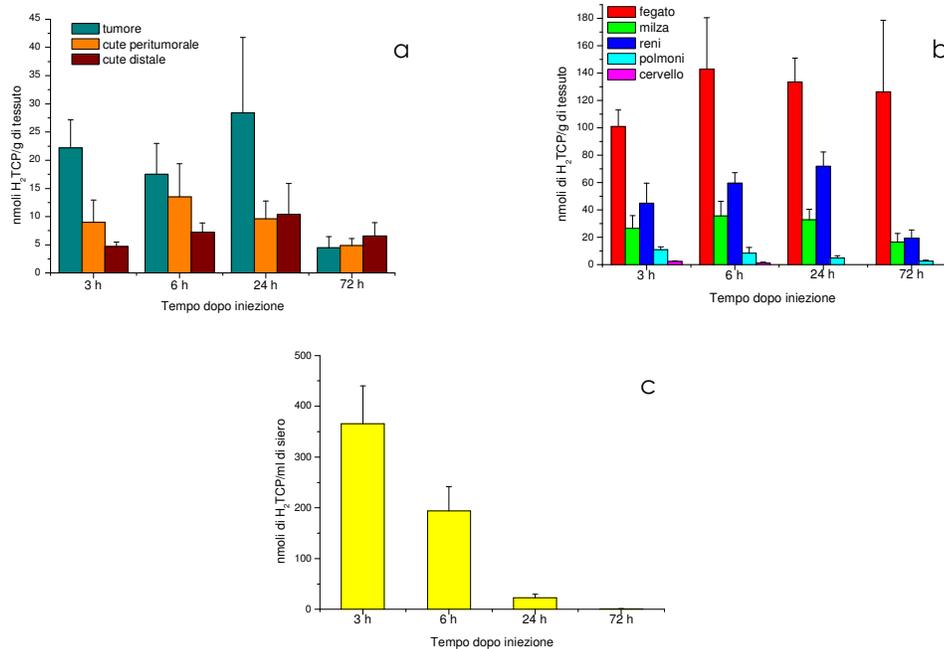


Figura 18 Recupero della porfirina a diversi tempi dopo l'iniezione i.v. di 10 mg/kg di H₂TCP sciolta in una soluzione costituita da PEG400, H₂O, DMSO e l'1% di metanolo, da organi di topi C57BL/6 portatori del melanoma melanotico B16F1.

Gli studi di farmacocinetica con H₂TCP sono stati effettuati anche utilizzando una diversa modalità di somministrazione. E' possibile infatti iniettare la sostanza direttamente nel tumore (via intratumorale, i.t.) in modo da ottenere il massimo recupero della porfirina nella regione neoplastica senza avere livelli molto elevati di sensibilizzatore negli altri organi e nel sangue. In **Figura 19** si vede come la tendenza dell'accumulo sia nei tessuti sani che nel tumore sia invertito rispetto a quello che si osserva dopo le iniezioni i.v.. In **Figura 19a** si evidenzia l'elevato recupero di H₂TCP (200 nmoli per g di tessuto dopo 30 min) dal tumore a tempi brevi dopo l'iniezione i.t. di 20 µl di soluzione (1 mg/kg di porfirina), mentre in **Figura 19b** e **c** si osserva che negli organi e nel siero analizzati il recupero aumenta all'aumentare del tempo anche se i valori risultano sempre molto bassi (1 nmoli per g di milza e 1,4 nmoli per ml di siero dopo 24 h).

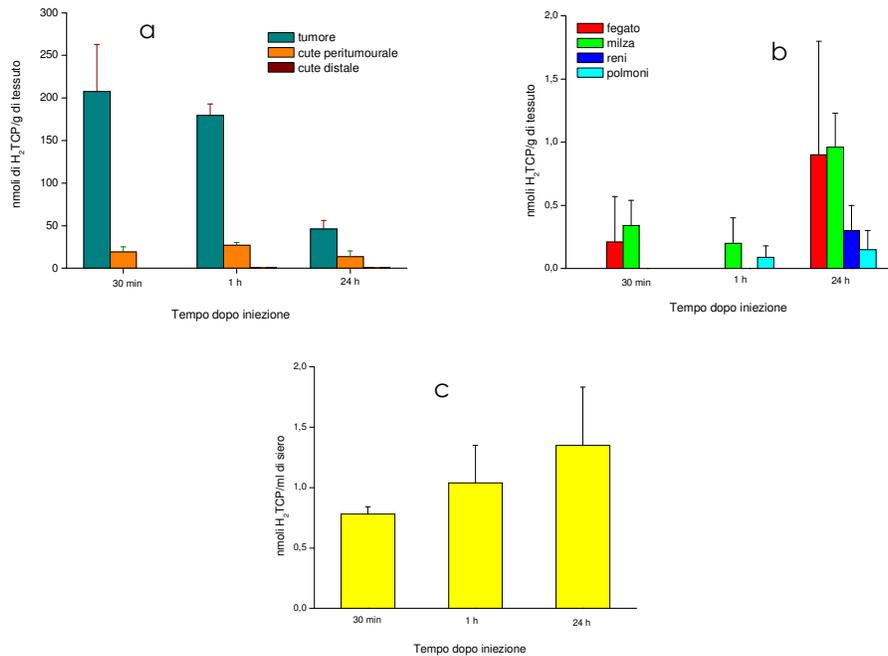


Figura 19 Recupero della porfirina a diversi tempi dopo l'iniezione i.t. di H₂TCP 1 mg/kg sciolta in una soluzione costituita da PEG400, H₂O, DMSO e l'1% di metanolo, da organi di topi C57BL/6 portatori del melanoma melanotico B16F1.

Le immagini di campioni di tessuto tumorale ottenute dopo analisi al microscopio di fluorescenza rivelano come la distribuzione della H₂TCP sia caratterizzata da una notevole preferenzialità per la lesione neoplastica rispetto ai tessuti sani peritumorali. Se questa conclusione è relativamente ovvia nel caso della somministrazione per via intratumorale, il risultato è particolarmente importante per quanto riguarda la biodistribuzione della porfirina borata osservata a 24 h dopo la sua somministrazione per via endovenosa. In generale, la distribuzione sottessutale della porfirina appare di tipo discontinuo, il che potrebbe suggerire (per analogia a quanto osservato in precedenza con porfirine di struttura chimica diversa) che la H₂TCP si lega prevalentemente a livello delle membrane subcellulari, senza arrestarsi a livello della membrana citoplasmatica.

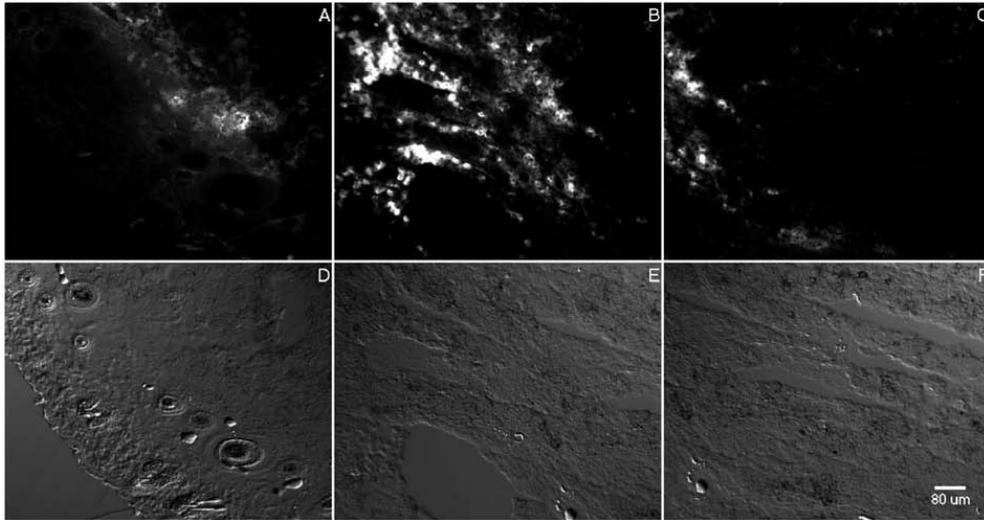


Figura 20.a Micrografie di cellule B16F1 e della corrispondente cute sovratumorale ottenute su campioni prelevati da topi a 30 min. dopo l'iniezione della H₂TCP (1 mg/kg) per via intratumorale.

A: un debole segnale di fluorescenza è visibile in corrispondenza delle cellule neoplastiche immediatamente sottostanti l'epidermide.

B: la fluorescenza risulta essere intensa solo a livello di aree definite del tumore, mentre non si osserva un segnale di fluorescenza per i distretti cutanei peritumorali. (C).

D, E ed F: immagini corrispondenti in campo chiaro

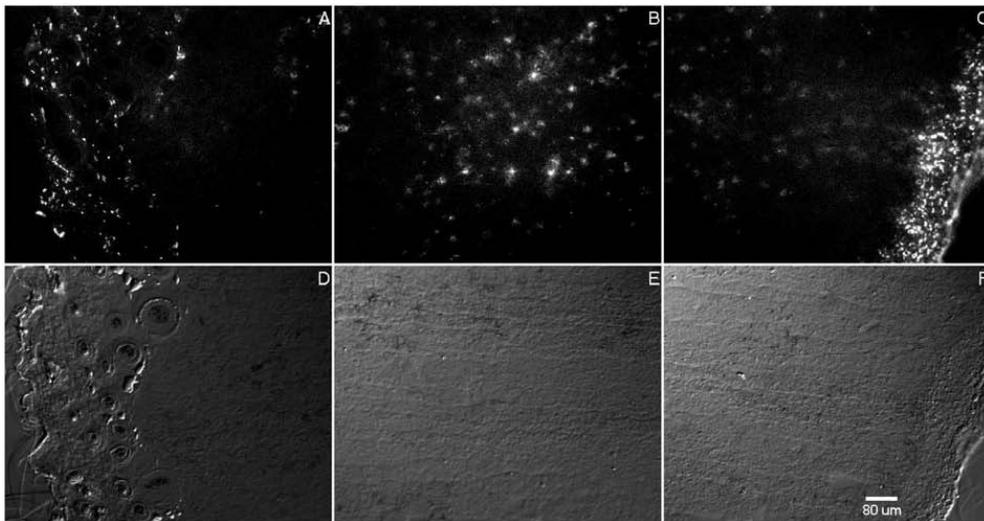


Figura 20.b Micrografie di cellule B16F1 e della corrispondente cute sovratumorale ottenute su campioni prelevati da topi a 24 h. dopo l'iniezione della H₂TCP (10 mg/kg) per via endovenosa.

A: segnale puntiforme di fluorescenza negli strati epidermici della cute.

B: la fluorescenza della porfirina è distribuita in modo chiaramente rilevabile in nella grande maggioranza della cellule tumorali.

C: la capsula del connettivo che circonda il nucleo della lesione neoplastica appare particolarmente dotata di emissione di fluorescenza

D, E e F: immagini in campo chiaro delle corrispondenti micrografie.

3.5.d. Studi di PDT

Per gli studi di PDT i topi portatori del melanoma melanotico sono stati iniettati i.v. con 10 mg/kg di una soluzione di H₂TCP (1% metanolo, DMSO, PEG400 e H₂O). Dopo 3 e 24 h gli animali sono stati irradiati con luce compresa tra 600 e 700 nm ad una velocità di fluena di 150 mW/cm². Purtroppo a queste condizioni, com'è possibile vedere in **Figura 21**, la porfirina sembra non avere effetto sulla crescita tumorale infatti i tumori degli animali trattati crescono alla stessa velocità di quelli di controllo o di quelli solo irradiati.

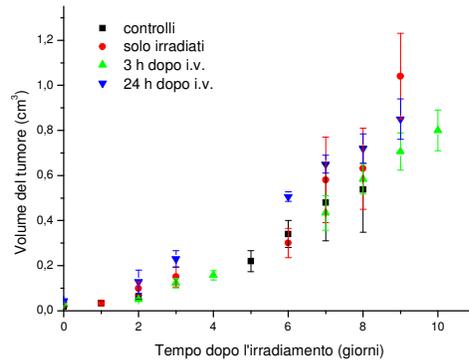


Figura 21 Velocità di crescita del melanoma melanotico B16F1 in topi iniettati con 10 mg/kg di H₂TCP sciolta nella soluzione costituita da PEG400, H₂O, DMSO e l'1% di metanolo e irradiati (600-700 nm, 150 mW/cm², 80 J/cm²) dopo 3 h (▲) e 24 h (▼). Paragone con la crescita tumorale in topi di controllo non trattati e non irradiati (■) e solo irradiati (●).

Nel tentativo di migliorare la foto-risposta del tumore alla PDT con porfirina sono stati effettuati alcuni esperimenti iniettando 20 µl di soluzione (1 mg/kg di H₂TCP) direttamente nel tumore in modo da avere una dose maggiore di sensibilizzatore. Purtroppo anche in queste condizioni non si sono ottenuti risultati positivi.

3.5.e. Studi di BNCT

Gli irradimenti con neutroni termici sono stati effettuati su topi portatori di melanoma melanotico dopo iniezione i.v. e i.t. di H₂TCP. Le modalità utilizzate per l'iniezione sono state le stesse descritte nel caso degli esperimenti di PDT. I topi sono stati irradiati per 10 e 20 min con la colonna termica HYTOR inserita nel reattore Tapiro. Il grafico della **Figura 22** mostra come la crescita tumorale subisca un leggero ritardo nei topi irradiati per 20 min sia nel caso in cui la porfirina sia stata iniettata per via endovenosa che intratumorale. La crescita dei tumori di topi irradiati per 10 min in entrambi i casi risulta molto simile a quella di topi solo irradiati.

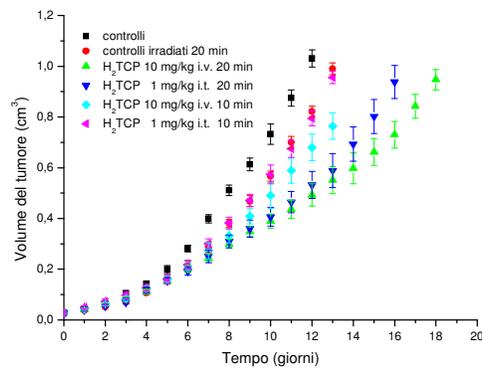


Figura 22 Velocità di crescita del melanoma melanotico B16F1 in topi solo irradiati con neutroni termici per 20 (●) e irradiati 24 h dopo l'iniezione i.v. di 10 mg/kg (▲◆) e i.t. di 1 mg/kg (▼◆) di H₂TCP sciolta nella soluzione costituita da PEG400, H₂O, DMSO e l'1% di metanolo. Paragone con la crescita tumorale in topi di controllo non trattati e non irradiati (■).

3.6 Clorine

3.6.a. Accumulo in cellule tumorali

Le cellule B16F1 sono state incubate con la clorina TPFC inizialmente sciolta in DMSO e poi diluita nel mezzo cellulare (DMEM + 10 % FBS). In **Figura 23** sono rappresentati due grafici in cui è possibile vedere i risultati di esperimenti di accumulo fatti in funzione della concentrazione della porfirina (**a**) e in funzione del tempo di incubazione (**b**). Nel primo caso la TPFC è stata somministrata alle cellule variando la concentrazione da 1 a 20 μM e dopo 24 h l'andamento dell'accumulo aumenta proporzionalmente all'aumentare della concentrazione. Nel secondo caso le cellule sono state incubate con TPCF 20 μM per tempi variabili tra 1 e 24 h e si può vedere che subito dopo 1 h la sostanza accumulata nelle cellule è già 0.8 nmoli per mg di proteine non molto inferiore a quella accumulata dopo 24 h.

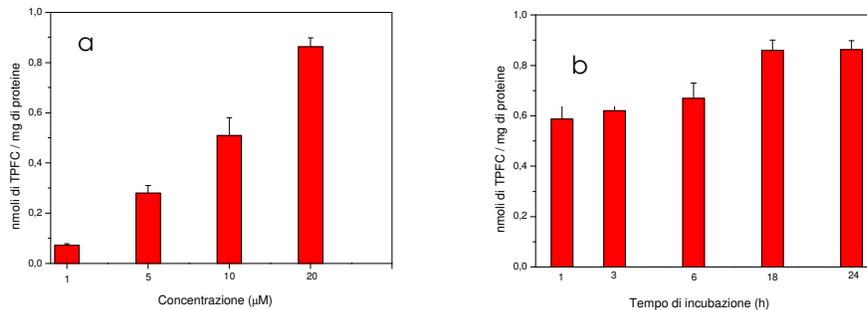


Figura 23 Effetto della concentrazione (a) e del tempo di incubazione (b) nell'accumulo in cellule B16F1 di TPCF in DMEM contenente 0.3% di DMSO.

Le osservazioni effettuate al microscopio a fluorescenza (**Figura 24**) dopo 24 h di incubazione con TPFC 20 μM hanno mostrato che la clorina si localizza preferenzialmente sulla membrana plasmatica la quale risulta il bersaglio della terapia fotodinamica.

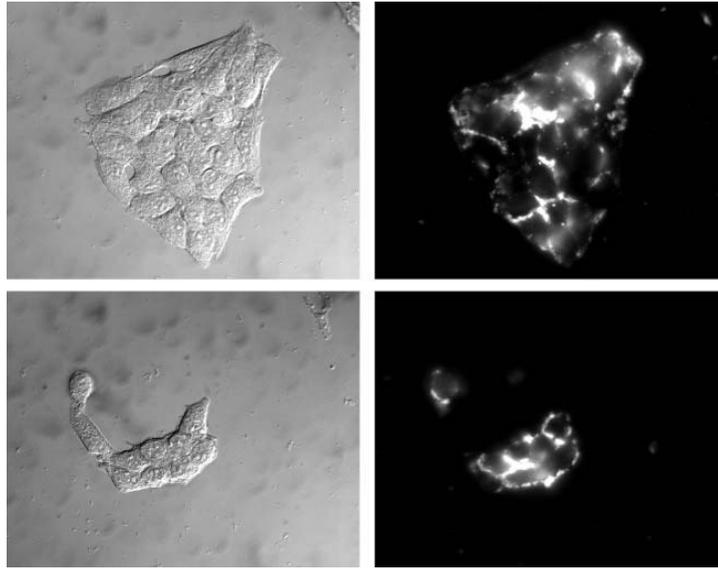


Figura 24 Micrografie a fluorescenza di cellule B16F1 dopo 24 h di incubazione con TPFC 20 μM in DMEM con 10 % FBS e 0.5 % DMSO (destra) e corrispondenti immagini in campo chiaro (sinistra). Le cellule sono state seminate 48 h prima di essere incubate con la clorina.

3.6.b. Fotosensibilizzazione di cellule tumorali

Le prove di fotosensibilizzazione sono state effettuate su cellule B16F1 incubate per tempi diversi con soluzioni di TPFC 10 e 20 μM . In **Figura 25** sono riassunti alcuni dati in cui si può vedere come la sopravvivenza di cellule irradiate per tempi diversi (600-700 nm, 20 mW/cm^2) all'aumentare sia della concentrazione che del tempo di incubazione diminuisca fino ad ottenere una mortalità quasi completa per 5 min di irradiazione dopo 24 h di incubazione con la clorina 20 μM e per 10 min di irradiazione dopo 24 h di incubazione con la clorina 10 μM .

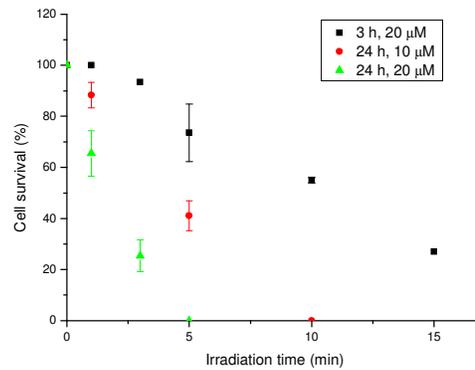


Figura 25 Effetto del tempo di irradiazione (600-700 nm, 20 mW/cm²) sulla sopravvivenza di cellule B16F1 incubate per 3 e 24 h con diverse concentrazioni di TPFC.

3.6.c. Proprietà farmacocinetiche

Per gli esperimenti di farmacocinetica in topi portatori del melanoma melanotico sono stati iniettati 10 mg/kg di TPFC sciolta in una miscela ternaria costituita da 20 % di DMSO, 30 % di PEG400 e 50 % di H₂O. A tempi compresi tra 3 h e una settimana sono stati prelevati il tumore, il siero e vari organi, come dettagliato nei paragrafi precedenti, ed in particolare la cute. La **Figura 26a** mostra come a tempi brevi dopo la somministrazione della clorina la selettività dell'agente sensibilizzante per il tessuto tumorale sia particolarmente marcata: nei tumori prelevati dopo 3 h il recupero è circa 2,5 volte maggiore rispetto a quello ottenuto dalla cute peritumorale e 10 volte rispetto a quello tipico della cute distale. Come si può vedere in **Figura 26b**, l'organo che accumula preferenzialmente TPFC è il fegato e questo suggerisce che TPFC venga preferenzialmente eliminata per via epato-biliare, ma a differenza di ftalocianine e porfirine vengono interessati anche i reni e quindi si può pensare che in parte la clorina venga eliminata anche attraverso le urine. Dopo una settimana dalla somministrazione i valori di recupero della clorina dai vari organi diminuiscono anche se non viene completamente eliminata. L'eliminazione completa avviene invece dal siero che già dopo 18 h ne contiene solo tracce.

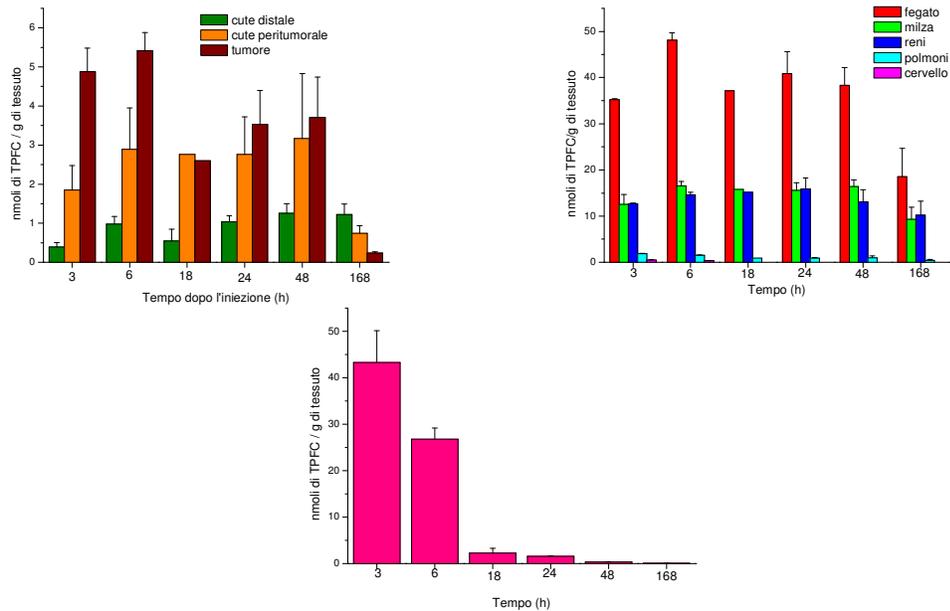


Figura 26 Recupero della clorina a diversi tempi dopo l'iniezione i.v. di TPFC 10 mg/kg sciolta in una soluzione costituita da PEG400, H₂O, DMSO, da organi di topi C57BL/6 portatori del melanoma melanotico B16F1.

3.6.d. Studi di PDT

Le proprietà foto-sensibilizzanti della clorina sono state studiate *in vivo* su topi portatori di melanoma melanotico irradiati con luce di 600-700 nm ad una velocità di fluensa di 150 mW/cm² (81 J/cm²) dopo iniezione i.v. di 10 mg/kg di TPCF. In **Figura 27** è graficata la crescita tumorale dei topi trattati dopo 3 e 24 h dall'iniezione del fotosensibilizzatore. In entrambi i casi si può vedere un significativo rallentamento della crescita tumorale rispetto a quella tipica dei topi di controllo e di quelli solo irradiati. In particolare, negli animali irradiati dopo 3 h dall'iniezione, è stato possibile iniziare a valutare la crescita del tumore solo dopo 5 giorni dal momento dell'irradiamento.

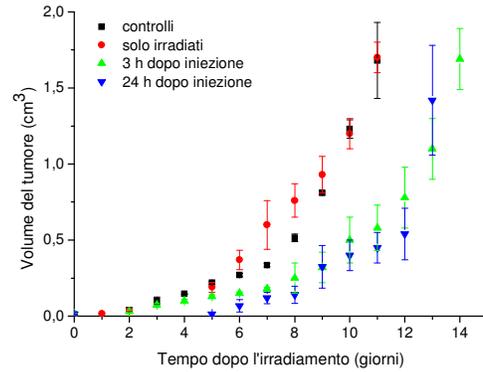


Figura 27 Velocità di crescita del melanoma melanotico B16F1 in topi iniettati con 10 mg/kg di TPCF sciolta nella miscela ternaria costituita da PEG400, H₂O, DMSO e irradiati (600-700 nm, 150 mW/cm², 81 J/cm²) dopo 3 h (▲) e 24 h (▼). Paragone con la crescita tumorale in topi di controllo non trattati e non irradiati (■) e solo irradiati (●).

4. Discussione

Sia la terapia fotodinamica che la terapia per cattura neutronica del boro, come illustrato nella parte introduttiva di questa tesi, sono utilizzate a livello clinico per il trattamento di diversi tipi di tumori solidi. Alcune migliaia di pazienti, a livello mondiale, sono stati sinora trattati con l'una o l'altra delle due modalità terapeutiche, a fini curativi oppure palliativi, con risultati obiettivamente positivi. Tuttavia, entrambe le tecniche presentano alcune limitazioni nella loro efficacia, ad esempio nel caso di tumori, come il melanoma melanotico, ove l'elevata pigmentazione di tipo melaninico previene la possibilità di una significativa penetrazione della luce visibile, compresa la luce rossa, negli strati più profondi del tessuto neoplastico. E' quindi comprensibile come numerose linee di ricerca siano finalizzate alla messa a punto di strategie operative che consentano di superare almeno in parte le attuali limitazioni.

A tale fine, sin da tempo, è stato proposto di combinare le due modalità terapeutiche (PDT e BNCT), in quanto agiscono con due meccanismi profondamente diversi, sia dal punto di vista degli intermedi citotossici attivi nelle due procedure (l'ossigeno di singoletto nel caso della PDT, le particelle α e gli ioni ${}^7\text{Li}$ nel caso della BNCT), che dal punto di vista del sito di azione (le membrane cellulari per la PDT, il nucleo per la BNCT). In tal modo, esistono le premesse più opportune per ottenere un'azione sinergica o, comunque, additiva tra le due terapie. In questa ottica, la possibilità di utilizzare un unico agente chimico, che possa operare sia da foto- che da radio-sensibilizzante, aprirebbe prospettive estremamente interessanti e favorevoli, considerando (a) il costo e la tempistica necessari per portare un farmaco di nuova concezione alla sperimentazione clinica; e (b) la difficoltà di far coincidere il comportamento farmacocinetico e controllare la biodistribuzione di sostanze con caratteristiche chimico-fisiche differenti. Certamente, la possibilità di legare atomi di boro a

composti, come le porfirine (Gottumukkala, 2005) o loro analoghi strutturali (Luguya, 2004), che già sono noti per esprimere una elevata affinità per un vasto numero di tumori solidi (Gottumukkala, 2005) rientra pienamente in questo obiettivo. Tuttavia, è evidente come la proposizione di boro-porfirine come sensibilizzatori per una terapia combinata BNCT + PDT richieda la definizione di alcune condizioni preliminari, come:

- l'accertamento che la presenza di un numero presumibilmente elevato di atomi di boro legati al macrociclo tetrapirrolico non alteri in misura marcata le proprietà fotofisiche, e quindi l'efficacia fotosensibilizzatrice e fototerapeutica delle porfirine.
- la stabilità del legame covalente tra atomi di boro e porfirina nelle condizioni sperimentali, che si incontrano dopo la loro somministrazione in vivo per via sistemica.
- l'eventuale effetto di voluminosi cluster di atomi di boro sulla cinetica ed efficienza di accumulo di porfirine da parte di cellule neoplastiche, come pure sull'affinità di queste molecole per tessuti tumorali *in vivo*.
- la capacità dei veicolanti di natura porfirinica di realizzare l'accumulo nel tumore di concentrazioni di boro sufficienti a garantire una buona probabilità di interazione con i neutroni termici e quindi una efficiente azione terapeutica via BNCT.

I risultati ottenuti in questa tesi consentono un avanzamento delle conoscenze in questo settore, contribuendo a chiarire almeno parzialmente i punti sopra indicati.

In primo luogo, le misure della resa quantica di produzione di ossigeno di singoletto da parte delle porfirine, clorine e ftalocianine boronate, da noi esaminate, indicano chiaramente (vedasi **Tabella 1**) come la presenza del boro non inibisca la formazione di questo derivato altamente citotossico dell'ossigeno, anche se (come del resto è già ampiamente dimostrato in letteratura) l'efficienza di fotogenerazione di ossigeno di singoletto è modulata in misura assai significativa dalla struttura chimica della porfirina stessa. In particolare, i valori di Φ_{Δ} da noi misurati oscillano tra circa 0.1 per la clorina TPFC e la ftalocianina

Diks e oltre 0.7 per la ftalocianina OHks; in generale, tuttavia, la resa quantica è almeno dell'ordine di $\Phi_{\Delta} = 0.5$, che significa come circa il 50% dei fotoni assorbiti dal fotosensibilizzatore risultino nella generazione dell'ossigeno di singoletto. Tale valore rappresenta una specie di soglia per definire un agente fotosensibilizzante come efficace.

Tuttavia, i risultati di accumulo e di fotosensibilizzazione cellulare, esaminati nel loro complesso, suggeriscono come la resa quantica di formazione di ossigeno di singoletto non costituisca l'unico parametro da prendere in considerazione per valutare l'efficienza di un fotosensibilizzatore tumorale. In effetti, se in alcuni casi (come ad esempio per la ftalocianina OHks) si può registrare una corrispondenza tra valore di Φ_{Δ} e grado di fotoinattivazione di cellule di melanoma melanotico, tale equivalenza non viene riscontrata in altre situazioni, ad esempio nel caso della clorina TPFC, che induce una estesa diminuzione della sopravvivenza cellulare pur avendo (come accennato in precedenza) una bassa Φ_{Δ} . E' probabile, pertanto, che l'efficienza complessiva delle porfirine e loro analoghi come agenti fotosensibilizzanti su cellule sia correlata con altri fattori, di natura non fotofisica, ed in modo specifico dalla natura della distribuzione subcellulare. Dato il breve tempo di vita e la elevata reattività degli intermedi generati in un processo fotodinamico, è logico ipotizzare che la localizzazione di un fotosensibilizzatore in siti che sono critici per il metabolismo e morfologia di una cellula possa esaltarne l'azione fotoinibitrice. Questa ipotesi è supportata dagli studi di distribuzione subcellulare da noi effettuati per la clorina TPFC e la porfirina H₂TCP. La clorina TPFC, nonostante sia caratterizzata dalla più bassa Φ_{Δ} mostra una capacità foto inattivante delle cellule B16F1 notevolmente superiore; infatti meno del 50% della sopravvivenza cellulare si ottiene dopo solo 5 min di irradiazione ad una velocità di fluensa di 20 mW/cm² e un'incubazione di 24 h con la clorina 10 µM). L'analisi al microscopio a fluorescenza delle cellule incubate con i due composti mostra chiaramente come la porfirina si localizzi prevalentemente negli

endosomi, in particolare in quelli presenti nei pseudopodi cellulari, e la clorina sembra legarsi maggiormente alla membrana citoplasmatica. La formazione di buchi ("gaps") nella membrana plasmatica in conseguenza di processi fotodinamici è stata dimostrata essere un evento che provoca normalmente danni non riparabili da parte della cellula (Valenzano, 1987), ed alla sua morte secondo un meccanismo di tipo necrotico a causa del simultaneo coinvolgimento di diversi bersagli (lipidi insaturi, enzimi, proteine di trasporto).

Su queste basi, è possibile interpretare l'osservazione sulla notevole influenza esercitata dalla struttura chimica del fotosensibilizzatore sull'efficienza complessiva del processo di fotoinattivazione di cellule B16F1. Infatti, i dati da noi presentati mostrano come la semplice sostituzione dello ione coordinato al centro del macrociclo tetraazaisoindolico delle ftalocianine possa avere conseguenze assai importanti: in particolare, vi è un apprezzabile incremento nella fotoattività delle ftalocianine se lo ione Zn(II) viene rimpiazzato dallo ione Si(IV). Analogamente, mentre le ftalocianine ZnB₄Pc e OHks hanno condizioni di irradiazione paragonabile per ridurre del 50% la sopravvivenza delle cellule trattate (ZnB₄Pc 7 µM e irradiazione con luce rossa a 50 mW/cm² per 5 min; OHks 10 µM e 20 mW/cm² per 5 min), altre ftalocianine (MeOks, PEGks, Diks) necessitano di condizioni di irradiazione più pesanti per raggiungere gli stessi risultati, o addirittura non mostrano nessuna fotoattività ugualmente (PEGks e Diks). Questa drastica diminuzione dell'attività fotosensibilizzante potrebbe essere imputabile al fatto che MeOks, PEGks e Diks si trovano sottoforma di sali, quindi sono caratterizzate da un più elevato grado di idrofilicità rispetto alle altre ftalocianine, e tale circostanza può conseguentemente influenzare la loro ripartizione tra i diversi compartimenti subcellulari, ad esempio minimizzando la probabilità di una loro stretta interazione con siti di membrana.

Una più completa spiegazione dei dati sperimentali ovviamente richiede un'estensione delle indagini di microscopia di fluorescenza (o attraverso la utilizzazione di altre tecniche) per correlare più

direttamente la struttura chimica del fotosensibilizzatore con la distribuzione subcellulare. In ogni caso, i risultati ottenuti nel corso di questa tesi sono incoraggianti, in quanto dimostrano che la presenza del boro non impedisce l'accumulo della porfirina, della clorina e delle ftalocianine da parte delle cellule di melanoma melanotico, e quindi conferma la possibilità di utilizzare questi derivati tetrapirrolici come veicolanti del boro in vista di una applicazione della BNCT in combinazione con la PDT.

Gli esperimenti farmacocinetici e di foto-/radio-sensibilizzazione su topi portatori di melanoma melanotico trapiantato sotto cute, confermano ulteriormente, ed in modo definitivo, queste conclusioni. Innanzitutto, tali esperimenti dimostrano come le porfirine ed analoghi boronati non risultino tossici, almeno nel nostro modello animale, una volta che sono iniettati per via endovenosa alle dosi che successivamente si sono dimostrate efficaci sotto il profilo dell'azione fototerapeutica e radioterapeutica. Inoltre, tutte le molecole che sono state testate negli animali (ZnB_4Pc , SiB_2Pc , H_2TCP e $TPFC$) hanno mostrato una discreta selettività per il tessuto tumorale rispetto ai distretti perilesionali (nel nostro caso, alla cute adiacente alla neoplasia). Tale proprietà è fondamentale per poter applicare la PDT e la BNCT con la speranza di indurre un danno il più possibile limitato ai tessuti sani pur in presenza di un esteso danneggiamento dell'area neoplastica. Un'altra caratteristica comune a tutti i composti boronati da noi selezionati per gli studi *in vivo* è rappresentata dall'organo in cui vengono maggiormente accumulati: il fegato. Questo presuppone che i vari derivati tetrapirrolici vengano eliminati dall'organismo attraverso la via epato-biliare anche se nel caso della clorina una parte abbondante viene recuperata dai reni indicando che anche la via renale è interessata. In ogni caso l'eliminazione di queste sostanze dall'organismo avviene in tempi abbastanza brevi, infatti dopo una settimana il recupero del composto boronato è molto ridotto (dimezzato o addirittura 5 volte inferiore al valore massimo di accumulo) sfavorendo un'eventuale sensibilizzazione degli organi

interessati. Un altro aspetto molto importante è la veloce clearance delle molecole dal siero infatti al massimo dopo 24 h è possibile trovarne solo tracce nel circolo sanguigno ed in questo modo è possibile garantire che non si instauri una fotosensibilizzazione sistemica. La mancata persistenza dei derivati boronati nell'organismo costituisce un elemento favorevole, soprattutto nel caso in cui la terapia debba essere ripetuta per una incompleta risposta del tumore al trattamento primario oppure per la necessità di trattare lesioni multiple e per la eventuale comparsa di recidive. Non esistono quindi problemi legati all'accumulo di quantità eccessive di agente sensibilizzante in specifici tessuti.

Ad un livello di studio più avanzato, i nostri risultati dimostrano che le concentrazioni di composto boronato trasportato nel melanoma melanotico secondo i protocolli di somministrazione da noi sviluppati sono sufficienti per indurre un sensibile ritardo nella crescita del tumore dopo trattamento sia con PDT che con BNCT. In particolare, due composti, tra quelli sinora esaminati, sembrano essere dotati di proprietà ottimali, e precisamente la ftalocianina ZnB_4Pc e la clorina TPFC. Entrambi i composti sono in grado di agire come foto- e come radio-sensibilizzanti. I risultati di ritardo nella crescita tumorale indotto dai due composti sono soprattutto significativi, in quanto ottenuti nei confronti di un modello tumorale, il melanoma melanotico B16F1, che è noto per essere scarsamente responsivo a tutte le modalità di trattamento di tipo chemioterapeutico oppure radioterapeutico attualmente utilizzate nella clinica. Tale tipo di tumore è anche di solito caratterizzato da una risposta assai debole alla PDT, in quanto la melanina, come corpo nero, assorbe efficacemente le radiazioni nella regione ultravioletta e visibile dello spettro elettromagnetico (pur se la sua azione di filtro ottico decresce in forma approssimativamente esponenziale al crescere della lunghezza d'onda) e quindi impedisce la fotoattivazione del sensibilizzatore, anche se questi è stato precedentemente localizzato nel tessuto neoplastico. Questa situazione può spiegare la scarsa efficienza della porfirina H_2TCP come agente

fototerapeutico nei topi C57BL/6 portatori di melanoma melanotico. La maggiore efficienza fototerapeutica della ftalocianina ZnB_4Pc e della clorina TPFC deriva dalla circostanza che entrambi questi derivati possiedono un coefficiente di estinzione molare nella regione rossa dello spettro superiore per almeno un ordine di grandezza a quello della porfirina, e quindi possono più efficacemente competere con il pigmento melaninico per l'assorbimento dei fotoni incidenti nel tessuto tumorale. Va anche sottolineato il fatto che entrambi i derivati boronati agiscono come efficienti fotosensibilizzanti, indizio molto forte che i legami tra atomi di boro ed anello tetrapirrolico o tetrazaisoindolico non sono scissi durante il trasporto al tumore.

Infine, è assai interessante evidenziare che l'efficienza della PDT, eseguita dopo somministrazione sia di ZnB_4Pc che di TPFC, è massima se l'irradiazione è effettuato dopo un intervallo di 3 h. Una serie di evidenze sperimentali ottenute con diverse ftalocianine o porfirine indicano che, a questo tempo post-iniezione per via endovenosa, il fotosensibilizzatore è prevalentemente localizzato nei capillari sanguigni della lesione neoplastica. E' quindi possibile dedurre che la PDT con i due derivati boronati agisce preferenzialmente a livello vascolare, bloccando il rifornimento di ossigeno alle cellule tumorali. L'azione terapeutica basata sul contrasto dell'angiogenesi del tumore sta riscuotendo un crescente interesse in una varietà di approcci attualmente in fase di studio nel campo oncologico. Nel caso specifico della nostra strategia per un'azione combinata PDT+BNCT, questa osservazione è ancora più incoraggiante, se associata al dato sperimentale per cui la BNCT con gli stessi agenti sensibilizzanti è efficace se il trattamento con neutroni termici viene eseguito dopo un intervallo di tempo pari a 24 h dalla somministrazione, vale a dire quando le informazioni disponibili indicano una localizzazione essenzialmente del tutto intracellulare dell'agente sensibilizzante. E' quindi ulteriormente rafforzata l'ipotesi di poter ottenere un effetto additivo o sinergico tra le due modalità terapeutiche, in quanto selezionando opportunamente il tempo di esposizione del tumore ai

due tipi di radiazione esiste la possibilità di orientare il danno verso due distretti subtumoral, entrambi aventi un'importanza critica per la sopravvivenza del tumore stesso.

5. Conclusioni

Le malattie che più spesso affliggono la società moderna dei paesi più ricchi sono quelle che colpiscono il sistema circolatorio e i tumori. Il modello tumorale scelto per mettere a punto una terapia combinata PDT + BNCT è stato il melanoma melanotico in quanto risulta essere uno dei più aggressivi e difficilmente curabili con le terapie cliniche in uso attualmente.

Per ottenere un'unica molecola che agisca da foto- e radio-sensibilizzante sono stati sintetizzati alcuni composti con caratteristiche generali già note dal punto di vista fotochimico e fotofisico ai quali sono stati legati covalentemente atomi di boro per renderle anche radio-sensibilizzanti. I sensibilizzatori analizzati sono stati ftalocianine, porfirine e clorine caricate con sino a 36 atomi di boro per molecola.

Tutti i composti hanno mostrato una buona affinità per le cellule B16F1 di melanoma melanotico e le proprietà sensibilizzanti sembrano essere proporzionali alla capacità di accumulo che viene influenzata da diversi fattori:

- il macrociclo tetrapirrolico, infatti la clorina mostra un'attività fotoattivante maggiore rispetto alla porfirina;
- i sostituenti periferici che variano la polarità della molecola, i più efficienti sembrano quelli di media polarità che rendono la molecola nel complesso anfifilica;
- lo ione presente all'interno del macrociclo, ad esempio una Si(IV)-ftalocianina risulta più efficiente rispetto alla corrispondente Zn(II)-ftalocianina;

Gli studi *in vivo* su topi C57BL/6 sono stati effettuati con la ftalocianina ZnB₄Pc, la porfirina H₂TCP e la clorina TPCF. Tutte hanno dimostrato una buona selettività per il tessuto tumorale rispetto ai tessuti sani circostanti, ma in seguito ad irradiazione la porfirina non sembra avere una buona attività foto sensibilizzante, mentre la

ftalocianina e la clorina agiscono da buoni sensibilizzatori. In particolare:

- entrambe provocano un rallentamento della crescita tumorale di topi irradiati con luce rossa dopo 3 h dall'iniezione i.v. della molecola, suggerendo che la risposta indotta sia di tipo vascolare;
- la clorina agisce anche dopo un irradiazione effettuato a 24 h dall'iniezione i.v. e in questo caso interviene una risposta di tipo cellulare.

La ftalocianina ZnB_4Pc e la porfirina H_2TCP sembrano essere dei promettenti radio-sensibilizzatori in quanto causano un rallentamento della crescita tumorale di topi irradiati con neutroni termici dopo 24 h dalla somministrazione.

Quindi è possibile supporre che combinando PDT e BNCT utilizzando un unico sensibilizzatore si ottenga un effetto non solo additivo, ma anche sinergistico per il trattamento del melanoma melanotico.

Bibliografia

Agarwal M. L., Larkin H. E., Zaidi S. I., Mukthar H. e Oleinick N. L. (1993) "Phospholipase activation triggers apoptosis in photosensitized mouse lymphoma cells". *Cancer Res.* **53**: 5897-5902.

Ara G., Aprile J. R., Malis C. D., Kane S. B., Cincotta, L., Foley J., Bonventre J. V. e Oseroff A. R. (1987) "Mechanism of mitochondrial photosensitization by the cationic dye, NN¹-Bis(2-ethyl-1,3-dioxylene)kryptocyanine (EDCK): preferential inactivation of complex I in the electron transport chain". *Cancer Res.* **47**: 6580-6585.

Barth R.F., Soloway A.H. e Fairchild (1990) Boron neutron capture therapy for cancer". *Cancer Res.* **50**: 1061-1070.

Berg K. (1992) "The unpolymerized form of tubulin is the target for microtubule inhibition by photoactivated tetra(4-sulfonatophenyl)porphine". *Biochim. Biophys. Acta* **1135**: 147-153.

Berg K., Madslie K., Bommer J. C., Oftebro R., Winkelman J. W. e Moan J. (1991) "Light induced relocalization of sulfonated meso-tetraphenilporphines in NHIK 3025 cells and effects of dose fractionation". *Photochem. Photobiol.* **53**: 203-210.

Boekelheide K., Eveleth J., Tatum A. H. e Winkelman J. W. (1987) "Microtubule assembly inhibition by porphyrins and related compounds". *Photochem. Photobiol.* **46**: 657-661.

Boissy R.E. (1988) "The melanocyte". *Dermatologic Clinics* **6.2**: 161-173.

Boukamp P., Petrussevska R. T., Breitkreutz D., Hornung J., Marknam A. e Fusening N. E. (1988) "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line". *Cell. Biol.* **106**: 761-771.

Ceberg C.P., Persson A., Brun A., Huiskamp R., Fyhr A-S., Persson B.R.R., e Salford L.G. (1995) "Performance of BSH in patients with astrocytoma grades III-IV- a basis for boron neutron capture therapy". *J. Neurosurg.* **83**: 79-85.

Ceberg C.P., Brun A., Kahl S.B., Koo M.S., Persson B.R.R., e Salford L.G. (1995) "A comparative study on the pharmacokinetics and biodistribution of boronated porphirin (BOPP) and sulphhydryl boron hydride (BSH) in the RG2 rat glioma model. *J. Neurosurg.* **83**: 86-92.

Coderre J.A., Button T.M., Micca P.L., Fisher C.D., Nawrocky M.M. e Liu H.B. (1994) "Neutron capture therapy of the 9L rat gliosarcoma using the p-borophenylalanine-fructose complex". *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **30**: 643-652.

Dougherty T. J., Henderso B. W., Jori G., Kessel D., Korbelik M., Moan J. e Peng Q. (1998) "Photodynamic therapy". *J. Natl. Cancer Inst.* **90**: 889-905.

Dubbelman T. M. A. R., Van Steveninck A. L. e Van Steveninck J. (1982) "Haematoporphyrin-induced photooxidation and photodynamic cross-linking of nucleic acids and their constituents". *Biochim. Biophys. Acta* **719**: 47-52.

Edwards S.M., Donnelly T.A., Sayre R.M., Rehins L.A. (1994) "Quantitative *in vitro* assessment of phototoxicity using a human skin model", *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **10**, 111-117

Fabris C., Valduga G., Miotto G., Borsetto L., Jori G., Garbisa S. e Reddi E. (2001) "Photosensitization with Zn (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis". *Cancer Res.* **61**: 7495-7500.

Fairchild R.G., Kahl S.B., Laster B.H., Kalef-Ezra J., Popenoe E.A. (1990). "In vitro determination of uptake, retention, distribution, biological efficacy and toxicity of boronated compounds for neutron capture therapy: a comparison of porphyrins and sulphydryl boron hybrids". *Cancer Res.* 50: 4860-4865.

Fitzpatrick T.B., Szabò G. (1959) "The melanocyte: cytology and cytochemistry". *J. Invest. Dermatol.* **32**: 197-209

Fritsch C., Goetz G., Ruzicka T. (1998) "Photodynamic therapy in dermatology". *Arch. Dermatol.* **134**: 207-214.

Fountain J.W., Bale S.J., Housman D. E., Dracopoli N. C. (1990) "Genetics of melanoma". *Cancer Surveys* **9**: 645-671

Gavin P.R., Huiskamp R., Wheeler F.J., Kraft S.L. e DeHaan C.E. (1993) "Large animal normal tissue tolerance using an epidermal neutron beam and borocaptate sodium" *Strahlenther. Onkol.* **165**: 225-228.

Girotti A. W. (1990) "Photodynamic lipid peroxidation in biological systems". *Photochem. Photobiol.* **51**: 497-509.

Gurtu V., Kain S. R. e Zhang G. (1997) "Fluorimetric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis". *Anal. Biochem.* **251**:98-102.

Grichnik J.M. (2008) "Melanoma, neovogenesis, and stem cell biology". *Journal of Investigative Dermatology* **128**: 2365-2380.

Hawthorne M.F., Shelly K., e Schmidt P.G. (1990) "Liposomal delivery of boron for BNCT. Abstract from the fourth international symposium in neutron capture therapy for cancer. Sidney, Australia:UICC.

Hetts S. W. (1998) "To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease". *J. Am. Med. Assoc.* **297**: 300-307.

Hu F. e Cardell R. R. (1963) "The ultrastructure of pigmented melanoma cells in continuous culture" *The Journal of Investigative Dermatology* 67-79

Ishimaru A. (1978) "Wave propagation and scattering in random media". *Academic Press*, New York.

Jori G. (1980) "The molecular biology of photodynamic action". In: *Lasers in Photomedicine and Photobiology* (Pratesi, R. e Sacchi, C. A., eds.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York p.58.

Jori G. (1992) "Far-red absorbing photosensitizers: their use in the photodynamic therapy of tumors". *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **62**: 371-378.

Jori G. e Spikes J. D. (1984) "Photobiochemistry of porphyrins". In: *Topics in Photomedicine* (Smith, K. C., ed.) Plenum Press, New York pp. 183-318.

Kalani A.D., Jack A., Montenegro G., Degliuomini J., Wallack M.K. (2008) "Immunotherapy as an adjuvant therapy in the management of advanced, surgically resected, melanoma". **143.1**: 59-70.

Kirkwood J.M., Tarhini A.A., Panelli M.C., Moschos S.J., Zarour H.M., Butterfield L.H., Gogas H.J. (2008) "Next generation of immunotherapy for melanoma". *J. Clin. Oncol.* **26.20**: 3445-3455.

Koritowski W., Pilas B., Sarna T., Kalyanaraman B. (1987) "Photoinduced generation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in melanins". *Photochem.Photobiol.* **45.2**:185-190.

Krinsky N. I. (1982) "Photobiology of carotenoid protection". In: *The Science of Photomedicine* (Regan, J. D. e Parrish, J. A., eds.) Plenum Press, New York pp. 347-407.

Langlois R., Ali, H., Brassieur R., Wagner J. R. e Van Lier J. E. (1986) "Biological activities of phthalocyanines IV. Type II sensitized photooxidation of L-tryptophan and cholesterol by sulfonated metallo-phthalocyanines". *Photochem. Photobiol.* **44**: 117-123.

Larsson B.S. (1991) "Melanine-affinic thioureas as selective melanoma seekers". *Melanoma Res.* **1**: 85-90.

Leman J. A. e Morton C. A. (2002) "Photodynamic therapy: applications in dermatology". *Expert Opin. Biol.* **2**: 45-53.

Leung J. (1994) "Photosensitizers in photodynamic therapy". *Semin. Oncol.* **21**: 4-10.

Liotta L. A., Guirguis R., Stracke M. (1987) "Review article: Biology of melanoma invasion and metastasis". *Pigment Cell Research* **1**: 5-15.

Matalka K.Z., Bailey M.Q., Barth R.F., Saubus A.E., Adams D.M., Soloway A.H., James S.M., Goodman J.H., Coderre J.A., Fairchild R.G. e Rofstad E.K. (1992) "A rat model for the treatment of melanoma metastatic to the brain by means of neutron capture therapy". In:

Allen B.G., Moore D. e Harrinton B. (Eds): Progress in neutron capture therapy for cancer. Plenum Press, NewYork, pp. 429-434.

McLaren A. e Sugar D. (1964) "Absorption and luminescence spectra of nucleoproteins and their components". In: *Photochemistry of Proteins and Nucleic Acids* (Alexanders, P., Baco, Z. M., eds.) Pergamon Press, Oxford pp. 29-51.

Moan J., Berg K., Kvam E., Western A., Malik Z., Ruck A. e Schneckenburger H. (1989) "Intracellular localization of photosensitizers". In: *Photosensitizing Compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use* (Bock, G., Marnett, S., eds.) Wiley, Chichester, UK, (Ciba Foundation Symposium 146) pp. 95-107.

Moan J., Christensen T. e Jacobsen P. B. (1984) "Porphyrin-sensitized photoinactivation of cells *in vitro*". In: *Porphyrin Localization and Treatment of Tumors. Progress in Clinical and Biological Research.* (Doiron, D. R., Gomer, C. J., eds.) Alan R. Liss, Inc., New York, vol. 170, pp. 419-442.

Moan J., Johannessen J. V., Christensen T., Espevik T. e McGhie J. B. (1982) "Porphyrin-sensitized photoinactivation of human cells *in vitro*". *Am. J. Pathol.* **109**: 184-192.

Moan J., McGhie J. B. e Jacobsen P. B. (1983) "Photodynamic effects on cells *in vitro* exposed to hematoporphyrin derivative and light". *Photochem. Photobiol.* **37**: 599-604.

Moan J. e Vistnes A. I. (1986) "Porphyrin photosensitization of protein in cell membranes as studied by spin-labelling and by quantification of DTNB-reactive SH-groups". *Photochem. Photobiol.* **44**: 15-19.

Moor A. C. E. (2000) "Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy". *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **57**: 1-13.

Noodt B. B., Berg K., Stokke T., Peng Q. e Nesland J. M. (1996) "Apoptosis and necrosis induced with light and 5-aminolaevulinic acid-derived protoporphyrin IX". *Br. J. Cancer* **74**: 22-29.

Oleinick N. L. (1998) "Apoptosis in response to photodynamic therapy". *Photodynamic News* **1**: 6-9.

Parrish J. A., Ying C. Y., Pathak M. A. e Fitzpatrick T. B. (1974) "Erythemogenic properties of long-wave ultraviolet light". In: *Sunlight and man* (Pathak, M. A., Harber, L. C., Seiji, M. e Kukita, A. eds.) University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 131-141.

Petterson O.-A., Carlsson J e Grusell E. (1992) "Accumulation of ^{10}B in the central degenerative areas of human glioma and colon carcinoma spheroids after sulphhydryl boron hydride administration". *Cancer Res.* **52.6**: 1587-1591.

Reddi E., Zhou C., Biolo R., Menegaldo E. e Jori G. (1990) "Liposome- or LDL-administered Zn(II)-phthalocyanine as a photodynamic agent for tumors. I. Pharmacokinetic properties and phototherapeutic efficiency". *Br. J. Cancer* **61**: 407-411.

Reyftman J. B., Santus R., Molière P. e Kohen E. (1986) "Fluorescent products formed by porphyrin photosensitization in ionic micelles". *Photobiochem. Photobiophys.* **11**: 197-208.

Rodgers M. A. J. (1985) "Activated oxygen". In: *Primary Photoprocesses in Biology and Medicine* (Bensasson, R. V., Jori, G.,

Land, E. J. e Truscott, T. J., eds.) Plenum Press, New York, pp. 181-195.

Rong F.-G., e Soloway A.H. (1994) "Synthesis of 5-tethered carborane containing pyrimidine nucleosides as potential agents for DNA incorporation". *Nucleus.-Nucleot.* **13**: 2021-2034.

Rodriguez R.Q.,e Kinsella T.J. (1991) "Halogenated pyrimidines as radiosensitizers for high grade glioma:revisited". *Int.J.Radiat.Biol.* **74**: 793-798.

Scott L. J. e Goa K. L. (2000) "Verteporfin". *Drugs and Aging* **16**: 139-146.

Selman S. H., Kreimer-Birnbaum M. e Onandhuri K. (1986) "Photodynamic treatment of trasplatable bladder tumors in rodent after pretreatment with chloroaluminium tetrasulfophthalocyanine". *J. Urol.* **136**: 141-145.

Smith P. K., Kron R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Garten F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J. e Klenk D. C. (1985) "Measurement of protein using bicinchoninic acid". *Anal. Biochem.* **150**:76-85.

Specht K. G. e Rodgers M. A. J. (1991) "Plasma membrane depolarization and calcium influx during cell injury by photodynamic action". *Biochim. Biophys. Acta* **1070**: 60-68.

Spiegelvogel B.E., Sood A., Powell W.,Tomasz J.,Porter K.,e Shaw B.R. (1993) "Chemical and enzymatic incorporation of boron in DNA". In: Soloway A.H., Barth R.F.,e Carpenter D.E. (Eds). Advances inneutron capture therapy, Plenum Press,New York, pp. 389-393.

Spikes J. D. (1986) "Phthalocyanine as photosensitizers in biological systems and photodynamic therapy". *Photochem. Photobiol.* **43**: 691-699.

Spikes J. D. (1989) "Photosensitization". In: *The Science of Photobiology* (Smith, K. C., ed.) Plenum Press, New York, pp. 79-110.

Spikes J. D. e Bommer J. C. (1986) "Zinc-tetrasulphophthalocyanine as a photodynamic sensitizer for biomolecules". *Int. J. Radiat. Biol.* **50**: 41-45.

Stefandiou M., Tosca A., Themelis G., Vazgiouraki E. e Balas C. (2000) "In vivo fluorescence kinetics and photodynamic therapy efficacy of delta-aminolevulinic acid-induced porphyrins in basal cell carcinomas and actinic keratoses; implications for optimisation of photodynamic therapy". *Eur. J. Dermatol.* **10**: 351-356.

Straight R. C., Vincent G. M., Hammond E. H. e Dixon J. A. (1985) "Porphyrin retention and photodynamic treatment of diet-induced atherosclerotic lesions in pigs". In: *Photodynamic Therapy of Tumours and Other Diseases*. (Jori, G. and Perria, C. A., eds.) Padova, Libreria Progetto, pp. 349-352.

Svaasand L. O., Martinelli E., Gomer G. J. e Profio A. E. (1990) "Optical characteristic of tumours in the visible and near-infrared". *Proc. SPIE* **1203**:2-21.

Valduga G., Reddi E., Jori G., Cubeddu R., Taroni P. e Valentini G. (1992) "Steady state and time-resolved spectroscopic studies on zinc(II)-phthalocyanine in liposomes". *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **16**: 331-340.

Valenzeno D. P. (1987) "Photomodification of biological membranes with emphasis on singlet oxygen mechanism". *Photochem. Photobiol.* **46**: 147-160.

Wilson B. C., Jeeves W. P. e Lowe D. M. (1985) "In vivo and post-mortem measurements of the attenuation spectra of light in mammalian tissues". *Photochem. Photobiol.* **42**: 153-162.

Woodburn K. W., Vardaxis N. J., Hill J. S., Kaye A. H. e Phillips D. (1991) "Subcellular localization of porphyrin using confocal laser scanning microscopy". *Photochem. Photobiol.* **54**: 725-732.

Zaidi S. I., Oleinick N. L., Zaim M. T. e Mukhtar H. (1993) "Apoptosis during photodynamic therapy-induced ablation of RIF-1 in C3H mice: electron microscopic, histopathologic and biochemical evidence". *Photochem. Photobiol.* **58**: 771-776.

Zhou H., Henzel W. J., Liu X., Lutschug A. e Wang X. (1997) "Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3". *Cell* **90**: 405-413.

Pubblicazioni

M. Schaffer, U. Kulka, B. Ertl-Wagner, P.M. Schaffer, E. Friso, R. Hell, G. Jori, A. Hofstetter, E. Dühmke

“Effect of Photofrin II as a radiosensitizing agent in two different oesophageal carcinoma cell lines”.

J. Porphyr. Phthalocyanines 9:470-475 (2005)

ISSN 1088-4246

E. Friso, G. Roncucci, D. Dei, M. Soncin, C. Fabris, G. Chiti, P. Colautti, J. Esposito, L. De Nardo, C.R. Rossi, D. Nitti, F. Giuntini, L. Borsetto, G. Jori

“A novel ^{10}B -enriched carboranyl-containing phthalocyanine as a radio- and photo-sensitising agent for boron neutron capture therapy and photodynamic therapy of tumours: *in vitro* and *in vivo* studies”.

Photochem. Photobiol. Sci. 5:39-50 (2006)

ISSN 1474-905X

C. Fabris, M. Graça Vicente, E. Hao, E. Friso, L. Borsetto, G. Jori, G. Miotto, P. Colautti, D. Moro, J. Esposito, A. Ferretti, C. R. Rossi, D. Nitti, G. Sotti, M. Soncin

“Tumour-localizing and -photosensitising properties of meso-tetra(4-nido-carboranylphenyl) porphyrin (H_2TCP)”.

J. Photochem. Photobiol., B: Biol. 89:131-138 (2007)

ISSN 1011-1344

J. Esposito, C. Ceballos, M. Soncin, C. Fabris, E. Friso, D. Moro, P. Colautti, G. Jori, G. Rosi, E. Nava

“Feasibility of BNCT radiobiological experiments at the HYTHOR facility”

Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. B 266:2587-2593 (2008)

ISSN: 0168-583X

M. Soncin, E. Friso, G. Jori, E. Hao, M.G. Vicente, G. Miotto, P. Colautti, D. Moro, J. Esposito, G. Rosi, C. Fabris

“Tumour-localizing and radiosensitising properties of meso-tetra(4-*nido*-carboranylphenyl)porphyrin (H₂TCP)”.

J. Porphyrins Phthal., in the press (2008)

E. Hao, E. Friso, G. Miotto, G. Jori, M. Soncin, C. Fabris, M. Sibrian-Vazquez, M.G. Vicente

“Synthesis and cellular investigations of tetrakis(*p*-carboranylthio-tetrafluorophenyl)chlorin (TPFC)”.

Org. Biomol. Chem. 6:3732-3740 (2008)