



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

## Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche

### *Curriculum* in Morfologia e Morfogenesi Umana

CICLO XXXII

COORDINATORE Prof. Stefani Massimo

"Possibili nuovi approcci nanotecnologici per la chemioterapia  
anti-tumorale. Studio sperimentale *in vitro*."

Settore Scientifico Disciplinare BIO/17 - Istologia

#### **Dottorando**

Dott. Dell'Accio Alfonso

---

#### **Tutor**

Prof.ssa Nistri Silvia

---

#### **Coordinatore**

Prof. Stefani Massimo

---

Anni 2016/2019

IL SAPERE NON È UN POTERE E NON CI RENDE SUPERIORI RISPETTO AL  
PROSSIMO.

IL SAPERE È UNA RESPONSABILITÀ. LA RESPONSABILITÀ DI TRASMETTERE  
LA CONOSCENZA A CHI NON SA.

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Il cancro: lo stato dell'arte.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2. Biologia del tumore.....</b>	<b>8</b>
1.2.1 <u>Proliferazione e produzione autonoma dei fattori di crescita delle cellule tumorali.....</u>	9
1.2.2 <u>Insensibilità delle cellule tumorali ai segnali anti-proliferativi.....</u>	11
1.2.3 <u>Acquisizione di un potenziale replicativo illimitato.....</u>	11
1.2.4 <u>Strategie immunosoppressive attuate dal tumore.....</u>	12
1.2.5 <u>Capacità di evadere l'apoptosi.....</u>	13
1.2.6 <u>Invasione dei tessuti e metastatizzazione.....</u>	14
1.2.7 <u>Ruolo dell'angiogenesi nello sviluppo tumorale.....</u>	15
1.2.8 <u>Effetto di aumentata permeabilità e ritenzione (EPR).....</u>	16
1.2.9 <u>Stress ossidativo intrinseco in cellule tumorali.....</u>	17
1.2.10 <u>Ruolo del sistema tioredossina/tioredoxina reductasi (Trx/TrxR) nel mantenimento dello stato redox delle cellule tumorali.....</u>	19
<b>1.3. La Chemioterapia.....</b>	<b>22</b>
1.3.1. <u>Farmaci chemioterapici: il cis-platino.....</u>	24

1.3.2.	<u>Meccanismo d'azione ed effetti collaterali del cisplatino</u> .....	25
1.3.3.	<u>Farmaco-resistenza al cisplatino</u> .....	28
1.3.4.	<u>Farmaci chemioterapici: la doxorubicina (DOXO)</u> .....	29
1.3.5.	<u>Meccanismo d'azione ed effetti collaterali della DOXO</u> .....	31
1.3.6.	<u>Farmaco-resistenza alla DOXO</u> .....	34
<b>1.4.</b>	<b>Approcci chemioterapici alternativi</b> .....	<b>35</b>
<b>2.</b>	<b>PROGETTO I: Sintesi, caratterizzazione ed effetti biologici di un nuovo complesso metallico fluorescente a base d'argento ([Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl), con proprietà anti-tumorali</b> .....	<b>36</b>
<b>2.1</b>	<b>Composti metallici a base d'argento</b> .....	<b>37</b>
2.1.1	<u>NHC e loro caratteristiche</u> .....	38
2.1.2	<u>NHC leganti l'argento (Ag-NHC): meccanismo d'azione e applicazioni terapeutiche</u> .....	41
<b>2.2</b>	<b>Scopo</b> .....	<b>42</b>
<b>2.3</b>	<b>Materiali e metodi</b> .....	<b>43</b>
2.3.1	<u>Sintesi del cloruro di argento bis(1-(anthracen-9-ilmetil)-3-etilimidazol-2-ildiene) ([Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl)</u> .....	43
2.3.2	<u>Analisi spettrofotometrica</u> .....	45
2.3.3	<u>Determinazione del Log P</u> .....	45
2.3.4	<u>Cristallografia a raggi X</u> .....	46
2.3.5	<u>Colture cellulari</u> .....	46
2.3.6	<u>Saggio di citotossicità e calcolo IC<sub>50</sub></u> .....	46
2.3.7	<u>Valutazione del drug uptake</u> .....	48
2.3.8	<u>Localizzazione intracellulare del complesso [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl mediante microscopia a fluorescenza</u> .....	49
2.3.9	<u>Saggio dell'attività della trxR</u> .....	49

2.3.10	<u>ESI-MS</u> .....	50
2.3.11	<u>Analisi statistica</u> .....	50
<b>2.4</b>	<b>Risultati</b> .....	<b>51</b>
<b>2.5</b>	<b>Discussione</b> .....	<b>62</b>
<b>3</b>	<b>PROGETTO II: Sintesi, caratterizzazione chimica ed effetti biologici di nanoparticelle (NPs) di PLGA funzionalizzate con (DOXO). Studio <i>in vitro</i></b> .....	<b>66</b>
3.1	<u>Nanotecnologia e nanomedicina</u> .....	66
3.2	<u>Drug Delivery System</u> .....	67
3.2.1	<u>Liposomi</u> .....	69
3.2.2	<u>Le nanoparticelle</u> .....	70
3.2.2.1	<u>Le NPs polimeriche</u> .....	70
3.2.2.2	<u>Le NPs a base di acido poli-(D,L-lattico-co-glicolico) (PLGA)</u> .....	72
3.2.2.3	<u>L'uso di sonde fluorescenti in nanomedicina: le cianine</u> .....	74
3.2.2.4	<u>NPs di PLGA leganti DOXO</u> .....	75
<b>3.3</b>	<b>Scopo</b> .....	<b>76</b>
<b>3.4</b>	<b>Materiali e metodi</b> .....	<b>77</b>
3.4.1	<u>Sintesi del dimero fluorescente</u> .....	77
3.4.2	<u>Caratterizzazione del dimero fluorescente (5) e della DOXO mediante spettroscopia di assorbimento UV-Vis</u> .....	79
3.4.3	<u>Sintesi delle diverse formulazioni di NPs</u> .....	79
3.4.4	<u>Sintesi delle NPs con acido fosfotungstico</u> .....	81
3.4.5	<u>Misure di Dynamic Light Scattering (DLS) e potenziale zeta</u> .....	82
3.4.6	<u>Caratterizzazione del dimero fluorescente (5) e della DOXO mediante spettroscopia a fluorescenza</u> .....	82
3.4.7	<u>Analisi della cinetica di rilascio della DOXO da parte delle NPs</u> .....	83

3.4.8 <u>Saggio di citotossicità</u> .....	83
3.4.9 <u>Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM)</u> .....	84
3.4.10 <u>Localizzazione intracellulare della DOXO mediante microscopia confocale a scansione laser</u> .....	85
3.4.11 <u>Valutazione della DOXO intracellulare mediante citofluorimetria a flusso</u> .....	85
3.4.12 <u>Analisi statistica</u> .....	85
<b>3.5 Risultati</b> .....	<b>86</b>
<b>4. Discussione</b> .....	<b>104</b>
<b>5. CONCLUSIONI</b> .....	<b>109</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>110</b>
<b>7. RINGRAZIAMENTI</b> .....	<b>128</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Il Cancro: lo stato dell'arte

Il cancro rappresenta una delle maggiori cause di morte nel mondo e le ragioni di questo triste primato sono complesse e comprendono sia l'aumento dell'età della popolazione, sia la presenza di fattori di rischio spesso associati con le condizioni di sviluppo socio-economiche di un paese (Fig.1) (BRAY F. ET AL., 2018).

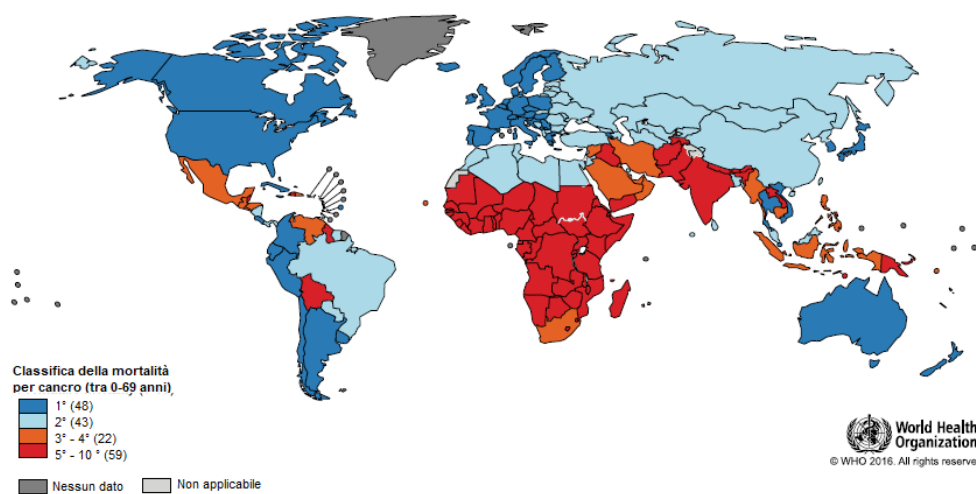


Fig. 1 - Mappa globale che illustra la classifica mondiale dei paesi stilata in base alla mortalità per cancro al di sotto dei 70 anni di età (dati 2015).

Il tumore, è una malattia caratterizzata da un'incontrollata proliferazione di alcune cellule dell'organismo, che smettono di rispondere ai meccanismi fisiologici di controllo cellulare a seguito di danni al loro patrimonio genetico. Queste alterazioni genetiche conferiscono un vantaggio adattativo al tumore e ne supportano la

crescita al di là delle barriere selettive rappresentate dal microambiente tissutale (GATENBY RA AND GILLIES RJ, 2008).

Lo sviluppo di un tumore richiede in genere molte fasi, ognuna governata da numerosi fattori dipendenti dal profilo genetico dell'individuo, dal suo stile di vita e dall'ambiente dove vive. Nonostante non siano stati ancora individuati nel dettaglio i meccanismi di formazione e diffusione di un tumore, in questo processo sembrano essere rilevanti fattori esterni (es. fumo di sigaretta, agenti chimici, radiazioni e infezioni) e interni (es. predisposizione genetica, alterazioni metaboliche, ormoni e disfunzioni del sistema immunitario). Questi fattori potrebbero agire insieme o sequenzialmente nel promuovere il processo di carcinogenesi che può richiedere anche 10 anni dalla formazione di una singola cellula allo sviluppo di una massa tumorale rilevabile (ALBERTS B., 2002).

## **1.2 Biologia del tumore**

Attualmente si ritiene che la vasta gamma di genotipi tumorali sia la manifestazione di alcune importanti alterazioni della fisiologia cellulare come: autonomia nei segnali di crescita che comporta un'aumentata attività proliferativa, insensibilità ai segnali d' inibizione della proliferazione, potenziale replicativo illimitato, proprietà immuno-soppressive, evasione dall'apoptosi, angiogenesi, invasione tissutale e metastasi (Fig.2) (HANAHAN D AND WEINBERG RA, 2000).



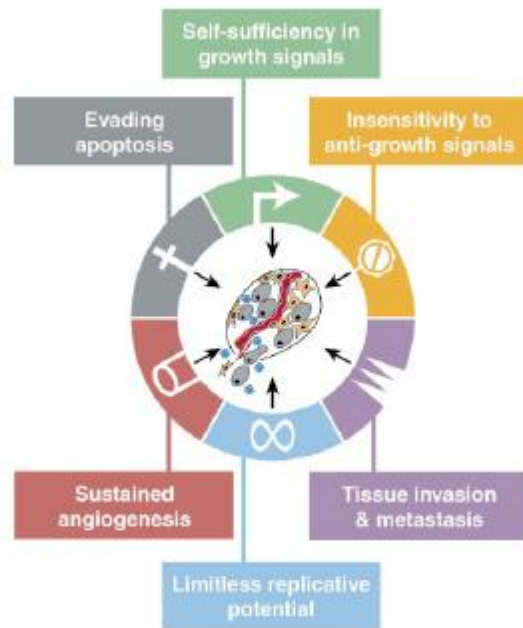


Fig. 2 – Le capacità acquisite dalla cellula tumorale (HANAHAN D AND WEINBERG RA, 2000).

### 1.2.1 Proliferazione e produzione autonoma dei fattori di crescita delle cellule tumorali

Le cellule tumorali si replicano con un tasso di crescita più alto delle cellule sane, e quindi consumano più nutrienti, a causa delle mutazioni che aboliscono l'inibizione della proliferazione e alla liberazione di fattori che ne promuovono la crescita. Questi fattori costituiti da citochine, chemochine, fattori di crescita, molecole pro-infiammatorie ed enzimi in grado di rimodellare la matrice cellulare del tessuto stesso possono essere prodotti dalla stessa cellula o dalle cellule che costituiscono il microambiente tumorale come le cellule endoteliali dei vasi sanguigni, i fibroblasti, le cellule dendritiche, i linfociti B e T e altri tipi di cellule correlate al tessuto dove si localizza il tumore (Fig.3). (WHITESIDE T.L., 2008; BALKWILL FR ET AL., 2012).

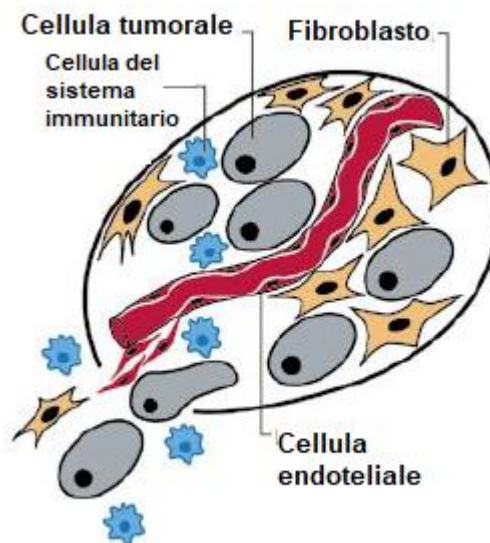


Fig. 3 – Schematizzazione generica del microambiente tumorale.

L'interazione dei segnali extracellulari con i propri recettori attiva determinate vie di segnalazione che possono influire sull'espressione genica e indurre un aumento della proliferazione e della motilità cellulare. Anche le integrine, recettori di membrana coinvolti nell'adesione cellula-matrice, possono giocare un ruolo importante nel regolare la proliferazione cellulare. Determinati tipi di integrine sono infatti in grado di attivare vie di segnalazione intracellulari che modulano alcuni processi correlati alla progressione tumorale, quali: la proliferazione, la sopravvivenza, la migrazione e l'invasività cellulare. (Lamar JM et al., 2008). Le cellule tumorali acquisiscono così la capacità di produrre autonomamente i fattori proliferativi di cui necessitano per la crescita, riducendo in tal modo, la loro dipendenza dai fattori esogeni, come avviene per la produzione di PDGF nel glioblastoma e del TGF- $\alpha$  nel sarcoma (FEDI ET AL. 1997).

Oltre all'autonomia dai segnali di crescita, alcune cellule tumorali over-esprimono i recettori per specifici fattori di crescita. In alcuni tipi di tumore come il glioblastoma o il cancro del polmone non a piccole cellule, l'over-espressione di ErbB1, recettore dell'EGF, o la sua mancata down-regolazione portano come effetto finale a un'attività proliferativa di tipo costitutivo. (GRANDAL M.V. AND MADSHUS I.H., 2008).

### 1.2.2 Insensibilità delle cellule tumorali ai segnali anti-proliferativi

In un tessuto normale molti segnali anti-proliferativi, sia diffusibili che legati alla matrice extracellulare, cooperano a garantire il mantenimento della quiescenza cellulare e dell'omeostasi tissutale. Molti di questi segnali agiscono regolando il ciclo cellulare, bloccando le cellule in uno stato quiescente ( $G_0$ ), o inducendo l'acquisizione di specifici tratti differenziativi, stabilizzandole in uno stato post-mitotico. Le cellule tumorali riescono a sfuggire a tali meccanismi di controllo della proliferazione in diversi modi. Uno dei più comuni prevede il coinvolgimento della proteina del retinoblastoma, pRb, una proteina associata alla cromatina che regola l'espressione di numerosi geni essenziali per la progressione G1/S. In cellule quiescenti, differenziate o bloccate in G1, pRB è ipo-fosforilata, con conseguente blocco della proliferazione cellulare. Quando pRB viene iper-fosforilata ad opera di specifiche chinasi, la cellula progredisce nel ciclo, entra in fase S e procede con la divisione cellulare. Diverse molecole di segnalazione, tra le quali il TGF- $\beta$ , contribuiscono a mantenere pRB in stato ipo-fosforilato. Le cellule tumorali possono evadere questo tipo di regolazione del ciclo cellulare in vari modi. Mutazioni a carico del gene RB o difetti nella sua via di regolazione sono stati identificati in diversi tipi di tumori. Mutazioni nel gene del recettore per il TGF- $\beta$  o una sua down-regolazione si ritrovano nel carcinoma del colon retto con instabilità microsatellitare (MARKOWITZ S ET AL., 1995) e in alcuni tumori di origine epiteliale o emopoietica (FYNAN TM AND REISS M, 1993).

### 1.2.3 Acquisizione di un potenziale replicativo illimitato

Le cellule normali hanno un potere replicativo limitato, ovvero, dopo vari cicli di replicazione possono andare incontro a senescenza. La senescenza è associata all'accorciamento dei telomeri, strutture specializzate di eterocromatina situate all'estremità dei cromosomi, che hanno il compito di stabilizzare la struttura stessa del cromosoma. A ogni divisione cellulare i telomeri subiscono un graduale accorciamento fino

al raggiungimento di una lunghezza critica che induce la cellula a smettere di proliferare, andare in senescenza e poi morire per apoptosi.

Nel tentativo di sopravvivere, le cellule cancerose hanno sviluppato diversi meccanismi, tra i quali, il mantenimento della struttura dei telomeri. In molti tipi di tumori, infatti, si ha l'attivazione di un enzima detto telomerasi, una ribonucleoproteina, che aggiunge sequenze ripetitive di DNA non codificante al terminale 3' dei filamenti di DNA, nelle regioni dei telomeri, in modo da mantenere integra la lunghezza dei cromosomi dopo ogni ciclo cellulare. Nelle cellule normali adulte, ad eccezione del sistema ematopoietico e delle cellule germinali, l'espressione della telomerasi è normalmente repressa al fine di evitare una proliferazione illimitata. Per contro, l'attività telomerasica è stata ritrovata nell'85% circa dei tumori maligni (KIM ET AL., 1994).

#### 1.2.4 Strategie immunosoppressive attuate dal tumore

Il tumore attua strategie per rendersi invisibile al normale controllo operato dal sistema immunitario. Alcune mutazioni puntiformi e/o delezioni geniche che avvengono durante la sua crescita, selezionano cloni in grado di sfuggire al riconoscimento dei linfociti T in quanto privi sia del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC-I) che del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC-II). In aggiunta le cellule tumorali sono in grado di:

- Down-regolare i geni coinvolti nell'espressione della catena CD3, delle tirosin-chinasi p56 e p59 che sono normali induttori coinvolti nel pathway per l'attivazione dei linfociti T;
- Up-regolare l'espressione del gene per il fattore di crescita trasformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) una citochina che sopprime la risposta immunitaria (RABINOVICH G.A. ET AL., 2007).

Studi per sviluppare terapie in grado di rendere di nuovo riconoscibile il tumore al sistema immunitario sono tuttora in corso. Tra le varie strategie ipotizzate è stato testato l'uso di nanoparticelle (NPs) leganti sia fucoidano, un polisaccaride solfato estratto dall'alga bruna

*Fucus vesiculosus*, sia un chemioterapico come ad esempio la doxorubicina (DOXO). L'azione antitumorale del chemioterapico insieme all'effetto immunomodulatore del fucoidano hanno dato *in vitro*, su linee cellulari di adenocarcinoma mammario (MDA-MB-231; 4T1) in co-coltura con macrofagi, risultati promettenti sia in termini di capacità anti-proliferativa che di induzione del differenziamento dei linfociti T e rilascio di interleuchine stimolanti l'apoptosi (es. IL-12) (PARDOLL D.M., 2012; MIYAZAKI Y. ET AL., 2014; PAWAR V.K. ET AL., 2018).

### 1.2.5 Capacità di evadere l'apoptosi

La capacità delle cellule tumorali di espandersi in numero non dipende solo dalla loro potenziata abilità nel proliferare ma anche dalla resistenza all'apoptosi. In condizioni ambientali o intracellulari sfavorevoli che possono indurre danni al DNA, difetti della segnalazione intracellulare, ipossia o carenza di fattori di sopravvivenza, le cellule dei tessuti sani avviano in modo fisiologico il processo apoptotico (EVAN G AND LITTLEWOOD T, 1998). Il processo apoptotico è caratterizzato da una serie di eventi che portano alla morte della cellula e alla sua rimozione da parte di macrofagi o di cellule vicine, senza causare l'insorgere di meccanismi correlati all'infiammazione. Sono tre le principali vie che inducono l'apoptosi mediante attivazione: dei linfociti T citotossici, della proteina oncosoppressore p53 o dei recettori come quello del fattore di necrosi tumorale (Tumor Necrosis Factor, TNF) (HARRIS C.C., 1996; PITTI R.M ET AL., 1998).

Le cellule tumorali invece, non necessitando delle normali esigenze in termini di ossigeno, glucosio e amminoacidi per la propria funzionalità, in caso di scarsità di nutrienti non innescano l'apoptosi (ARGILÉS J.M. AND AZCÓN-BIETO J., 1988). Queste cellule possono acquisire resistenza all'apoptosi in molteplici modi, ma nella maggior parte dei casi (in più del 50% dei tumori umani) si ha la perdita di funzionalità della proteina p53 (HARRIS C.C., 1996). Anche difetti nella via di segnalazione della PI3K-AKT/PKB, possono indurre apoptosi. AKT/PKB fisiologicamente promuove la sopravvivenza cellulare

inibendo l'espressione dei pathway apoptotici, mediante fosforilazione dei residui serina e treonina di proteine pro-apoptotiche. In numerosi tipi di tumori come il cancro ovarico, mammario, gastrico e colon-rettale, PI3K è geneticamente mutata o over-espressa così da trasmettere continui segnali antiapoptotici (ELMENIER ET AL., 2019) Un altro modo che hanno le cellule tumorali di evadere il processo apoptotico è quello di esprimere recettori, non funzionanti, coinvolti nelle vie apoptotiche (HARRIS C.C., 1996; PITTI R.M ET AL., 1998).

#### 1.2.6 Invasione dei tessuti e metastatizzazione

La capacità delle cellule tumorali di colonizzare nuovi distretti, a partire dalla sede primaria di sviluppo del cancro, è riscontrata nella maggior parte dei tumori umani e rappresenta la causa del circa il 90% delle morti per cancro (SPORN MB, 1996; HANAHAN D AND WEINBERG RA, 2000). Tale processo, definito metastatizzazione, è estremamente complesso e coinvolge l'alterazione funzionale di numerose proteine tra le quali: molecole di adesione cellula-cellula (es. caderine), cellula-matrice (es. le integrine) e metallo-proteasi, enzimi capaci di degradare le molecole della sostanza extracellulare favorendo in tal modo il processo di invasione tissutale. Alcune cellule tumorali, durante il loro processo di trasformazione possono indurre uno switch nel tipo e nella funzione di specifiche integrine, favorendo l'espressione di quelle che promuovono la tumorigenesi. Un esempio di tale processo è stato osservato nel carcinoma a cellule squamose dell'epidermide, dove mutazioni nel gene della p53 determinano uno switch nella funzione dell'integrina  $\alpha3\beta1$ , recettore per la laminin-332/laminin-5. Questa variazione di funzione induce un forte aumento dell'espressione della MMP-9 che, a sua volta, promuove l'angiogenesi e la degradazione della matrice extracellulare, favorendo il processo di metastatizzazione (LAMAR J.M. ET AL., 2008).

Ulteriori stimoli, che favoriscono la metastatizzazione, sono quelli di natura meccanica. La continua crescita della massa tumorale genera infatti un aumento della pressione sulla matrice extracellulare. Tale aumento di pressione viene avvertito dalla cellula tumorale che risponde deformando il proprio citoscheletro per adattarsi. Come

conseguenza si ha la deformazione anche del nucleoscheletro che spinge all'attivazione di numerose vie di segnalazione intracellulari coinvolte nella sopravvivenza e nella promozione della motilità cellulare. L'ipossia può rivelarsi un ulteriore induttore del processo di metastatizzazione, infatti, quando la massa tumorale raggiunge determinate dimensioni, la richiesta di ossigeno non può più essere soddisfatta per semplice diffusione. Il tumore attua due strategie: l'invasione di nuovi organi mediante metastatizzazione e l'induzione di processi di neoangiogenesi per garantire il corretto apporto di ossigeno e nutrienti (MAKALE M, 2007).

### 1.2.7 Ruolo dell'angiogenesi nello sviluppo tumorale

L'angiogenesi rappresenta quindi lo step successivo, e necessario, per la sopravvivenza del tumore. Le cellule situate sul limite più esterno della massa tumorale accedono più facilmente ai nutrienti, continuando così a dividersi a discapito di quelle più interne che di conseguenza vanno in necrosi, creando il cosiddetto "*core necrotico*" del tumore. A questo stadio si verifica l'instaurarsi di un equilibrio, cioè il numero di cellule che si dividono eguaglia quelle che vanno in necrosi e da questo ne consegue che la massima dimensione raggiungibile dal tumore è  $2 \text{ mm}^3$  (circa  $10^6$  cellule) (BRANNON-PEPPAS L. AND BLANCHETTE J.O., 2004). L'ulteriore crescita del tumore, in termini di dimensioni, lo si deve alla neoformazione di capillari. L'innesco del processo di angiogenesi è mediato da specifiche molecole pro-angiogenesi rilasciate dal tumore stesso o dai macrofagi attratti da esso (FOLKMAN J AND KLAGSBRUN M, 1987; HANAHAN D AND FOLKMAN J, 1996).

Il fenotipo angiogenico del tumore è regolato da un delicato equilibrio locale tra attività pro-angiogeniche e anti-angiogeniche. Lo sbilanciamento a favore della produzione di proteine pro-angiogeniche, come il VEGF e il fattore di crescita dei fibroblasti FGF-1 e FGF-2, può essere indotto da numerosi eventi tra i quali: ipossia, attivazione degli oncogeni, inattivazione dei geni oncosoppressori e incremento

dell'attività pro-angiogenica delle metalloproteasi della matrice (FOLKMAN J, 2002).

Il passaggio a questa fase demarca i due stadi di sviluppo tumorale: la fase pre-vascolare e la fase vascolare. La fase pre-vascolare, la quale è stata ben definita dagli studi sui tumori alla cervice, alla vescica e al seno, può persistere per anni ed è di solito associata a una scarsa crescita tumorale e a un quasi del tutto assente processo di metastatizzazione. La fase vascolare invece è seguita da una rapida crescita del tumore e produzione di metastasi (WEIDNER N. ET AL., 1991). L'angiogenesi a livello del tessuto tumorale rappresenta quindi uno dei target cardine da inibire per lo sviluppo di future terapie chemioterapiche.

#### 1.2.8 Effetto di aumentata permeabilità e ritenzione (EPR)

La rapida vascolarizzazione dei tumori generalmente comporta la presenza di anomalie strutturali e funzionali se comparata a quella dei tessuti sani. I vasi del tumore sono strutturalmente disorganizzati, tortuosi, dilatati ed esprimono sulla loro superficie marker peculiari che possono essere usati come target nell'analisi dello stadio del tumore (BERGERS G AND BENJAMIN LE, 2003). Le cellule endoteliali dei vasi sanguigni che nutrono i tumori maligni mostrano tra loro degli spazi molto larghi, con dimensioni che vanno dai 100 nm ad alcune centinaia di nanometri, a differenza delle normali giunzioni dei vasi dei tessuti sani che hanno dimensioni comprese tra i 5 e i 10 nm (WANG A.Z. ET AL., 2012). La diversa architettura dell'endotelio tumorale, accompagnata da una maggiore produzione di mediatori vascolari che facilitano l'extravasazione di macromolecole nel tessuto tumorale, determina l'aumento della permeabilità vascolare. In tal modo le cellule tumorali possono assicurarsi un sufficiente rifornimento di nutrienti e ossigeno che le consentono di soddisfare le crescenti esigenze metaboliche dovute alla rapida crescita del tessuto tumorale.

Nei tessuti tumorali, inoltre, molti dei vasi linfatici sono compressi e collassati, provocando così un ridotto drenaggio che causa l'accumulo tissutale di vari tipi di macromolecole (MATSUMURA Y AND



MAEDA H, 1986). L'aumento della permeabilità vascolare, associato ad un ridotto drenaggio del sistema linfatico, sono responsabili del cosiddetto "Effetto di aumentata permeabilità e ritenzione" (EPR, Enhanced Permeability and Retention) caratteristico di molti tumori solidi.

Un esperimento tipico per dimostrare l'EPR si basa sulla somministrazione per via endovenosa del Blu di Evans, un colorante azoico caratterizzato da un'elevata affinità per l'albumina, mimando così il comportamento delle macromolecole usate come farmaci. Da questi esperimenti condotti *in vivo* si nota l'accumulo preferenziale di questo colorante nel sito tumorale e non nel tessuto sano. Nei tumori superiori a 1 cm di diametro, il Blu di Evans si accumula preferenzialmente nella zona periferica del tumore e non nel suo core necrotico. Questo dimostra come l'EPR sia un fenomeno vascolare-dipendente, in quanto, la zona centrale del tumore è meno vascolarizzata di quella periferica (FANG J. ET AL., 2011). L'effetto EPR è un fenomeno che viene comunemente utilizzato per le strategie chemioterapiche permettendo così un accumulo preferenziale del farmaco a livello del sito tumorale piuttosto che in altri tessuti sani (GOLOMBEK S.K. ET AL., 2018).

#### 1.2.9 Stress ossidativo intrinseco in cellule tumorali

Il termine stress ossidativo è stato introdotto per la prima volta alla fine degli anni '80 e definito come uno squilibrio tra la produzione di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS) e i sistemi di difesa antiossidanti presenti nella cellula (SIES H AND CADENAS E, 1985)

Tra le principali specie chimiche reattive dell'ossigeno ci sono il superossido radicale ( $O_2^{\cdot-}$ ) e il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). Questi ROS possono dar vita ulteriormente ad altri composti altamente reattivi: il  $O_2^{\cdot-}$  reagendo con l'ossido nitrico (NO) può formare il perossi-nitrito ( $OONO^{\cdot-}$ ) mentre l'  $H_2O_2$ , mediante reazione di Fenton e in presenza di ioni ferro ( $Fe^{2+}$ ), può generare il radicale ossidrile ( $\cdot OH$ ) (BRAND M.D. T AL., 2004).

Le specie ossidanti sono prodotte dalla normale attività metabolica della cellula e i mitocondri ne rappresentano la principale fonte endogena di produzione. I ROS sono infatti sottoprodotti tossici che derivano dalla perdita di elettroni che può avvenire a livello del complesso I e III della catena respiratoria, a causa di un'incompleta riduzione dell'ossigeno molecolare (O<sub>2</sub>) ad acqua (H<sub>2</sub>O) che avviene durante la produzione di adenosin-trifosfato (ATP) da parte della fosforilazione ossidativa (PASCUAL-AHUIR A. ET AL., 2017).

Il danno ossidativo prodotto dai ROS deriva dalla loro elevata reattività che può andare ad agire: su proteine ed enzimi, destabilizzando la loro struttura e la loro efficienza catalitica, sull'integrità delle membrane cellulari, per perossidazione lipidica, e sul DNA, destabilizzandolo, compromettendo così la funzionalità della cellula stessa (GIUSTARINI D. ET AL., 2009). Tuttavia la cellula ha a disposizione un sistema antiossidante di tipo enzimatico e non enzimatico, per contrastare l'azione dei ROS. Sul versante enzimatico, sono tre le principali classi di enzimi antiossidanti intracellulari: le superossido dismutasi (SOD), le catalasi (CAT) e la glutatione perossidasi (GPX) (IGHODARO O.M. AND AKINLOYE, 2018).

A basse concentrazioni, comunque, i ROS contribuiscono al mantenimento di un corretto stato ossido-riduttivo della cellula e garantiscono il normale funzionamento di importanti vie di segnalazione che consentono la sopravvivenza cellulare. Ad alte concentrazioni, come abbiamo precedentemente accennato, i ROS causano importanti danni che possono portare le cellule a morte programmata o promuoverne la trasformazione neoplastica. Le cellule tumorali producono maggiori quantità di ROS rispetto alle cellule normali. Ciò è dovuto a varie cause:

- Un'alterata funzionalità dei mitocondri che “stressati” dall'eccessiva richiesta di energia necessaria per sostenere l'esponenziale crescita tumorale, portano alla generazione di alte quantità di ROS;
- L'azione di oncogeni che da un lato possono attivare vie di segnalazione che favoriscono la formazione di ROS e dall'altro

lato possono determinare la riduzione dei livelli dei sistemi antiossidanti.

In realtà nelle cellule tumorali, tramite processi adattativi, si può generare un perfetto equilibrio tra la produzione dei ROS e il livello dei sistemi antiossidanti. Questo porta al mantenimento di una moderata concentrazione di ROS che non raggiungendo mai livelli così elevati, permettono alla cellula di sopravvivere e di sfuggire alla morte cellulare. Moderati livelli di ROS, infatti, attivano l'espressione di *stress-responsive genes*, che codificano per fattori pro-sopravvivenza, per fattori pro-angiogenici compreso il VEGF e per metalloproteasi che promuovono l'invasività e lo sviluppo di metastasi (Fig.4) (LEONE A ET AL., 2017).

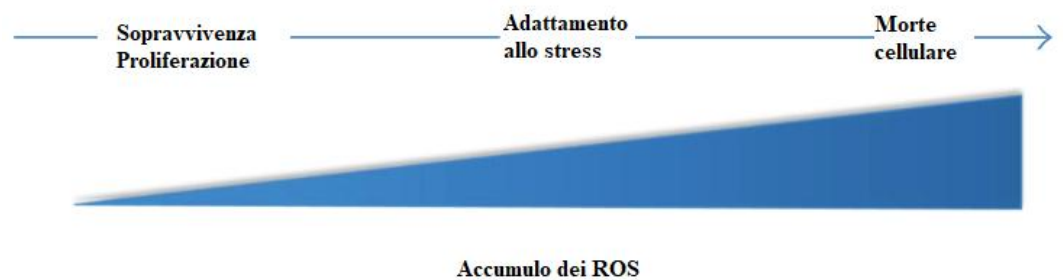


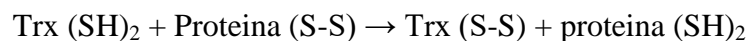
Fig. 4 – Effetti cellulari in base all'incremento dell'accumulo dei ROS:

I processi di adattamento delle cellule tumorali sembrano comunque limitati, a tal punto da ipotizzare per le terapie antitumorali l'utilizzo di farmaci in grado di provocare un incremento nei livelli di ROS in modo tale da indurre la cellula in apoptosi (ZHOU Y ET AL., 2003)

#### 1.2.10 Ruolo del sistema tioredossina/tioredoxina reduttasi (Trx/TrxR) nel mantenimento dello stato redox delle cellule tumorali

L'elevato metabolismo che caratterizza le cellule tumorali e l'utilizzo di chemioterapici per cercare di arrestarne la crescita, sono due processi che possono portare entrambi alla formazione di ROS. Le cellule tumorali per evitare di essere danneggiate da tali specie reattive, possono sfruttare il fisiologico meccanismo cellulare del sistema tioredossina/tioredoxina Reduttasi (Trx/TrxR). Le Trx è una proteina di

12 kDa presente in tutti gli organismi e indispensabile per il mantenimento dell'ambiente redox delle cellule. Nei mammiferi la forma maggiormente diffusa è la Trx-1 citosolica, coinvolta nella regolazione di molte funzioni fondamentali per la cellula come la proliferazione e la morte cellulare. La Trx presenta nel suo sito catalitico una sequenza altamente conservata, contenente due cisteine, e dotata di attività redox: Cys-Gly-Pro-Cys. La presenza delle due cisteine in forma ridotta all'interno del sito catalitico è fondamentale per l'azione della Trx, in quanto esse riducono i ponti disolfuro (S-S) presenti su proteine ossidate nei vari pathway metabolici o che sono divenute bersaglio dell'azione dei ROS (ARNER E.S.J. AND HOLMGREEN A., 2000; ŠTEFANKOVÁ ET AL., 2005):



La Trx ossidata viene prontamente ridotta dalla TrxR, una seleno-proteina appartenente alla famiglia delle piridin-nucleotide disolfuro ossido reductasi. Nell'uomo esistono due isoforme principali: la TrxR1 citosolica, quella maggiormente diffusa, e la TrxR2 mitocondriale codificate dai geni TXN1 e TXN2 (GASDASKA P.Y. ET AL., 1995; MIRANDA-VIZUETE A. ET AL., 1999).

TrxR, tramite l'ausilio di un atomo di selenio a livello del suo sito catalitico (sottoforma di selenio-cisteina) e in presenza del cofattore NADPH, è in grado di legare la Trx ossidata e garantirne il suo ritorno alla forma ridotta:



Una volta rigenerato il sito catalitico, la Trx è nuovamente pronta ad agire su altre proteine bersaglio. La Trx è un potente agente anti-ossidante e come tale svolge un duplice ruolo: come carrier di elettroni per il ciclo catalitico di alcuni enzimi (es. ribonucleotide reductasi e la protein disolfuro isomerasi) e come fattore di protezione nell'evitare

l'inattivazione e la formazione di aggregati di proteine ossidate. La Trx inoltre, gioca un ruolo chiave nella regolazione redox di alcuni fattori di trascrizione che controllano l'espressione di numerosi geni coinvolti nella regolazione della crescita, della sopravvivenza cellulare, nella risposta infiammatoria o allo stress, come AP-1, NF-kB e p53, SP-1 (HIROTA K ET AL., 1997; JAYARAMAN L ET AL., 1997; HIROTA K ET AL., 1999; LEE S ET AL., 2013).

Il sistema Trx/TrxR, in condizioni fisiologiche, protegge dalla trasformazione delle cellule sane in cellule tumorali proprio grazie all'effetto anti-ossidante. Il sistema Trx/TrxR è però anche coinvolto nel processo di tumorigenesi e di progressione tumorale. Alti livelli di Trx e TrxR sono stati ritrovati in molti tipi di tumori, sia solidi che leucemie e linfomi (BERGGREN M. ET AL., 1996) e sono correlati in modo diretto sia con la resistenza verso l'apoptosi che con la cattiva prognosi di alcuni tipi di tumori (KAIMUL ET AL., 2007).

Vari studi indicano che questo sistema possa avere funzioni diverse nelle cellule cancerose a seconda dello stadio di sviluppo del tumore. Nei primissimi stadi la Trx può, infatti, essere di beneficio per la prevenzione del cancro grazie alla sua capacità di fronteggiare lo stress ossidativo causato dalla carcinogenesi. Una volta però che il fenotipo di una cellula normale passa a quello tumorale, questo sistema diventa una protezione per il tumore stesso perché, oltre a fronteggiare lo stress ossidativo, impedendo che i livelli di ROS diventino letali, induce da una parte l'attivazione di fattori di crescita e di proteine anti-apoptotiche e dall'altra l'inibizione di quelle pro-apoptotiche. Trx è in grado di formare un complesso ad azione inibitoria con ASK-1 (Apoptosis Signal Regulated Kinase 1) normalmente coinvolta nell'induzione dell'apoptosi. L'eventuale aumento dei livelli di ROS, in seguito per esempio alla stimolazione del recettore del fattore di necrosi tumorale (TNF-R), provocano la dissociazione del complesso ASK1/Trx, la successiva attivazione di ASK1 e l'induzione di apoptosi (SAITOH ET AL., 1998; GOTOH Y AND COOPER JA, 1998).

In uno stato più avanzato del tumore, il sistema Trx/TrxR, stimola l'angiogenesi mediante l'induzione della produzione di VEGF e incrementa l'invasività del tumore mediante la regolazione dell'attività di varie metalloproteasi della matrice. Molti tipi di tumori che esprimono elevati livelli del sistema Trx/TrxR sono risultati resistenti all'azione di chemioterapici classici quali il cisplatino, la mitomicina C, la doxorubicina e l'etoposide perché induce la formazione di addotti che ne riducono l'efficacia (YOKOMIZO ET AL., 1995; YAMADA M. et al., 1996; FARINA AR et al., 2001; WELSH S. ET AL., 2002).

Lo sviluppo di farmaci in grado di interferire con il sistema Trx/TrxR potrebbe rendere le cellule tumorali sensibili all'apoptosi e contribuire a prevenire o a invertire i meccanismi che portano alla resistenza chemioterapica.

### **1.3 La Chemioterapia**

Nonostante i meccanismi di formazione e diffusione del tumore non siano stati ancora del tutto chiariti, le tipologie di trattamento attualmente utilizzate in ambito terapeutico sono varie: asportazione chirurgica, radioterapia, chemioterapia, ormone-terapia e immunoterapia. Ognuno di questi trattamenti presenta vantaggi e svantaggi che possono essere modulati in base al tipo di tumore da trattare e grazie alla possibilità di poterli combinare insieme. La chemioterapia è uno dei più importanti protocolli terapeutici utilizzati; la sua applicazione svolge un ruolo cruciale sia nelle fasi iniziali del tumore, per evitare un'operazione chirurgica o per ridurre la massa prima di asportarla (chirurgia conservativa), sia nelle fasi finali, dopo un'eventuale asportazione, per scongiurare possibili recidive, migliorando sensibilmente la prognosi del paziente. Lo scopo della chemioterapia è quello di uccidere le cellule tumorali sfruttando il principio che questo tipo di cellule sono più suscettibili all'azione del farmaco a causa della loro più rapida crescita rispetto alle cellule sane. Alla base di questa terapia c'è l'idea di creare un compromesso tra interrompere la proliferazione delle cellule tumorali

e influire il meno possibile sulle cellule sane caratterizzate da normali processi proliferativi (es. le cellule del sistema immunitario).

La chemioterapia rimane comunque ancora lontana dall'essere soddisfacente soprattutto a causa della sua limitata efficacia su alcune tipologie tumorali e poi anche perché coinvolge processi invasivi per il paziente, come l'inserimento di un catetere per permettere la somministrazione continua e ripetuta del farmaco e per gli effetti collaterali nei quali il paziente può incorrere. Per quanto i protocolli terapeutici siano stati ottimizzati, vista l'entità delle dosi di farmaco somministrate, a lungo andare gli effetti collaterali saranno comunque presenti e, in alcuni casi, così forti da portare il paziente a interrompere la terapia. Tra gli effetti collaterali mediamente riscontrati nei pazienti ci sono: alopecia, nausea, mielosoppressione, vomito e perdita o riduzione della fertilità (Fig.5). Questi sono gli effetti collaterali più comuni che ovviamente dipendono anche dall'età del paziente e dalle dosi di chemioterapici somministrati nel tipo di trattamento. (FENG S.S. AND CHINE S., 2003).

<b>Comuni effetti collaterali dati da agenti chemioterapici</b>		
	<b>Manifestazioni</b>	<b>Agenti che causano tossicità</b>
Reticoloendoteliali	Neutropenia Anemia Trombocitopenia	Agenti alchilanti, antracicline Inibitori della topoisomerasi
Gastrointestinali	Diarrea Mucositi orali Nausea e vomito	Antifolati, fluoropirimidine
Neurologici	Neuropatia sensoriale periferica Ototossicità	Alcaloidi della Vinca, tassani Cisplatino, oxaliplatino
Renali	Insufficienza renale acuta	Cisplatino
Epatici	Livelli alterati delle transaminasi	Raltitrexed
Cardiaci	Cardiomiopatia cronica o acuta Eventi di ischemia cardiaca	Antracicline Fluoropirimidine
Respiratori	Fibrosi polmonare	Bleomicina
Vescica	Cistiti emorragiche	Ciclofosfamide
Altri	Vesciche Alopecia Affaticamento Letargia Riduzione della fertilità/Infertilità	Doxorubicina, Vincristina

Fig. 5 - Comuni effetti collaterali dati dai farmaci chemioterapici

### 1.3.1 Farmaci chemioterapici: il cis-platino

In chemioterapia, tra i farmaci ampiamente utilizzati, ci sono le molecole complessate a metalli. Il cis-diammino-dicloroplatino (II) ( $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$ ) o più comunemente chiamato cisplatino è il composto leader di questo gruppo nella terapia del cancro (RABIK C.A. AND DOLAN M.E., 2007).

Il cisplatino venne sintetizzato per la prima volta nel 1844 da un medico italiano, Michele Peyrone, ma il riconoscimento delle sue proprietà antitumorali avvenne molto tempo dopo. Il suo utilizzo come chemioterapico si deve all'inaspettata scoperta di Barnett Rosenberg che, negli anni '60, studiando gli effetti del campo elettrico sulla crescita di *Escherichia coli*, notò che tali microrganismi continuavano a replicarsi ma non riuscivano a dividersi, dando origine ad una crescita filamentosa. Successivi esperimenti, atti a valutare quale variabile influisse in tale processo, portarono alla conclusione che il platino che costituiva gli elettrodi utilizzati per applicare il campo elettrico, portava alla formazione di vari composti a base di platino nel brodo di coltura batterica. Tra le varie specie presenti, quella che si dimostrò attiva a concentrazioni sub-tossiche nei confronti della divisione batterica risultò essere proprio il complesso diammino-dicloroplatino (II) nella sua forma *cis* (cisplatino), mentre le specie *trans* risultarono biologicamente inattive (ROSENBERG B ET AL., 1969). Vista l'azione del cisplatino sulla crescita batterica si iniziò a ipotizzare e a effettuare esperimenti per dimostrare una sua possibile efficacia anche sulle cellule eucariotiche, allo scopo di utilizzarlo come antitumorale (HANNON MJ, 2007). I risultati promettenti che si ottennero da tali studi, portarono alla successiva approvazione del cisplatino in ambito clinico da parte della Food and Drug Administration (FDA) nel 1978.



Il cisplatino (Fig.6) è costituito a livello centrale da un atomo di platino (II) coordinato con due gruppi amminici e due gruppi cloruro in conformazione *cis*.

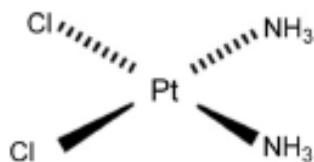


Fig. 6 - Struttura molecolare del cisplatino

Il grande successo del cisplatino, in ambito clinico, ha spinto i ricercatori a produrre suoi derivati come il carboplatino e l' oxaliplatino (Fig.7) correntemente usati nella metà dei protocolli chemioterapici e a sviluppare possibili futuri analoghi per migliorare l'efficacia della terapia e ridurre gli effetti collaterali (PEREZ J.M. ET AL., 2000; MARZO T. ET AL., 2015).

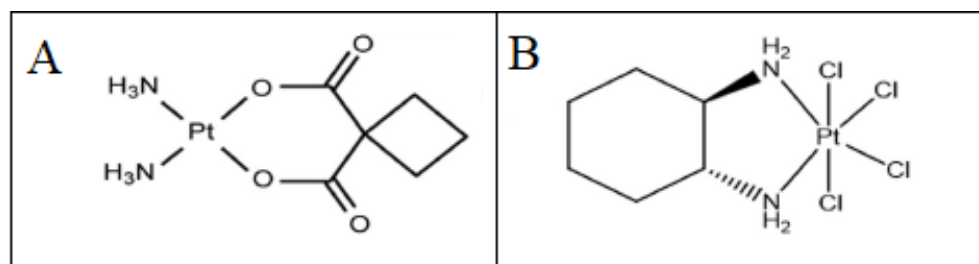


Fig. 7 – Struttura molecolare dei chemioterapici derivati del cisplatino A) Carbaplatino; B) Oxaliplatino.

### 1.3.2 Meccanismo d'azione ed effetti collaterali del cisplatino

Il meccanismo cellulare di uptake ed efflusso del cisplatino non è ancora del tutto chiarito. Le ricerche suggeriscono che il cisplatino entri per diffusione passiva all'interno della cellula e che non abbia bisogno di un optimum di pH (BLINKS S.P. AND DOBROTA M., 1990). Recentemente però è stato ipotizzato un meccanismo di diffusione facilitata ad opera di specifiche proteine trasportatrici dette CTR1 (calcitonine receptor-like 1) e CTR2 (calcitonine receptor-like 2). Ishida e collaboratori infatti dimostrarono che il silenziamento dei geni che codificano per CTR1 e

CTR2 determinava diminuzione del suo accumulo intracellulare e un aumento della resistenza al cisplatino in una linea cellulare embrionale di topo knockout per mCTR1 (ISHIDA ET AL., 2002; BODIGA ET AL. 2018).

Il cisplatino, somministrato per via endovenosa, viene trasportato ai vari tessuti attraverso il circolo sanguigno. L'elevata concentrazione di ioni cloruro nel sangue (circa 100 mM) stabilizza il complesso, prevenendo reazioni di solvolisi, e favorisce la penetrazione intracellulare mediante diffusione passiva (BLINKS S.P. AND DOBROTA M., 1990). Una volta all'interno dell'ambiente acquoso della cellula, dove la concentrazione di cloruro è piuttosto bassa (circa 4 mM), il cisplatino tende a idratarsi e a rilasciare uno o due ioni cloruro. L'idratazione porta alla formazione prima del  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH})_2]^+$  e successivamente del  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH})_2]^{2+}$ . In queste forme, il cisplatino, diventa altamente reattivo per il suo più importante target cellulare, il DNA, al quale si lega mediante formazione di legami covalenti con l'azoto delle basi puriniche (Fig.8). Questi legami intra-filamento, prevalentemente, e inter-filamento provocano delle importanti distorsioni nella geometria del DNA, ripiegano l'elica della molecola deformandone in maniera significativa la conformazione spaziale. La presenza dell'addotto DNA-cisplatino impedisce la separazione della doppia elica di DNA e di fatto impedisce alla DNA polimerasi di agire e di duplicare il DNA, arrestando il ciclo cellulare. Dato che le cellule tumorali hanno la caratteristica di riprodursi molto più velocemente rispetto a quelle sane è evidente che risentono molto di più della presenza degli addotti cisplatino-DNA rispetto quelle normali. Allo stesso modo anche la trascrizione è bloccata e di conseguenza la sintesi di proteine che possono essere fondamentali per il corretto funzionamento della cellula (FUERTES M.A. ET AL., 2003; CHANEY S.G. ET AL., 2005; WANG D. AND LIPPARD S.J., 2005). Il danno al DNA causato dal cisplatino influisce anche sulla funzionalità della cellula, modulando diverse vie di segnalazione come quella PI3K-PKB/AKT. Il cisplatino induce l'ubiquitinazione dell'AKT, inibendo la sua funzione e spingendo quindi la cellula verso la morte cellulare programmata (ASSELIN E. ET AL., 2001; ELOY L. ET AL., 2012).

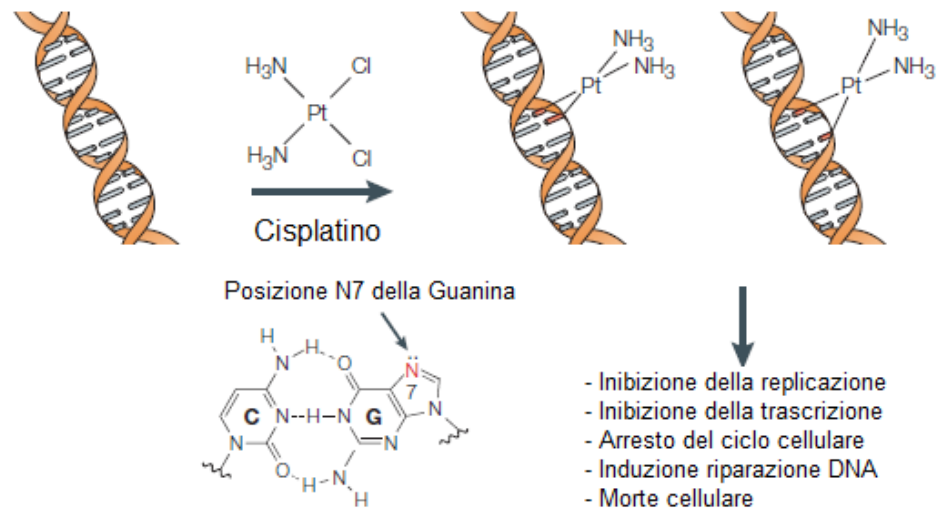


Fig. 8 - Formazione degli addotti cisplatino-DNA. L'atomo di platino lega covalentemente l'azoto in posizione 7 della guanina formando legami 1,2- o 1,3- sia intra-filamento che inter-filamenti. L'addotto del cisplatino può causare varie risposte cellulari come per esempio l'inibizione della replicazione e della trascrizione, l'arresto del ciclo cellulare, l'induzione della riparazione del DNA e l'apoptosi.

Solo l'1% del cisplatino che entra all'interno della cellula interagisce con il DNA, la restante parte prende interazione con altri substrati come i gruppi nucleofili presenti nel RNA, i gruppi sulfidrilici e amminici delle proteine o con altre macromolecole di importanza biologica cruciale. Il legame del cisplatino con gli atomi di zolfo o di azoto delle proteine può portare all'alterazione degli enzimi mitocondriali, dei sistemi di trasporto transmembrana o dei processi alla base dell'assemblaggio del citoscheletro (LOMELI N ET AL., 2017)

Nonostante l'efficacia che il cisplatino dimostra nei confronti delle cellule tumorali, questo farmaco inevitabilmente porta con sé pesanti effetti collaterali, in quanto è neurotossico (tende a localizzarsi a livello del ganglio dorsale provocando neuropatie sensoriali), nefrotossico (danneggia principalmente la porzione terminale del tubulo prossimale e quello distale), ototossico (danneggia le cellule ciliate cocleari esterne) e induttore di mielosoppressione (causa neutropenia e trombocitopenia) (DASARI S. AND TCHOUNWOU P.B., 2014).

Il cisplatino, inclusi i suoi derivati come carbaplatino e oxaliplatino, viene comunque utilizzato per i protocolli chemioterapici di

un ampio spettro di tumori: al polmone, al seno, ovarico, al testicolo, al cervello, alla cervice, alla prostata, al collo, alla vescica e linfoma di non-Hodgkin (TSIMBERIDOU A.M., 2009).

### 1.3.3 Farmaco-resistenza al cisplatino

L'instaurarsi nel tempo di una farmaco-resistenza da parte del tumore nei confronti del cisplatino è causata da una combinazione di vari processi che in maniera sinergica diminuiscono l'efficacia della terapia:

- Diminuzione dell'afflusso/incremento dell'efflusso del farmaco: che portano ad una diminuzione della quantità di cisplatino intracellulare. In cellule di carcinoma ovarico cisplatino-resistenti, la scarsa concentrazione del farmaco a livello del citosol, sembra essere collegata a variazioni del potenziale di membrana che causano la diminuzione dell'afflusso. Infatti, molecole come l'ouabaina che inibiscono la sodio/potassio ATPasi, bloccano anche l'entrata del cisplatino all'interno della cellula (ANDREWS P.A. ET AL., 1988). L'efflusso di farmaco, nella maggior parte dei casi, sembra essere mediato dalla proteina di resistenza multifarmaco1 (MDR1) detta anche P glicoproteina 1, una glicoproteina di membrana ATP-dipendente, con funzione di pompa, la cui attività sembra essere quella di estrarre dal citoplasma molecole anfipatiche neutre o debolmente basiche penetrate all'interno della cellula. A conferma, linee cellulari di melanoma cisplatino resistenti mostrano un'over-espressione dell'MDR1 rispetto a quelle cisplatino sensibili (LIEDERT B. ET AL., 2003). Sia il diminuito afflusso che l'aumentato efflusso di cisplatino, rappresentano il maggior meccanismo di farmaco-resistenza, portando a una riduzione del cisplatino intracellulare anche del 70% (RABIK C.A. AND DOLAN M.E., 2007).
- Meccanismi di riparazione del DNA: gli addotti che il cisplatino crea col DNA creano delle distorsioni lungo la catena nucleotidica che vengono riconosciute dal NER (nucleotide excision repair), il sistema di riparazione di nucleotidi. Pur non

essendo sempre efficace (dipende dall'estensione del danno), se over-espresso, il NER ripara il danno e porta le cellule tumorali a divenire cisplatino-resistenti come osservato in linee cellulari di tumore ovarico (DABHOLKAR M. ET AL., 1994).

- Formazione di addotti cisplatino/glutazione e cisplatino/tioredoxina: nel citoplasma il cisplatino, una volta che ha rilasciato il cloro e passato nella sua forma più reattiva è in grado di reagire con alcune molecole come la Trx, già descritto in precedenza, e il glutazione (GSH), formando degli addotti che lo inattivano e diminuendo, di fatto, la biodisponibilità del farmaco. In alcuni studi è risultato che l'aumento di addotto cisplatino-GSH sia correlato con un aumento della resistenza delle cellule nei confronti di questo farmaco. Per esempio è stato visto che in linee cellulari di cancro alla vescica cisplatino-resistenti, il trattamento con farmaci in grado di ridurre i livelli di GSH cellulari, induce un aumento della tossicità del cisplatino (BYUN S.S. ET AL., 2005).

L'instaurarsi nel tempo della farmaco-resistenza al cisplatino da parte del tumore costituisce uno dei punti deboli di questa terapia. Questo ha spinto la ricerca a trovare strategie alternative, per bypassare questo problema, come ad esempio l'utilizzo dei metallo-carbeni eterociclici (Me-NHC) dei quali verrà discusso in seguito.

#### 1.3.4 Farmaci chemioterapici: la doxorubicina (DOXO)

La doxorubicina (DOXO) è uno dei più potenti e comunemente usati farmaci chemioterapici. E' un antibiotico appartenente alla famiglia delle antracicline (come la daunorubicina, l'epirubicina e la idarubicina), approvato nel 1974 dalla Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento di varie neoplasie: la leucemia linfoblastica acuta, la leucemia mieloide acuta, il tumore di Wilms, il neuroblastoma, il sarcoma osseo e dei tessuti molli, il tumore al seno, il tumore alle ovaie, il carcinoma vescicale, il carcinoma tiroideo, il carcinoma gastrico, il

linfoma di Hodgkin e il tumore del polmone (CARVALHO C. ET AL., 2009).

La DOXO è stata isolata per la prima volta nel 1969 dallo *Streptomyces peucitiou* var. *caesius* (ARCAMONE F. ET AL., 1969) ed è una molecola anfifilica che comprende un gruppo glicosidico idrofobo, e un gruppo amminosaccaridico basico, riducente e idrofilo. La frazione agliconica è costituita da un anello tetra ciclico con adiacente gruppi chinone-idrochinone, un sostituito metossico e una piccola catena costituita da un gruppo carbonilico. Lo zucchero, chiamato daunosamina, è unito mediante un legame glicosidico a uno degli anelli ed è costituito da un gruppo 3-ammino-2,3,6-trideossi-L-fucosilico. La catena laterale della DOXO termina con un alcool primario (Fig.9). La forma solubile della DOXO è il suo sale idrocloruro (DOXO HCl) che si presenta come una polvere igroscopica, cristallina e dal colore arancio-rossastro (BOUMA J. ET AL., 1986).

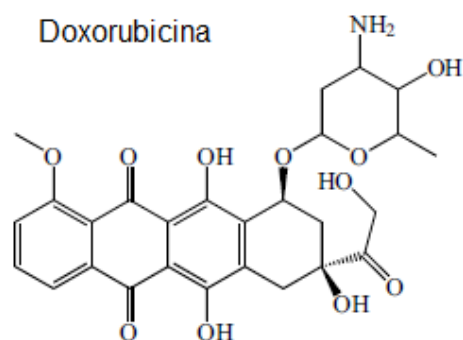


Fig. 9 - Struttura chimica della doxorubicina (DOXO).

Un'ulteriore caratteristica che l'ha resa molto utile per studiarne la localizzazione a livello cellulare è la sua intrinseca capacità di essere fluorescente ( $\lambda$  emissione 560-593 nm) in quanto costituita da un cromoforo tetraciclico fluorescente (doxorubicinone o adriamicinone) legato a un amminozucchero carico positivamente (daunosamina) (KARUKSTIS K.K. ET AL., 1998).

### 1.3.5 Meccanismo d'azione ed effetti collaterali della DOXO

La DOXO entra all'interno delle cellule cancerose per diffusione passiva e agisce attraverso vari meccanismi d'azione, il principale dei quali prevede l'interazione con il DNA. Una volta all'interno del citoplasma, la DOXO si lega con alta affinità alla subunità 20S del proteosoma e tale complesso DOXO-proteosoma trasloca all'interno del nucleo, attraverso i pori nucleari, con un processo ATP-dipendente. All'interno del nucleo la DOXO si dissocia dal proteosoma, lega il DNA a causa di una sua maggior affinità per quest'ultimo (CARVALHO C. ET AL., 2009), intercalandosi tra le basi azotate nella doppia elica e formando degli addotti DNA-DOXO. Può, inoltre, legarsi covalentemente e inibire le proteine coinvolte nella replicazione e trascrizione del DNA, bloccando di conseguenza i processi da loro controllati. Il danno indotto al DNA dall'interazione con la DOXO determina l'attivazione della proteina oncosoppressore p53 che promuove l'apoptosi (FRANCO YL ET AL., 2018).

Un'ulteriore importante azione della DOXO consiste nell'inibizione dell'attività della Topoisomerasi II (TopoII), l'enzima che diminuisce il superavvolgimento del DNA in base alle fasi del ciclo cellulare e all'attività trascrizionale. L'inibizione di questo enzima porta a un'alterazione nei processi di replicazione, trascrizione e riparazione del DNA che causano il blocco del ciclo cellulare e morte cellulare (YANG F. ET AL., 2014; CAGEL M. ET AL., 2017).

Ulteriore bersaglio della DOXO è l'enzima Poli ADP-ribosio polimerasi (PARP)-1 del quale determina una iper-attivazione. La PARP-1 è un membro di una famiglia di enzimi nucleari che hanno il ruolo fondamentale di individuare e segnalare le rotture a singolo filamento del DNA (SSB) all'apparato enzimatico coinvolto nella riparazione degli SSB. La PARP, se iperattivata, può, nel tentativo di riparare il DNA danneggiato, esaurire le scorte energetiche della cellula portando quest'ultima a morte per autofagia (TACAR O ET AL., 2013).

Il DNA e le proteine ad esso funzionalmente associate non sono l'unico bersaglio dell'azione della DOXO. Non tutta la DOXO che entra all'interno della cellula si associa al proteosoma e migra nel nucleo, ma in parte rimane all'interno del citoplasma dove può subire delle modifiche strutturali. Il chinone presente nella sua struttura partecipa alle reazioni di ossido-riduzione come accettore di elettroni, divenendo così substrato di vari enzimi come la NADH deidrogenasi mitocondriale, la NAD(P)H deidrogenasi citosolica, la xantina ossidasi e la ossido-nitrico sintasi endoteliale che lo trasformano in un semichinone radicalico. Questo metabolita instabile può arrecare seri danni al DNA o può produrre ROS come superossidi, radicali idrossilici o perossidi. In contemporanea, i ROS possono causare stress ossidativo, perossidazione lipidica, danni alla membrana e al DNA, innescando il processo di apoptosi (THORN C.F. ET AL., 2011).

La DOXO entra anche all'interno dei mitocondri e si intercala nel DNA mitocondriale causando danni e stress energetico. Come conseguenza, il mitocondrio rilascia il citocromo c che, attivando la cascata delle caspasi, promuove la morte della cellula per apoptosi (Fig.10) (FRANCO ET AL., 2018).



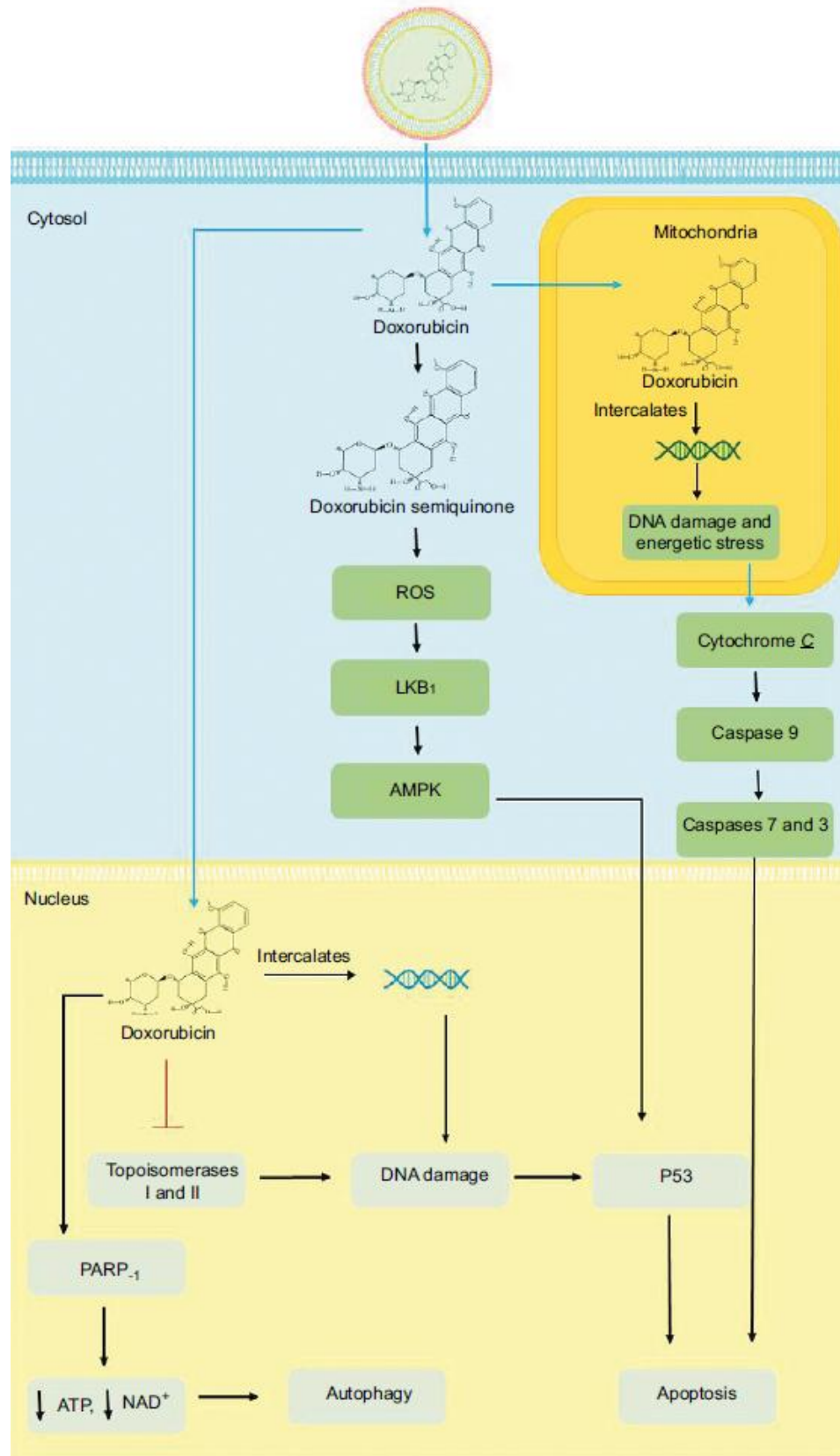


Fig. 10 – Meccanismo d’azione della DOXO a livello cellulare (FRANCO ET AL., 2018).

Purtroppo, l'uso clinico della DOXO è limitato da una serie di problemi legati soprattutto alla citotossicità, dose-dipendente, della molecola nei confronti dei tessuti sani. La DOXO induce soprattutto cardiotossicità che si esplica principalmente sotto forma di aritmie acute o miocarditi (DOROSHOW J.H., 1991). Il trattamento a lungo termine può portare un danno anche ad altri organi come cervello, reni e fegato e ad altri effetti indesiderati associati al trattamento come: alopecia, stomatiti, nausea, mielosoppressione (KLUZA J. ET AL., 2004; CARVALHO C. ET AL., 2009).

### 1.3.6 Farmaco-resistenza alla DOXO

Oltre ai vari effetti indesiderati, un altro limite all'utilizzo della DOXO è l'instaurarsi nelle cellule tumorali della farmaco-resistenza. Così come i meccanismi d'azione della DOXO sono molteplici anche la resistenza alla DOXO è un fenomeno multifattoriale (CAPELÔA T ET AL., 2019). I principali meccanismi che conferiscono farmaco resistenza sono:

- MDR 1 (multi drug resistance): così come già descritto per la resistenza al cisplatino, nella membrana plasmatica di cellule resistenti alla DOXO si trova la proteina MDR1, che provoca l'efflusso della DOXO riducendone l'accumulo citoplasmatico e quindi la sua azione citotossica (NIELSEN D ET AL., 1994).
- Riparazione del DNA: cellule tumorali che possiedono un efficiente sistema di riparazione del DNA, rappresentato essenzialmente dal NER, possono manifestare resistenza alla DOXO (SPENCER DM ET AL., 2008).
- Alterata attività della Topo II: tumori in cui vi sono mutazioni e/o alterata espressione della Topo II sviluppano una maggiore resistenza alla DOXO (BURGESS DJ ET AL., 2008).
- Grado di staminalità del tumore: la DOXO induce in alcuni tipi di tumori l'aumento del numero di cellule tumorali staminali che notoriamente hanno una maggiore capacità proliferativa rispetto a quelle maggiormente differenziate e sono capaci di promuovere la

progressione del tumore verso un fenotipo più aggressivo (LEVINA V ET AL., 2008).

#### **1.4 Approcci chemioterapici alternativi**

Negli ultimi 50 anni la chemioterapia ha rivoluzionato totalmente i protocolli terapeutici applicati, portando nel corso degli anni a un aumento della sopravvivenza del paziente. La ricerca in ambito chemioterapico ha da sempre provato a sviluppare nuovi farmaci anti-tumorali, alternativi a quelli classicamente usati, a causa della loro tossicità e dell'instaurarsi della chemioresistenza. Al momento, i campi di ricerca più avanzati al riguardo includono lo sviluppo di nuovi farmaci a base metallica sostitutivi del cis-platino e la generazione di nanocarrier da usare come Drug Delivery System (DDS) per il trasporto di chemioterapici all'interno dei tumori, in modo da aumentarne l'efficacia e ridurre gli effetti tossici (BRANNON-PEPPAS L. AND BLANCHETTE J.O., 2004; CORRIE P.G., 2007). In questa tesi verranno discussi due progetti correlati a questi argomenti. Uno riguarda la sintesi e la caratterizzazione chimica e biologica di un nuovo composto a base metallica, legante argento e l'altro è la realizzazione e caratterizzazione di un sistema di DDS basato su nanoparticelle leganti DOXO.

## **2. PROGETTO I: Sintesi, caratterizzazione ed effetti biologici di un nuovo complesso metallico fluorescente a base d'argento ( $[Ag(E IA)_2]Cl$ ), con proprietà anti-tumorali**

### **2.1 Composti metallici a base d'argento**

L'utilizzo di composti a base di metalli in ambito medico risale al XVI secolo, periodo a cui fanno riferimento documenti che testimoniano il ricorso a tali mezzi per il trattamento del cancro. Attualmente molti metalli trovano utilizzo in medicina: il platino come agente anti-tumorale, l'oro in grado di fermare la degenerazione dell'artrite reumatoide, il bismuto nel trattamento dell'ulcera, l'antimonio come anti-protozoico, il vanadio per il diabete, il ferro come antimalarico e l'argento come antimicrobico. Il metallo che ha dato il via all'utilizzo e allo sviluppo di farmaci a base metallica ad azione antitumorale è stato il platino, le cui proprietà sono state precedentemente descritte. Le attuali limitazioni nell'applicazione del cisplatino in chemioterapia hanno spinto i ricercatori a sviluppare nuove tipologie di farmaci, partendo sempre da molecole leganti un metallo. Un vasto numero di metalli di transizione si sono rivelati essere possibili candidati come nuovi chemioterapici, sebbene nessuno di questi sia ancora stato approvato per i protocolli terapeutici. Complessi a base di rutenio (es. KP1019), di titanio (es. dicloruro di titanocene) e gallio (es. nitrato di gallio) sono, comunque, già in fase clinica di studio (GAUTIER A. AND CISNETTI F., 2012; LIU W. AND GUST R., 2013).

L'argento era già conosciuto nel 4000 a.C ed è stato il metallo più utilizzato nell'antichità dopo l'oro e il rame. Nel corso di questi millenni l'argento ha avuto varie applicazioni nel campo della medicina, prevalentemente per uso topico. Grazie alla sua dimostrata attività antibatterica veniva usato per disinfettare ferite, per trattare le infezioni da ustioni, per trattare strumenti medicali, ecc. (LANSDOWN ABG, 2010). L'argento è un metallo nobile, di per sé sostanzialmente inerte e la sua

attività antibatterica è dovuta al rilascio di ioni d'argento,  $\text{Ag}^+$ , biologicamente attivi. Sali d'argento, come per esempio il nitrato d'argento, alogenuri o solfuri d'argento, sono stati e sono ancora utilizzati come antibatterici proprio perché generano concentrazioni locali di ioni  $\text{Ag}^+$  capaci di uccidere tali microorganismi. Gli ioni  $\text{Ag}^+$  rilasciati da questi composti, penetrano all'interno della cellula attraverso la membrana plasmatica e una volta dentro al citoplasma agiscono con un meccanismo di azione multiplo che comprende: danno alle proteine di membrana, possibile produzione di ROS, danno a livello di RNA e DNA, interazione con proteine intracellulari e alterazione di processi enzimatici, compresa la respirazione cellulare (MELAIYE A. AND YOUNGS W.J., 2005)

Studi più recenti hanno attribuito all'argento una discreta azione anti-neoplastica (PATRA M. ET AL., 2012) e queste indicazioni hanno aperto a nuove ricerche dedicate allo sviluppo di complessi metallici a base di argento da utilizzare come molecole anti tumorali (RAY S. ET AL., 2007). L'utilizzo dei sali d'argento ha però degli svantaggi che potrebbero limitare la loro efficacia nell'uso clinico, in quanto, sono altamente solubili nel siero, tendendo a dissociarsi con successiva precipitazione degli ioni  $\text{Ag}^+$  sottoforma di cloruro di argento ( $\text{AgCl}$ ). In altri casi la riduzione dell'efficacia dell'argento si deve al rilascio eccessivamente rapido degli ioni  $\text{Ag}^+$ , come nel caso dell'argento sulfadiazina, un antibiotico sulfonamidico ad ampio spettro, prodotto nel 1968, molto utilizzato per uso topico, con aggiuntive proprietà antivirali e antifungine (CARR HS ET AL., 1973; TOKUMARU T. ET AL, 1974).

Per cercare di ottenere composti a base d'argento più stabili e che consentano un rilascio più lento degli ioni  $\text{Ag}^+$ , molte ricerche si sono orientate allo sviluppo di composti organometallici, ovvero composti che contengano almeno un legame tra un atomo di carbonio e un metallo. I complessi a base di fosforo sono stati i primi a essere stati utilizzati come leganti. Tra questi i più comunemente usati sono le fosfine. (BERNERS-PRICE S.J. AND SADLER PJ, 1985). La presenza di una coppia elettronica non condivisa, rende le fosfine disponibili per la formazione di nuovi

legami di tipo dativo con composti quali i metalli. Il legame tra la fosfina e il metallo avviene sulla base di una  $\sigma$ -donazione di densità elettronica dal doppietto non condiviso dell'atomo di fosforo a un orbitale vuoto del centro metallico. Tale legame può essere rinforzato sinergicamente dalla retro-donazione  $\pi$  metallo-legante. Tra i vari tipi di fosfine, le difosfine, la cui struttura molecolare comprende due atomi di fosforo che possono chelare uno stesso metallo oppure mettersi a ponte tra due metalli diversi, sono di per sé citotossiche e la loro combinazione con l' $\text{Ag}^+$  ha dimostrato possedere sia un'azione antimicrobica che antitumorale (BERNERS-PRICE S.J. ET AL., 1988).

L'uso delle fosfine come leganti metalli però presenta delle limitazioni a causa dell'instabilità di questi complessi che portano al rilascio troppo rapido dell'argento. Negli anni si è cercato quindi di sviluppare molecole più stabili delle difosfine e i carbeni N-eterociclici (NHC), si sono imposti all'attenzione generale come una classe di leganti alternativi o complementari a quelli più classicamente usati come le fosfine.

### 2.1.1 NHC e loro caratteristiche

Gli NHC sono una classe di composti sintetizzati per la prima volta nel 1964 a partire da sali di imidazolo e già ampiamente usati per processi catalitici in ambito chimico (HERRMANN W. A. AND KÖCHER C., 1997; ŞEYMA Y. ET AL., 2018). Gli NHC sono delle specie eterocicliche che contengono un carbene e almeno un atomo di azoto all'interno della struttura ad anello (Fig.11).

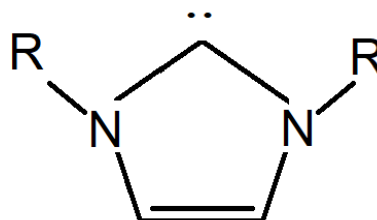


Fig. 11 – Struttura chimica di un NHC generico.

Gli NHC si possono suddividere in tre classi: coordinati a metalli di transizione, coordinati a elementi del blocco P (es. alogeni) e organo-catalizzatori (Fig.12).

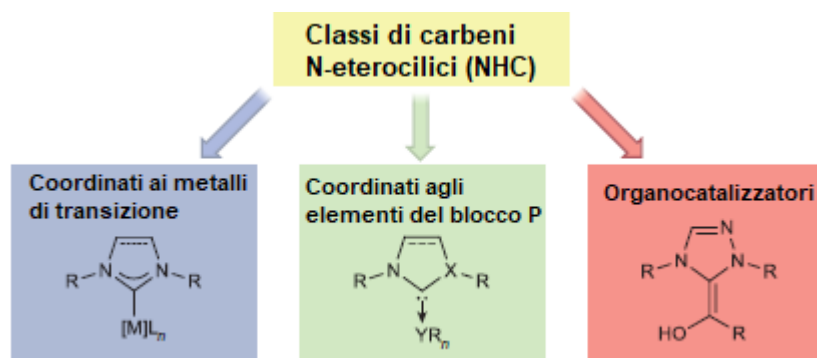


Fig. 12 – I principali NHC suddivisi per classi. Nelle prime due gli NHC coordinati a metalli o a elementi del blocco P mentre nella terza è illustrata la classe degli NHC come organo-catalizzatori.

Le principali applicazioni degli NHC sono quelle dove sono legati a metalli di transizione (metallo-carbeni-N-eterociclici, Me-NHC) (Fig.13). La capacità degli NHC di legare un metallo è data dalla presenza di sostituenti  $\pi$ -donatori che li rende degli ottimi  $\sigma$ -donatori capaci di formare un doppio legame tra un atomo di carbonio caratterizzato da geometria trigonale planare e il metallo stesso. Queste peculiarità chimico-fisiche li rendono simili alle fosfine ma differiscono da quest'ultime per vari aspetti tra cui: maggior stabilità termodinamica del legame col metallo, buona stabilità all'ossidazione, maggiore versatilità e maggiore manipolabilità (HOPKINSON M.N. ET AL., 2014). Tutte queste caratteristiche rendono gli Me-NHC degli ottimi candidati per il drug-design e il loro utilizzo in ambito terapeutico.

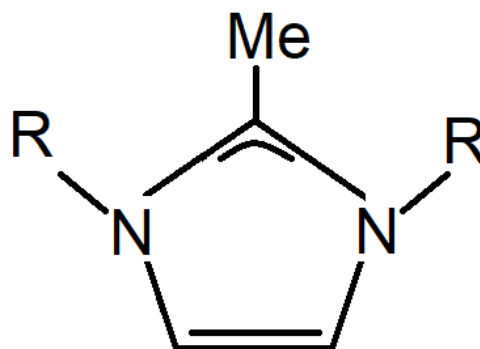


Fig. 13 – Struttura chimica di un Me-NHC generico.

La sintesi dei Me-NHC ha portato a un forte sviluppo applicativo di questi composti sia in ambito chimico, come per la catalisi delle olefine, che in ambito biologico, per la produzione di metallo-farmaceutici (Fig.14).

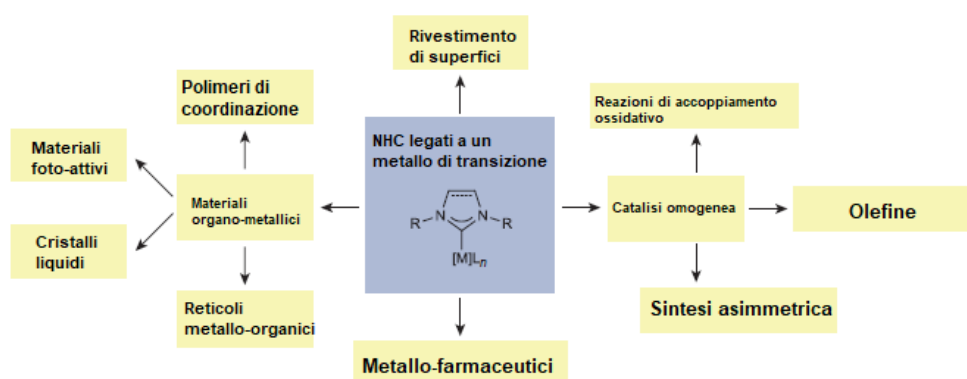


Fig. 14 – I maggiori campi di applicazione degli NHC coordinati a metalli di transizione.

In ambito chemioterapico, un elevato numero di metalli hanno mostrato citotossicità, nei confronti delle cellule tumorali, se legati agli NHC tra i quali: palladio (Pd), rame (Cu), oro (Au) e argento (Ag) (Fig.15). Ognuno di essi mostra un differente meccanismo di azione, ad esempio il Pd-NHC segue un pathway simile a quello del cisplatino, descritto precedentemente, l’Au-NHC induce la permeabilizzazione della membrana mitocondriale innescando l’apoptosi mentre il Cu-NHC induce apoptosi mediante produzione di ROS metallo-mediata (Reazione di Fenton) (MERCUS L. AND ALBRECHT M., 2010).



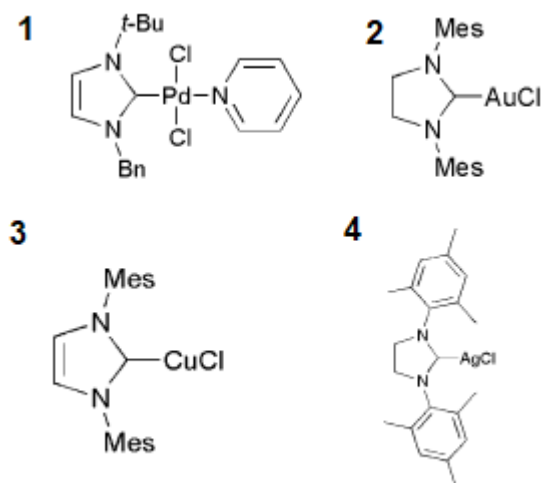


Fig. 15 – Esempi di complessi Me-NHC testati per le loro proprietà anti-tumorali: 1) Pd(II)-bis-NHC; 2) Au(I)-NHC; 3) Cu(I)-NHC; 4) Ag(I)-NHC.

### 2.1.2 Gli NHC leganti l'argento (Ag-NHC): meccanismo d'azione e applicazioni terapeutiche

Il meccanismo d'azione degli NHC leganti l'argento (Ag-NHC), se comparato a quello dei chemioterapici comunemente usati, come ad esempio cisplatino e DOXO, non influisce direttamente sull'arresto del ciclo cellulare. Il loro target principale sembrano essere le seleno-proteine e in particolare le TrxR sia quella citosolica (TrxR1) che quella mitocondriale (TrxR2), con maggior efficacia su quest'ultima. Gli Ag-NHC inibirebbero queste seleno-proteine, solitamente over-espresse nelle cellule tumorali, alterando lo stato redox della cellula e destabilizzando la permeabilità della membrana mitocondriale interna. Questo indurrebbe la depolarizzazione della membrana mitocondriale, creando, per effetto indiretto, una sovrapproduzione di ROS e la traslocazione della caspasi 12 che porterebbe all'apoptosi (ELOY L ET AL., 2012; PELLEI M ET AL., 2012; CITTA A ET AL., 2013; LIU W AND GUST R, 2013).

Numerosi studi hanno comparato l'azione dei complessi Ag-NHC con quella del cisplatino, osservando una maggior efficacia dei Me-NHC su: tumore ovarico (sia *in vitro* su linea cellulare OVCAR-3 che *in vivo* su topi), tumore al seno (*in vitro* su linea cellulare MB157), tumore al polmone (*in vitro* su linea cellulare H460), carcinoma renale (*in vitro* su

linea cellulare ACHN), carcinoma del colon (*in vitro* su linea cellulare HT1376) e leucemia acuta promielocitica (*in vitro* su linea cellulare HL60). In tutti gli esperimenti gli Ag-NHC hanno ridotto la vitalità delle cellule tumorali anche di 40 volte rispetto al cisplatino rivelandosi così assai più efficaci. Test di vitalità condotti su linee cellulari cisplatino resistenti (linea cellulare di tumore al seno MCF-7R), hanno dimostrato che questi composti risultano 7 volte più citotossici rispetto al cisplatino (MEDVETZ D.A. ET AL., 2008; TEYSSOT M.L. ET AL., 2009; HINDI ET AL., 2009).

Nel 2013, Rigobello e collaboratori sintetizzarono e caratterizzarono un nuovo complesso di carbene a base d'argento, l'1-(antracen-9-ilmetil)-3-metilimidazol-2-ilidene cloruro d'argento, [Ag(MIA)]Cl (CITTA A ET AL., 2013), contenente il ligando fluorescente 1-(antracen-9-ilmetil)-3-metilimidazolio. Il composto [Ag(MIA)]Cl, in esperimenti *in vitro*, si dimostrò un efficace composto ad azione anti-tumorale e un potente inibitore del sistema Trx/TrxR.

## 2.2 Scopo

Lo scopo di questa prima parte della tesi è stato quello di sintetizzare, caratterizzare e valutare *in vitro* l'attività anti-tumorale di un nuovo complesso d'argento, il bis(1-(antracen-9-ilmetil)-3-etilimidazol-2-ilidene cloruro d'argento [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl, realizzato apportando delle modifiche strutturali all'1-(antracen-9-ilmetil)-3-metilimidazolo presente nel composto precedentemente sintetizzato da Rigobello e collaboratori. Tale modifica consisteva nella sostituzione del sostituente metil imidazolo con un gruppo etilico. La sintesi e la caratterizzazione chimica di [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl è stata realizzata in collaborazione con ricercatori del dipartimento di chimica dell'Università di Firenze.

L'azione biologica di [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl, è stata comparata con quella del composto d'argento sintetizzato da Rigobello, [Ag(MIA)]Cl, e con quella del noto agente anti-tumorale cisplatino. A tale scopo abbiamo utilizzato due linee cellulari tumorali umane: cellule di neuroblastoma

SH-SY5Y e cellule di adenocarcinoma mammario MDA-MB-231, entrambe sensibili all'azione del cisplatino ed esprimenti altri livelli del sistema Trx-TrxR (BRODEUR GM, 2003).

## 2.3 Materiali e metodi

### 2.3.1 Sintesi del cloruro di argento bis(1-(anthracen-9-ilmetil)-3-etilimidazol-2-ildiene) ([Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl)

La sintesi di [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl è un processo che inizia dalla molecola dell'antracene e prevede una serie di tappe, le principali rappresentate in Fig.16:

- Sintesi del composto (2): (antracene-9-carbaldeide). L'antracene (1) (12,7 mmol) and il clorobenzene sono stati aggiunti in una fiaschetta di Schlenk in atmosfera di azoto. La miscela è stata mescolata e riscaldata per 10 minuti a 80°C. Successivamente sono stati aggiunti ossicloruro di fosforo (POCl<sub>3</sub>) e di-metil-formammide (DMF) e la miscela è stata posta in riflusso per 2h. Dopo aver riportato la miscela a temperatura ambiente, è stata aggiunta una soluzione satura di sodio acetato che è stati poi concentrata sotto vuoto. La risultante polvere gialla è stata filtrata e lavata con HCl e metanolo. Resa 85%
- Sintesi del composto (3): 9-(idrossimetil) antracene. L'antracene-9-carbaldeide (11,1 mmol) è stata mescolato con etanolo e boroidruro di sodio (NaBH<sub>4</sub>) (11,1 mmol). La miscela è stata mescolata e riscaldata a 40°C per 2 ore. Dopo averla riportata a temperatura ambiente è stata aggiunta acqua e mescolata per ulteriori 10 minuti. La miscela è stata filtrata, ottenendo una polvere di colore giallo chiaro che è stata lavata con acqua e HCl (0,3 M) e poi disidratata O.N. Resa 88%.
- Sintesi del composto (4) :9-(clorometil) antracene. Il 9-(idrossimetil) antracene (1,82 mmol) è stato aggiunto a 10 mL di tetraidrofurano (THF) in atmosfera inerte. Successivamente è stato aggiunto a gocce e in continua agitazione il cloruro di tionile, (SOCl<sub>2</sub>), (2,3 mmol) e la miscela posta a riflusso per 5 ore. Dopo averla riportata a temperatura ambiente, la miscela è stata concentrata sotto vuoto fino

all'essiccazione. Resa: 85%.

- Sintesi del composto (5) :3-(antracen-9-ilmetil)-etil-1H-imidazol-3-ium-cloruro. Il composto 4 (0,9 mmol) è stato mescolato con etilimidazolo (25 mmol) per 24 ore a temperatura ambiente. Successivamente è stato aggiunto acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN) per indurre la precipitazione del composto come sale di cloro che poi è stato filtrato e lavato con etere. Resa: 75%.
- Sintesi di [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl: bis(1-(antracen-9-ilmetil)-3-etilimidazol-2-ildiene)). Il composto (5) è stato mescolato con l'ossido d'argento (I) (Ag<sub>2</sub>O) (0,17 mmol) in metanolo per 24 ore. In seguito, 20 mL di diclorometano sono stati aggiunti alla miscela che è stata successivamente passata attraverso un filtro di celite in modo da eliminare l'Ag<sub>2</sub>O che non ha reagito e l'AgCl formatosi durante la reazione. A seguire è stata effettuata una cristallizzazione sottovuoto a -20°C, aggiungendo l'esano. Nei quattro giorni successivi, il precipitato grigio-scuro che lentamente si andava formando, è stato quotidianamente filtrato. Infine, i cristalli appiattiti del complesso che si sono formati sono stati filtrati e lavati con esano. Resa finale 61%.

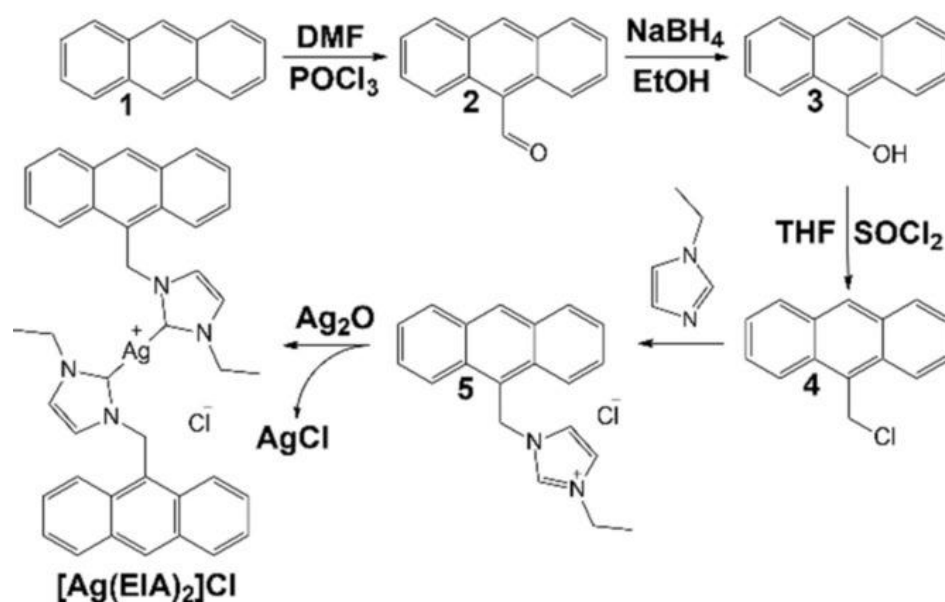


Fig. 16 – Schema degli step seguiti per la sintesi del composto [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl.

### 2.3.2 Analisi spettrofotometrica

Il comportamento in soluzione del complesso di  $[\text{Ag}(\text{EIA})_2]\text{Cl}$  è stato valutato mediante studi spettrofotometrici eseguiti con uno spettrofotometro Varian Cary 50 Bio UV/Vis. Per la valutazione dell'assorbimento, sono state preparate soluzioni di  $[\text{Ag}(\text{EIA})_2]\text{Cl}$  in vari solventi: dimetilsolfossido (DMSO), DMF, tampone fosfato 50 mM (pH 7,4) e in buffer acetato pH 4,5, in presenza dell'1% di solvente organico.

Spettri di emissione di  $[\text{Ag}(\text{EIA})_2]\text{Cl}$  ( $10^{-8}$  M) in tampone fosfato 50 mM (pH 7,4) in presenza di 0,001% DMF, sono stati registrati con uno spettrometro a luminescenza PerkinElmerLS55. Tutti gli esperimenti sono stati condotti a 25 °C.

### 2.3.3 Determinazione del $\log P$

Il  $\log P$  (o costante di ripartizione) misura il grado di lipofilicità/idrofilicità di una determinata sostanza. Acqua Milli-Q e n-ottanolo in rapporto 1:1 sono stati mescolati per 72 ore per consentire la saturazione di entrambe le fasi. Le soluzioni dei due complessi d'argento e del cisplatino ( $3 \times 10^{-3}$  M) sono state preparate in fase acquosa e un uguale volume di ottanolo è poi stato aggiunto. Le soluzioni bifasiche, così ottenute, sono state mescolate per 10 minuti e quindi centrifugate per 5 minuti a 6000 rpm per consentire la separazione completa delle due fasi. Le concentrazioni dei composti presenti in ciascuna delle due fasi sono state determinate tramite spettroscopia UV/VIS. Il  $\log P$  di ciascun composto è stato calcolato come il rapporto tra il logaritmo della concentrazione del composto misurata in ottano e il logaritmo della concentrazione del composto misurata in acqua:

$$\log P = \frac{\log[\text{composto}]_{\text{oct}}}{\log[\text{composto}]_{\text{H}_2\text{O}}}$$

I valori finali di  $\log P$  sono stati riportati come media di tre diverse determinazioni.

#### 2.3.4 Cristallografia a raggi X

Singoli cristalli del composto 5 (Fig.16), adatti per esperimenti di diffrazione ai raggi X, sono stati ottenuti aggiungendo alla miscela di reazione acetonitrile e dietil etere. Questa soluzione è stata conservata a -20°C per 4 giorni, passati i quali, abbiamo ottenuto cristalli aghiformi e di colore giallo. Per confronto, i cristalli di forma appiattita ed incolori di [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl, sono stati ottenuti direttamente dalla sintesi del composto, descritta precedentemente.

La raccolta dei dati è stata eseguita con un diffrattometro Oxford Diffraction Xca-libur3 a 100 K e con radiazione MoKa ( $\lambda = 0,71073$ ) e analizzati tramite CrysAlis. La correzione dell'assorbimento è stata eseguita con il programma SCALE3 ABSPACK, anch'esso integrato nella suite CrysAlis.

#### 2.3.5 Colture cellulari

Cellule aderenti di neuroblastoma SH-SY5Y, di forma piramidale e caratterizzate da processi cellulari simili a neuriti, sono state coltivate usando come terreno il Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's Nutrient Mixture F12 (DMEM/HAMF12) (1:1), addizionato con il 10% di siero fetale bovino inattivato (FBS), glutammina (2 mM), penicillina G (250 µg/mL) e streptomina (250 µg/mL). Cellule aderenti di adenocarcinoma mammario MDA-MB-231, di forma fusoidale, sono state coltivate in DMEM, addizionato con il 10% di FBS, glutammina (2 mM), penicillina G (250 µg/mL) e streptomina (250 µg/mL). Entrambe le linee cellulari sono state tenute in incubatore con un atmosfera umidificata a 37°C col 5% in CO<sub>2</sub>.

#### 2.3.6 Saggio di citotossicità e calcolo IC<sub>50</sub>

La vitalità cellulare è stata misurata usando il kit CellTiter-Blue® Reagent commercializzato da Promega, che attraverso un metodo fluorometrico omogeneo è in grado di stimare il numero di cellule vitali presenti in coltura. L'attività metabolica delle cellule, indice diretto della vitalità cellulare, è stata valutata usando l'indicatore colorimetrico resazurina. Le cellule vitali mantengono la capacità di ridurre la

resazurina in resorufin che emette fluorescenza. Le cellule non vitali perdono rapidamente l'attività metabolica e non sono più in grado di ridurre il colorante indicatore e quindi non generano un segnale fluorescente (Fig.17).

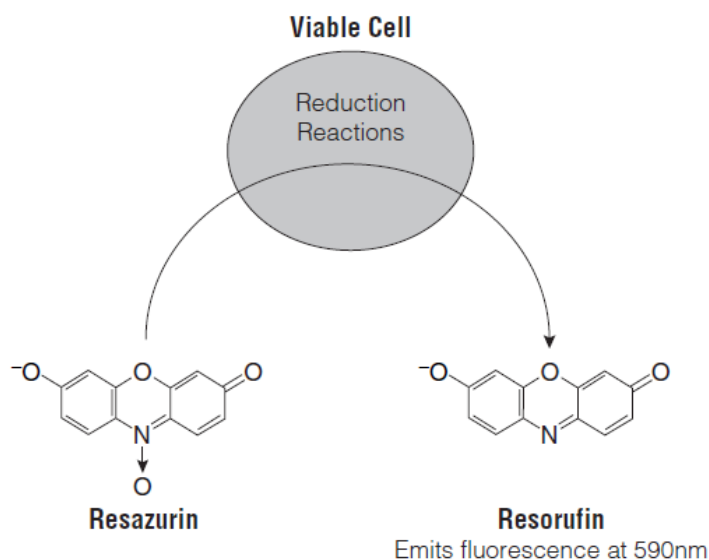


Fig. 17 – Meccanismo d'azione del kit CellTiter-Blue® Reagent (Promega).

Per valutare gli effetti citotossici e calcolare l'IC<sub>50</sub> dei vari composti, cellule SH-SY5Y e MDA-MB-231 sono state seminate in una piastra con 96 pozzetti (1x10<sup>4</sup> cellule/pozzetto) e trattate con: [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl (0,5-2,5 μM), cisplatino (10-50 μM) e [AgCl(MIA)] (2-10 μM) per 24h. Dopo tale periodo di incubazione, in ogni pozzetto è stato aggiunto il reagente CellTiter-Blue® e incubato per 2 ore a 37 °C. La fluorescenza è stata misurata con un lettore multi-piastre Infinite M200PRO (Tecan, Svizzera) alla lunghezza d'onda 590 nm.

I range di concentrazioni scelti per il cisplatino e per [Ag(MIA)]Cl sono gli stessi usati in precedenti esperimenti e noti indurre citotossicità (CITTA A ET AL., 2013). In quanto complesso di nuova sintesi, il range di concentrazione da utilizzare per determinare l'IC<sub>50</sub> di [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl è stato scelto dopo aver eseguito prove preliminari, usando inizialmente gli stessi intervalli di concentrazione degli altri due composti a confronto (10-50 μM e 2-10 μM). Questi valori di concentrazione, soprattutto quelli più alti, sono risultati troppo tossici anche per brevi tempi di trattamento. Dopo ulteriori prove, il range di concentrazione 0,5-2,5 μM si è rivelato ottimale per la valutazione

dell'IC<sub>50</sub> di [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl in tutti i tipi cellulari testati.

È stato poi valutato il cambiamento dell'aspetto morfologico delle cellule in coltura in seguito al trattamento con i vari composti. Cellule SH-SY5Y e MDA-MB-231 sono state piastrate in numero (250 mila cellule) e poi trattate per 24 ore con i vari complessi. Al termine del periodo di incubazione, le colture sono state osservate al microscopio invertito a contrasto di fase (Nikon TMS-F) e fotografate con fotocamera digitale Nikon D5000 a 10x.

### 2.3.7 Valutazione del drug uptake

Le cellule SH-SY5Y e MDA-MB-231 sono state seminate in piastre da 6 pozzetti (5x10<sup>5</sup> cellule/pozzetto) e dato loro il tempo di aderire. Successivamente il mezzo di coltura è stato cambiato con un mezzo di coltura privo di rosso fenolo e siero. Le cellule sono state poi incubate con [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl, cisplatino o [AgCl(MIA)] (10 μM) per 30 minuti. Alla fine dei trattamenti, le cellule sono state lisate per shock osmotico in acqua distillata e il lisato raccolto per la quantificazione della concentrazione dei metalli. Questa è stata condotta in triplicato seguendo il metodo riportato in altro studio (MARZO T. ET AL., 2015) e utilizzando uno spettrometro a emissione atomica con sorgente al plasma accoppiato induttivamente (ICP-AES), Varian 720-ES, equipaggiato con un nebulizzatore a ultrasuoni CETAC U5000 AT+, in modo da incrementare la sensibilità del metodo. Prima di effettuare le analisi, i campioni, sono stati spostati in alcune vial e digeriti in un termoreattore a 80°C per 3 ore con 1 mL di acqua regia (HCl ultrapuro e HNO<sub>3</sub> ultrapuro in rapporto 3:1) e 5 mL di acqua ultrapura (≤18 MΩ). Successivamente i campioni sono stati arricchiti con Ge (1ppm) usato come standard interno per l'analisi. Gli standard per la curva di calibrazione sono stati preparati tramite una serie di diluizioni gravimetriche di una soluzione standard di Pt (1000 mg L<sup>-1</sup>). Le lunghezze d'onda usate per la determinazione del Pt e dell'Ag sono state rispettivamente 214,424 nm e 338,289 nm mentre per Ge è stata di 209,426 nm. Le procedure sono state ottimizzate per acquisire il massimo dell'intensità di segnale. Tra un campione e l'altro è stata utilizzata una soluzione di lavaggio a base di HCl ultrapuro e HNO<sub>3</sub>



ultrapuro in rapporto 3:1 in modo da evitare la presenza di ogni possibile residuo. I valori di Ag e Pt ottenuti sono stati normalizzati per la concentrazione di proteine cellulari totali, determinate mediante il metodo micro-BCA a base di acido bicinconico. I valori della concentrazione dei metalli sono stati espressi in  $\mu\text{g}$  di metallo/ $\mu\text{g}$  di proteine.

### 2.3.8 Localizzazione intracellulare del complesso $[\text{Ag}(\text{EIA})_2]\text{Cl}$ mediante microscopia a fluorescenza

Cellule SH-SY5Y sono state seminate su vetrini coprioggetto ( $5 \times 10^5$  cellule) e trattate con  $[\text{Ag}(\text{EIA})_2]\text{Cl}$   $10 \mu\text{M}$  per i seguenti tempi: 1 e 2 ore. Sono state usate anche cellule di controllo non trattate con il complesso a base di argento. Alla fine del trattamento, le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 2% per 10 minuti a temperatura ambiente e successivamente osservate al microscopio a epifluorescenza Zeiss Axioskop (Mannheim, Germania) con obiettivo 100x, usando come lunghezza d'onda di eccitazione 358 nm. Le immagini a fluorescenza sono state catturate mediante fotocamera digitale Leica DFC310 FX da 1,4MP equipaggiata con il software LAS V3.8 (Leica Microsystems, Mannheim, Germania).

### 2.3.9 Valutazione dell'attività della TrxR

Gli effetti inibitori di  $[\text{Ag}(\text{EIA})_2]\text{Cl}$  nei confronti dell'attività della TrxR sono stati valutati mediante quantificazione diretta della capacità della TrxR di ridurre l'acido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) in presenza di NADPH (MARZO T. ET AL., 2017). La TrxR, estratta da fegato di ratto e commercialmente disponibile, è stata diluita con acqua ad una concentrazione finale (1 U/L). Aliquote con 25  $\mu\text{l}$  di TrxR sono state precedentemente incubate per 5 minuti a  $37^\circ\text{C}$ , con 25  $\mu\text{l}$  di PBS 0,1 M, pH 7,0, EDTA 5 mM, NADPH 0,25 mM, in assenza o in presenza di varie concentrazioni di  $[\text{Ag}(\text{EIA})_2]\text{Cl}$  (da 0,1 nM a 1 mM). La reazione, che ha avuto inizio con l'aggiunta di DTNB 1 mM, è stata monitorata spettrofotometricamente a 412 nm per circa 10 minuti. L'assenza di interferenza da parte dei vari reagenti è stata confermata da

esperimenti di controllo negativo con soluzioni prive dell'enzima. I valori di  $IC_{50}$  sono stati calcolati come la concentrazione del composto che riduce l'attività dell'enzima del 50%. Tali valori sono stati riportati come media  $\pm$  SD di tre esperimenti, ciascuno condotto in duplicato.

### 2.3.10 ESI-MS

L'interazione tra  $[Ag(EIA)_2]Cl$  e il dodecapeptide sintetico Ac-SGGDILQSGCUG-NH<sub>2</sub>, corrispondente al frammento triptico C-terminale di hTrxR, è stata valutata mediante ESI-MS ad alta risoluzione. Il dodecapeptide è stato sciolto in acqua LC-MS-grade (soluzione finale di concentrazione  $10^{-4}$  M), trattato con ditionitrotolo (DTT, 5,0 equiv) per ridurre il legame S-Se. E' stato poi aggiunto  $[Ag(EIA)_2]Cl$  (1,0 equiv) in rapporto molare (complesso metallo/peptide 1: 3). La miscela è stata incubata per 2 ore a 37 °C. Gli spettri ESI-MS sono stati acquisiti mediante infusione diretta a una portata di 10  $\mu$ L min<sup>-1</sup> con uno spettrometro di massa TripleTOF® 5600+ (Sciex, Framingham, MA, USA), dotato di un'interfaccia DuoSpray® funzionante con una sonda ESI. I parametri della sorgente ESI sono stati ottimizzati come segue: polarità positiva, tensione ioni di dispersione flottante 5500 V, temperatura 400 ° C, gas sorgente ionica 1 (GS1) 40, gas sorgente ionica 2 (GS2) 30, gas barriera (CUR) 25, potenziale di declustering (DP) 100 V, energia di collisione (CE) 10 V. Per l'acquisizione, è stato utilizzato il software Analyst TF 1.7.1 (Sciex) e le masse deconvolute sono state ottenute utilizzando la micro-applicazione v.2.2 Bio Tool Kit incorporata in PeakView™ software v.2.2 (Sciex).

### 2.3.11 Analisi statistica

I valori di  $IC_{50}$  (cioè la concentrazione richiesta per l'inibizione del 50%) sono stati calcolati mediante regressione non lineare da una curva dose/risposta usando come programma di statistica GraphPad Prism 2.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) ed espresso come media  $\pm$  deviazione standard su almeno 4 esperimenti indipendenti.

## 2.4 Risultati

### 2.4.1 Sintesi e caratterizzazione del cloruro di argento bis(1-(anthracen-9-ilmetil)-3-etilimidazol-2-ildiene) ( $[Ag(EIA)_2]Cl$ )

Il complesso  $[Ag(EIA)_2]Cl$  è stato preparato secondo la procedura riportata nella sezione sperimentale. Il complesso  $[Ag(EIA)_2]Cl$  è stato progettato modificando il ligando sintetizzato da Rigobello e collaboratori nel loro lavoro (CITTA A ET AL., 2013).

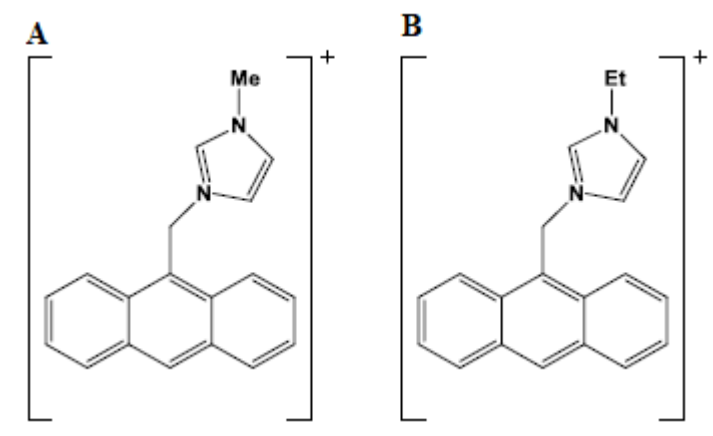


Fig. 18 - Struttura dei carbeni A) sintetizzato da Rigobello e collaboratori e B) il carbene da noi modificato ed utilizzato in questo progetto.

Nella Fig. 18A è mostrata la struttura del ligando precedentemente sintetizzato da Rigobello e collaboratori, mentre in Fig. 18B è riportato il ligando modificato da noi sintetizzato in questo studio .

Dopo la sintesi del ligando modificato, l'intenzione era quella di preparare il suo complesso d'argento in rapporto 1:1, ovvero  $[Ag(EIA)]Cl$ . Contrariamente alle aspettative, attraverso la lenta cristallizzazione del prodotto, abbiamo ottenuto selettivamente e con buona resa un prodotto che si è rivelato corrispondere al complesso d'argento bifunzionale  $[Ag(EIA)_2]Cl$ .

### 2.4.2 Cristallografia a raggi X

La struttura del solido cristallino di  $[Ag(EIA)_2]Cl$  ottenuta

mediante cristallografia a raggi X conferma la struttura bifunzionale già descritta in soluzione. Questo inaspettato comportamento del complesso è probabilmente dovuto alla piccola modifica apportata nella posizione 3 dell'imidazolo che influenza fortemente la natura delle specie prodotte, tanto da portare a un prodotto finale,  $[\text{Ag}(\text{EIA})_2]\text{Cl}$ , caratterizzato da due leganti di carbene legati al metallo centrale (Fig.19).



Fig. 19 – Rappresentazione grafica della struttura cristallina della molecola  $[\text{Ag}(\text{EIA})_2]\text{Cl}$ .

#### 2.4.3 Assorbimento UV-Visibile e spettri di emissione

Per testare la stabilità del complesso  $[\text{Ag}(\text{EIA})_2]\text{Cl}$  rispetto alla sua dissociazione in soluzione, sono stati misurati gli spettri di assorbimento UV-Visibile del composto nei comuni solventi organici (DMSO e DMF) e in una soluzione tampone a pH fisiologico (PBS) o leggermente acido (Buffer ammonio-acetato).  $[\text{Ag}(\text{EIA})_2]\text{Cl}$  mostra la tipica banda di assorbimento del cromoforo antracene, con un picco massimo a 370 nm. Tale banda non mostra nessun cambiamento dopo 24 ore, confermando così la stabilità del complesso nel PBS a pH 7.4 (Fig.20A) e nelle soluzioni di DMF (Fig.20B) e DMSO (Fig.20C). Nel buffer ammonio-acetato (pH 4,5) viene rilevato un incremento della linea di base dovuto molto probabilmente a una leggera precipitazione del complesso. La precipitazione non ha comunque nessun effetto sulla forma delle bande di assorbimento che rimangono sostanzialmente inalterate (Fig.20D).

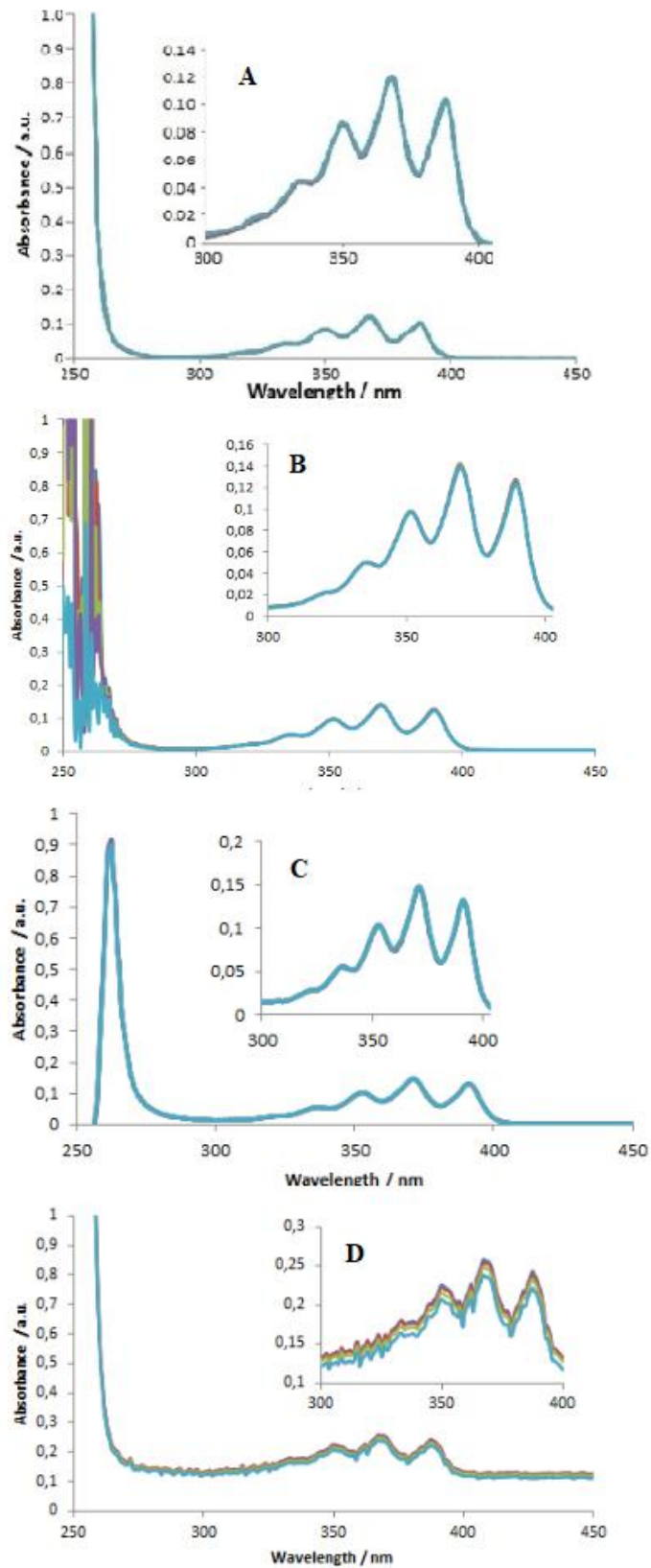


Fig.20 - Spettri di assorbimento UV/Visibile del composto  $[Ag(EIA)_2]Cl$   $10^{-5} M$ . Time course di 24h in (A) PBS (pH 7,4), (B) DMF 100%, (C) DMSO 100% e (D) buffer ammonio acetato pH 4.5.

Gli spettri di fluorescenza (Fig.21) sono stati misurati usando differenti lunghezze d'onda d'eccitazione con un range che va da 335 ai 405 nm.

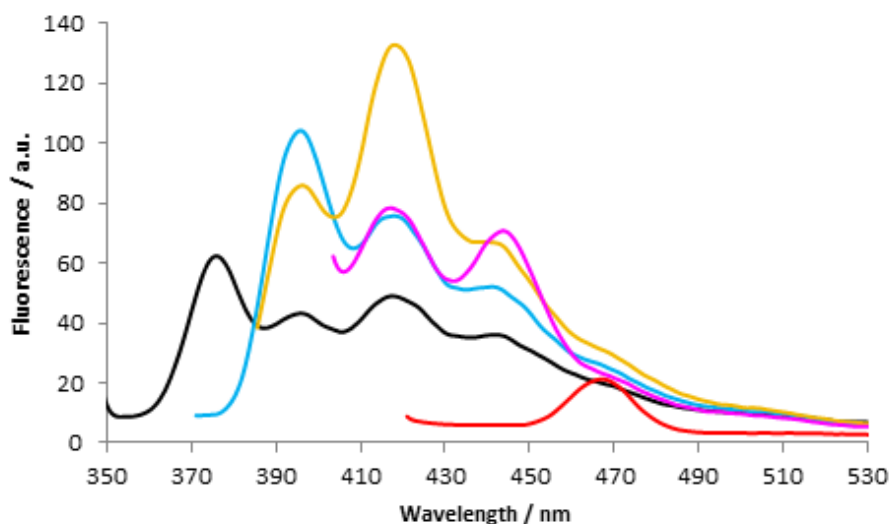


Fig. 21 - Spettri di emissione dell'  $[Ag(EIA)_2]Cl$  ( $10^{-8}$  M in buffer fosfato 50 mM a pH 7,4 in presenza di 0.001 % di DMSO): linea nera  $\lambda_{exc}=335$  nm, linea blu  $\lambda_{exc}=350$  nm, linea arancio  $\lambda_{exc}=368$  nm, linea rosa  $\lambda_{exc}=388$  nm e linea rossa  $\lambda_{exc}=405$  nm.

In Fig.22 è mostrato lo spettro con le tre bande principali di emissione in corrispondenza dei picchi a 395, 420, 440 nm, in seguito ad eccitazione con  $\lambda_{ecc}=350$  nm.

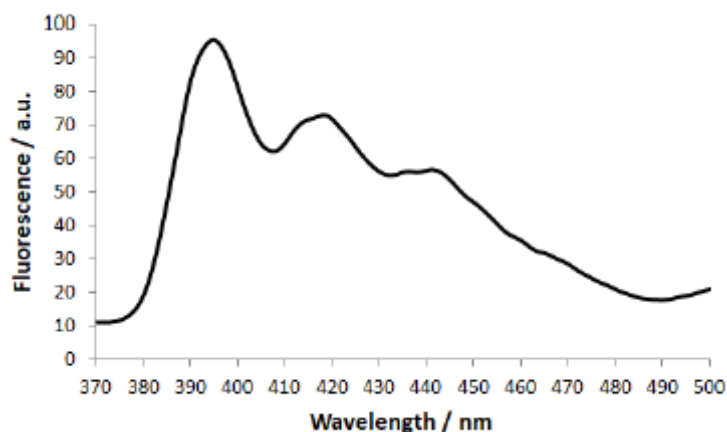


Fig.22 - Spettro di emissione del composto  $[Ag(EIA)_2]Cl$  con le tre bande principali di emissione in corrispondenza dei picchi a 395, 420, 440 nm, in seguito ad eccitazione con  $\lambda_{ecc}=350$  nm.

E' interessante notare come la presenza dell'atomo di argento non abbia effetti significativi sulle proprietà spettrofotometriche del ligando, risultando queste sostanzialmente inalterate quando confrontate con quelle del ligando libero (Fig.23)

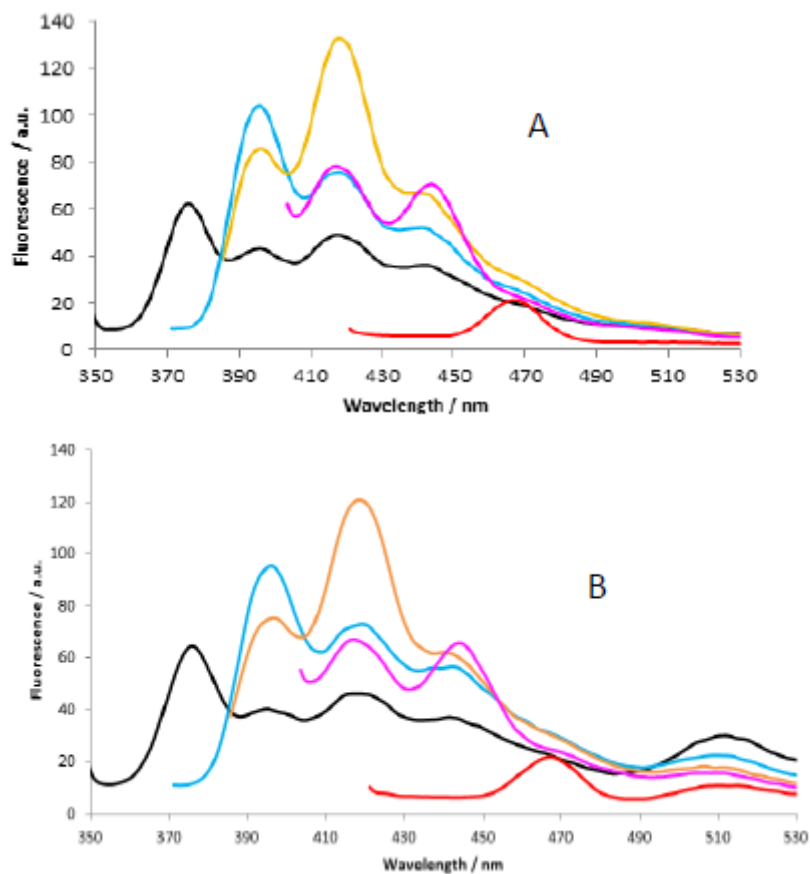


Fig. – 23 - Spettri di emissione del ligando libero (A) e ligando con argento  $[Ag(EIA)_2]Cl$  (B) ( $10^{-8}$  M in buffer fosfato 50 mM a pH 7.4 in presenza di 0.001 % di DMSO): linea nera  $\lambda_{exc}=335$  nm, linea blu  $\lambda_{exc}=350$  nm, linea arancio  $\lambda_{exc}=368$  nm, linea rosa  $\lambda_{exc}=388$  nm e linea rossa  $\lambda_{exc}=405$  nm.

#### 2.4.4 Determinazione di log P

I valori di log P ottenuti per due complessi dell'argento e per il cisplatino sono stati riportati nella tabella 1.

<b>Complesso</b>	<b>Log P</b>
[Ag(EIA) <sub>2</sub> ]Cl	0.90
Cisplatino	-2.4
Ag(MIA)Cl	0.50

Tab. 1 - Valori di Log P dei vari composti.

I dati ottenuti da questa misurazione mostrano che [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl ha un valore di log P più alto degli altri due complessi, e quindi una maggiore lipofilicità che potrebbe essere associata ad una aumentata capacità di penetrare all'interno delle cellule.

#### 2.4.5 Saggio di citotossicità

Studi preliminari effettuati in cellule SH-SY5Y e MDA-MB-231 per determinare il range di concentrazioni, da utilizzare per la valutazione della citotossicità di [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl e dell'IC<sub>50</sub>, hanno mostrato che [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl a concentrazioni variabili da 10 a 50 µM, induce la morte dell'intera coltura cellulare dopo poche ore di trattamento. Risultati simili si sono ripetuti quando abbiamo testato concentrazioni di [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl variabili tra 2-10 µM, anche se a tempi di incubazione un po' più lunghi e con una minore mortalità (dato non mostrato). Ulteriori prove hanno permesso di stabilire il range di concentrazione utile per calcolare l'IC<sub>50</sub> di [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl nei nostri tipi cellulari (0,5 e 2,5 µM).

Il trattamento per 24 ore delle cellule SH-SY5Y e MDA-MB-231 con concentrazioni variabili dei composti dell'argento e del cisplatino induce una significativa riduzione della vitalità cellulare per ogni composto valutato e ad ogni concentrazione testata, in maniera dose dipendente (Fig.24).



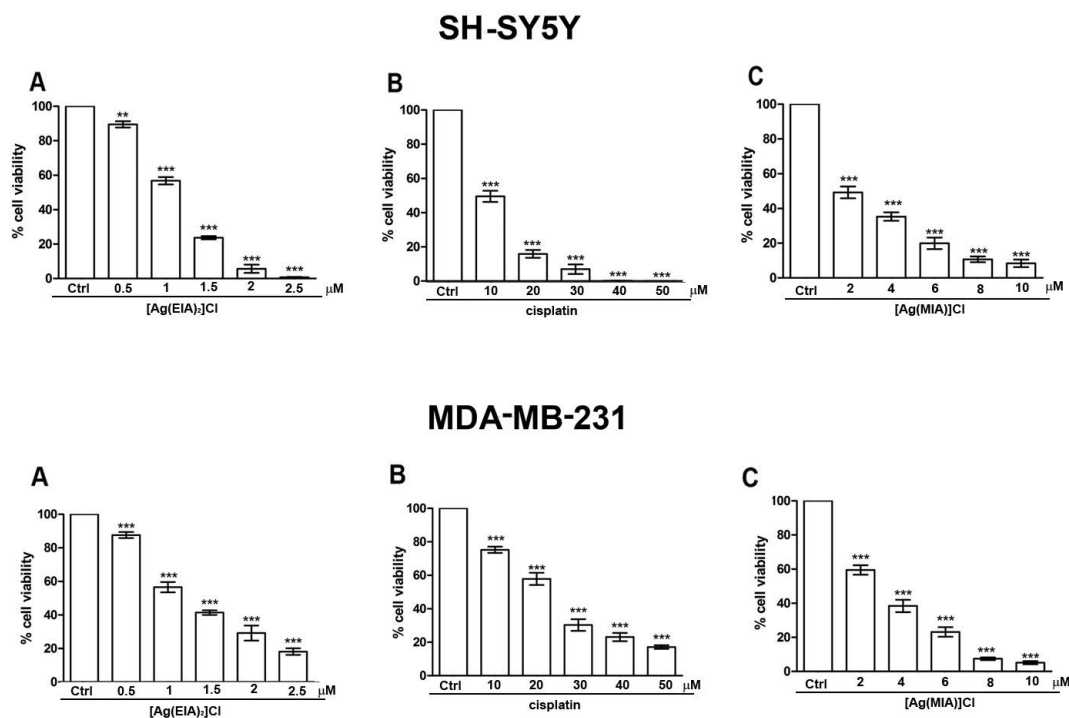


Fig. 24 – Grafici di citotossicità riferiti alle SH-SY5Y trattate con A) [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl (range concentrazione 0,5-2,5 μM) B) cisplatino (range concentrazione 10-50 μM) e C) [Ag(MIA)<sub>2</sub>]Cl (range concentrazione 0,2-1,0 μM); Grafici di citotossicità riferiti alle MDA-MB-231 trattati con A) [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl (range concentrazione 0,5-2,5 μM) B) cisplatino (range concentrazione 10-50 μM) e C) [Ag(MIA)<sub>2</sub>]Cl (range concentrazione 0,2-1,0 μM) (in tutti i casi \*\*\* p<0.001 vs ctrl).

I dati ottenuti dai test di citotossicità sono stati usati per calcolare l'IC<sub>50</sub> dei vari composti come descritto in Fig.25 e i cui valori sono riportati in tabella 2.

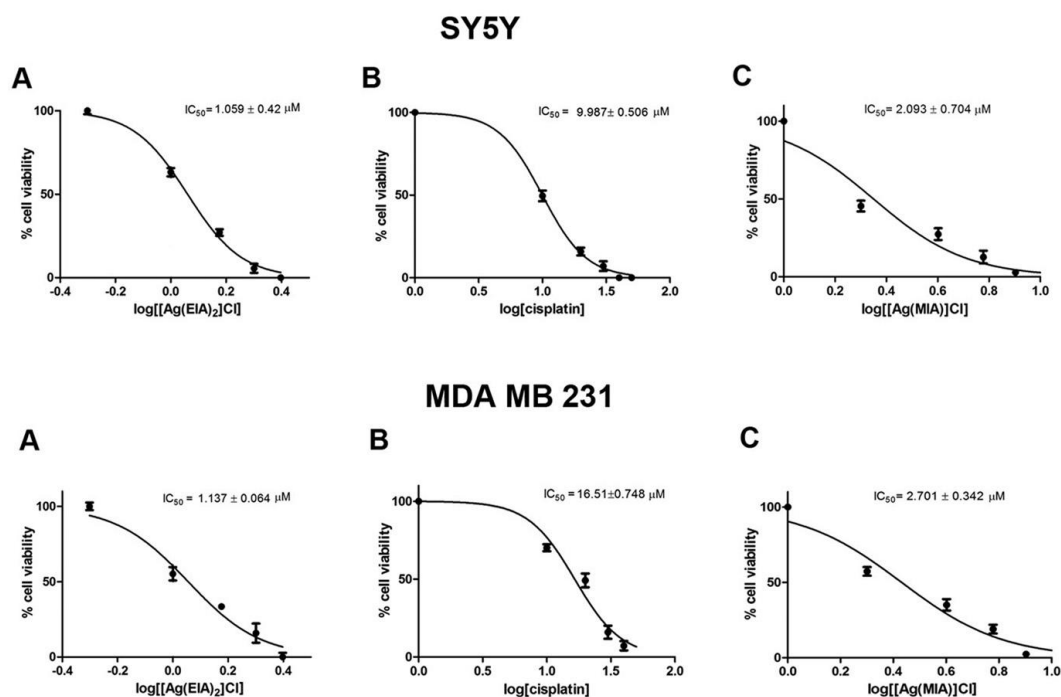


Fig. 25 – Grafici riferiti alle IC<sub>50</sub> per SY5Y trattate con e per MDA-MB-231 trattate con A) [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl B) cisplatino e C) [Ag(MIA)<sub>2</sub>]Cl.

I valori delle IC<sub>50</sub> indicano che l'effetto citotossico del carbene [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl da noi sintetizzato è quello più elevato se confrontato con quello del cisplatino e del composto Ag(MIA)Cl (Fig. ABC) nei vari tipi cellulari. Dalla Tab. 2 è possibile notare come nelle SH-SY5Y, l'IC<sub>50</sub> del complesso [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl è circa dieci volte più basso di quello del cisplatino e due volte minore del composto Ag(MIA)Cl. Nelle MDA-MB-231, l'IC<sub>50</sub> del complesso [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl è circa 15 volte più basso di quello del cisplatino e due volte minore del composto Ag(MIA)Cl.

<b>SH-SY5Y</b>	<b>Valore IC<sub>50</sub></b>
[Ag(EIA) <sub>2</sub> ]Cl	1.059 ± 0.042
Cisplatino	9.987 ± 0.506
[Ag (MIA)] Cl	2.93 ± 0.704
<b>MDA MB 231</b>	<b>Valore IC<sub>50</sub></b>
[Ag(EIA) <sub>2</sub> ]Cl	1.137 ± 0.064
Cisplatino	16.51 ± 0.748
[Ag (MIA)]Cl	2.701 ± 0.342

Tab. 2 - Valori di IC<sub>50</sub> (μM) dei composti [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl, Cisplatino e Ag(MIA)Cl ottenuti dagli esperimenti sulle cellule SH-SY5Y e MDA MB 231. I risultati riportati sono la media di tre esperimenti indipendenti ± SD.

L'aspetto morfologico delle colture cellulari, osservato al microscopio invertito a contrasto di fase, conferma i dati di citotossicità, descritti precedentemente. In Fig.26 sono state riportate immagini rappresentative dei vari tipi cellulari in coltura: in assenza di trattamento (controllo) e in presenza dei vari composti ai valori di concentrazione che più si avvicinano a quelli delle rispettive IC<sub>50</sub>.

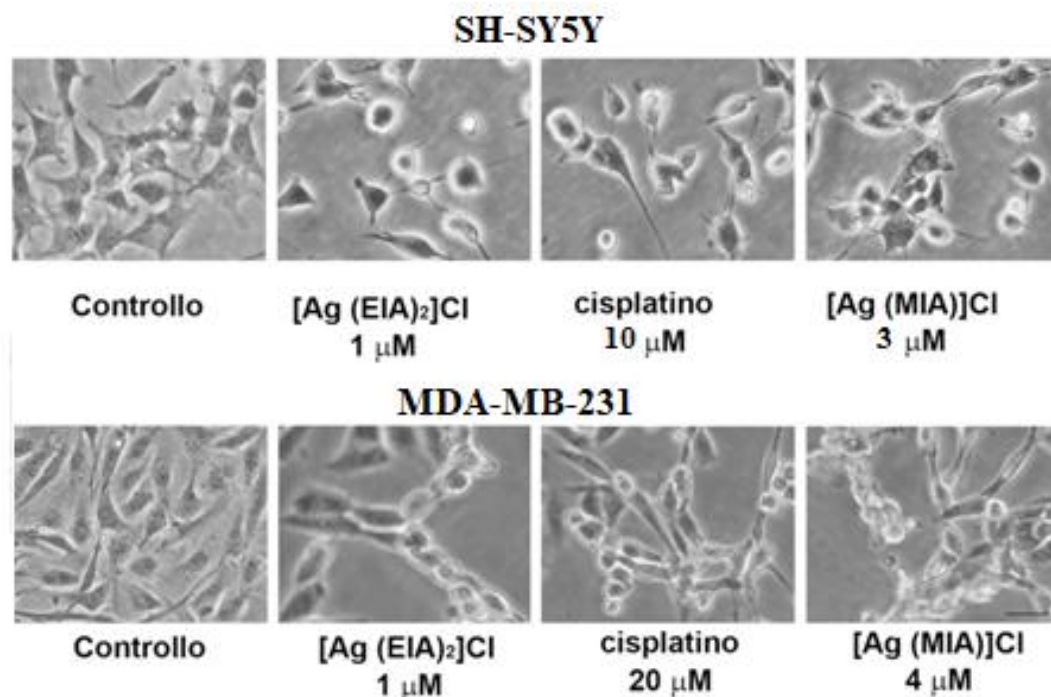


Fig. 26 – Comparazione dell'aspetto morfologico delle cellule SH-SY5Y e MDA-MB-231 tra i controlli (mantenuti in entrambi i tipi di colture una struttura cellulare integra dalla tipica forma piramidale per le SH-SY5Y e a fuso per le MDA-MB-231) e i trattati alle rispettive concentrazioni vicine all'IC<sub>50</sub> dei composti [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl, cisplatino e [Ag(MIA)]Cl (barra misura 20 µm) (caratterizzati in entrambi i tipi di colture dalla presenza di vacuoli indicanti processi di morte cellulare e dalla perdita di un contorno cellulare definito).

#### 2.4.6 Valutazione del drug uptake

Esperimenti per valutare e confrontare l'uptake dei composti [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl, cisplatino e [Ag(MIA)]Cl sono stati effettuati sempre sulle cellule SH-SY5Y e MDA-MB-231. I valori ottenuti sono riportati in Tab.3.

<b>SH-SY5Y</b>	<b>µg di metallo/ µg di proteine</b>
[Ag(EIA) <sub>2</sub> ]Cl	1.4x10 <sup>-3</sup> ±0.2x10 <sup>-3</sup> (a)
Cisplatino	1.6x10 <sup>-4</sup> ± 0.3x10 <sup>-4</sup> (b)
Ag(MIA)Cl	2.1x10 <sup>-4</sup> ± 0.7x10 <sup>-4</sup> (b)
<b>MD-AMB231</b>	<b>µg di metallo/ µg di proteine</b>
[Ag(EIA) <sub>2</sub> ]Cl	1.6x10 <sup>-3</sup> ±0.2x10 <sup>-3</sup> (a)
Cisplatino	1.1x10 <sup>-4</sup> ± 0.2x10 <sup>-4</sup> (b)
Ag(MIA)Cl	2.5x10 <sup>-4</sup> ± 0.7x10 <sup>-4</sup> (b)

Tab. 3 – La concentrazione di metallo è stata misurata dopo 30 minuti dal trattamento delle cellule SH-SY5Y e MDA-MB-231 a una concentrazione di 10 µM dei tre differenti composti: [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl, cisplatino e [AgCl(MIA)]. I valori con la stessa lettera indicano che la differenza tra loro non ha nessuna significatività statistica.

#### 2.4.7 Localizzazione intracellulare del complesso [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl mediante microscopia a fluorescenza

La localizzazione intracellulare del complesso [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl è stata osservata, mediante microscopio a fluorescenza, dopo aver trattato le cellule SH-SY5Y per 1 e 2 ore (Fig.27). Nelle cellule di controllo, non trattate con [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl, non si osserva alcun segnale fluorescente. Dopo 1 ora dal trattamento, un segnale fluorescente è visibile all'interno delle cellule nel citoplasma periferico, al di sotto del plasmalemma e appare circoscritto a formazioni rotondeggianti, che potremmo speculare essere possibili vescicole di endocitosi. Tale dato, ovviamente, dovrebbe trovare conferma da altri studi. A 2 ore, il segnale sembra essere distribuito in maniera più uniforme all'interno del citoplasma.

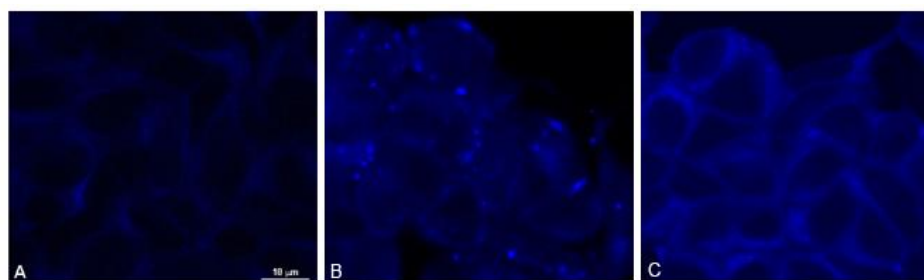


Fig. 27 – Immagini ottenute mediante microscopio a fluorescenza (Zeiss Axioskop, Mannheim, Germania; obiettivo 100x;  $\lambda$  358 nm): A) Controllo; B) Cellule trattate con  $[\text{Ag}(\text{EIA})_2]\text{Cl}$  10  $\mu\text{M}$  per 1 h; C) Cellule trattate con  $[\text{Ag}(\text{EIA})_2]\text{Cl}$  10  $\mu\text{M}$  per 2 h.

#### 2.4.8 Saggio dell'attività della trxR

I risultati di questo saggio *in vitro* dimostrano che il complesso  $[\text{Ag}(\text{EIA})_2]\text{Cl}$  è in grado di inibire l'attività della TrxR con una  $\text{IC}_{50}$  di  $0.493 \pm 0.04 \mu\text{M}$ .

#### 2.4.9 Studi di interazione tra $[\text{Ag}(\text{EIA})_2]\text{Cl}$ e il e il dodecapeptide sintetico C-terminale di hTrxR

Lo spettro ESI-MS del dodecapeptide sintetico Ac-SGGDILQSGCUG-NH<sub>2</sub>, corrispondente al frammento triptico C-terminale di hTrxR, è mostrato in Fig.28A e mostra la presenza di un intenso picco a  $m/z$  1183.39 Da.

Dopo 2 ore di incubazione di  $[\text{Ag}(\text{EIA})_2]\text{Cl}$  con il Ac-SGGDILQSGCUG-NH<sub>2</sub>, lo spettro ESI-MS di quest'ultimo cambia in maniera evidente per la presenza di due principali segnali: uno a  $m/z$  1469.54 Da (corrispondente alla formazione di un monoaddotto) e l'altro a  $m/z$  1755.69 Da (corrispondente alla formazione di un doppio addotto) indicando che uno o due carbene ligandi, si sono legati al peptide. Fig.28B.

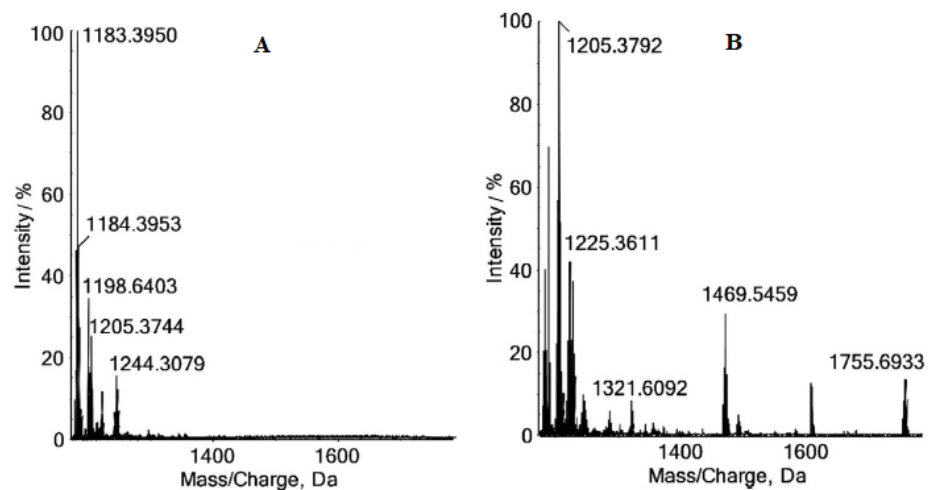


Fig. 28 – Spettri ESI-MS del A) del frammento C-terminal del dodecapeptide hTrxR (Ac-SGGDILQSGCUG-NH<sub>2</sub>) dissolto in acqua MilliQ (10<sup>-4</sup> M) mostrandone il tipico pattern isotopico del selenio B) del frammento C-terminal del dodecapeptide hTrxR (Ac-SGGDILQSGCUG-NH<sub>2</sub>) dissolto in acqua MilliQ (10<sup>-4</sup> M) in presenza di 5.0 equiv di (DTT) e 1.0 equiv di [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl incubato per 2 h at 37°C mostrandone la presenza dei due picchi indicanti la formazione del mono- e del bi-addotto.

Questi dati indicano che [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl è in grado di legarsi al peptide sintetico della TrxR. Il picco a *m/z* 1205.37 Da è dovuto al peptide che non ha reagito associato con il sodio.

## 2.5 Discussione

Negli ultimi anni, i metallo-carbeni-N-eterociclici (Me-NHC), grazie alle loro caratteristiche di stabilità, lipofilità e facile manipolazione si sono dimostrati ottimi candidati per il drug-design e il loro utilizzo in ambito terapeutico (YAŞAR S. ET AL., 2018). In ambito chemioterapico, un elevato numero di metalli, tra i quali l'argento, ha mostrato attività anti-neoplastica se legati agli NHC (MERCUS L. AND ALBRECHT M., 2010; TEYSSOT M.L. ET AL., 2009). Numerosi sono gli studi dedicati alla sintesi di nuovi complessi carbenici a base di argento con proprietà anti-tumorali. In questo lavoro, in collaborazione con ricercatori del dipartimento di chimica dell'università di Firenze, è stato sintetizzato e caratterizzato chimicamente un nuovo carbene metallo, il bis(1-(antracen-9-ilmetil)-3-etilimidazol-2-ilidene cloruro d'argento, [Ag(EIA)<sub>2</sub>], ottenuto per modifica chimica di un altro carbene metallo ad

azione anti-tumorale precedentemente sintetizzato da Rigobello e collaboratori, [Ag(MIA)]Cl.

Il composto a base di argento neosintetizzato è formato da due carbeni ligandi con a ponte il metallo. [Ag(EIA)<sub>2</sub>] si è mostrato stabile nei solventi più comunemente utilizzati e presenta uno spettro massimo di emissione di 370 nm tipico dell'antracene e ciò, permette di localizzarlo all'interno della cellula.

In questo studio abbiamo anche analizzato le proprietà biologiche di [Ag(EIA)<sub>2</sub>], in particolare le sue possibili attività citotossiche nei confronti di cellule tumorali *in vitro*, paragonando la sua azione a quella del chemioterapico cisplatino e del Ag-NHC sintetizzato da Rigobello, (CITTA A ET AL., 2013). Per fare ciò sono state usate differenti linee cellulari, sensibili al cisplatino. Le cellule SH-SY5Y sono cellule umane di neuroblastoma, la neoplasia extracranica più comune diagnosticata durante l'infanzia (BRODEUR GM ET AL., 2003) e caratterizzata, nella maggior parte dei casi dallo sviluppo di un fenotipo clinico maligno e da elevata mortalità. Tra i farmaci antitumorali utilizzati per il trattamento del neuroblastoma, uno dei più comuni è il cisplatino ma l'efficacia di questa molecola antitumorale è limitata dallo sviluppo della resistenza (GOHR K ET AL., 2017; RANINGA PV ET AL., 2019).

L'altra linea cellulare usata è la linea MDA-MB231 che è la più studiata come modello sperimentale di carcinoma mammario triplo negativo (TNBC). Questo è una forma tumorale molto aggressiva e letale, le cui cellule mancano dei recettori per gli estrogeni, per il progesterone e per il fattore di crescita dell'epidermide HER2, rendendo in tal modo il tumore non sensibile al trattamento ormonale. La chemioterapia e la radioterapia rimangono gli unici trattamenti possibili per il TNBC. L'uso del cisplatino si è rivelato di beneficio per il trattamento di questa patologia ma purtroppo la sua azione presenta delle limitazioni a causa della resistenza che tende ad instaurarsi nelle cellule dopo vari cicli di trattamento (GOHR K ET AL., 2017). Le cellule MDA-MB 231 sono caratterizzate da esprimere alti livelli del sistema

Trx/TrxR, uno dei fattori dal quale sembra dipendere la prognosi dei pazienti affetti da tale neoplasia (RANINGA PV ET AL., 2019).

Lo sviluppo di nuovi farmaci chemioterapici alternativi al cisplatino potrebbe rivelarsi importante per il trattamento di questi tipi di neoplasie.

I dati ottenuti in questo studio dimostrano che  $[Ag(EIA)_2]Cl$  ha un effetto citotossico maggiore rispetto al cisplatino e al  $[Ag(MIA)]Cl$  nelle due linee cellulari esaminate. In particolare, nelle SH-SY5Y e MDA-MB-231,  $[Ag(EIA)_2]Cl$  presenta un  $IC_{50}$  dieci o quindici volte più basso di quello del cisplatino e circa due volte minore di quello del composto  $Ag(MIA)Cl$ . Il maggiore effetto citotossico di  $[Ag(EIA)_2]Cl$  potrebbe essere dovuto alla maggiore lipofilità rispetto agli altri due composti, come si evince dai valori del log P, e quindi ad una maggiore facilità ad attraversare il plasma e penetrare all'interno delle cellule. L'elevata lipofilità di  $[Ag(EIA)_2]Cl$  rispetto al  $[Ag(MIA)Cl]$  potrebbe essere dovuta alla sostituzione del gruppo metile in posizione 3, presente nel composto di Rigobello, con un gruppo etile. A conferma di questi dati, studi condotti sull'uptake da parte delle SH-SY5Y, dimostrano che  $[Ag(EIA)_2]Cl$  è, a parità di periodo di trattamento, dieci volte più concentrato all'interno delle cellule rispetto al cisplatino e sei volte rispetto al complesso  $[AgCl(MIA)]$ . Questi valori di uptake sono comparabili a quelli osservati nelle cellule di MDA-MD-231.

L'azione citotossica di  $[Ag(EIA)_2]Cl$  nei confronti delle cellule tumorali, potrebbe essere dovuta alla sua capacità di inibire l'attività della TrxR, come dimostrato in questo studio, in un test acellulare *in vitro*. Ulteriori studi sono in corso per confermare la capacità di  $[Ag(EIA)_2]Cl$  di inibire la TrxR anche in ambiente cellulare. Dati di ESI-MS indicano che  $[Ag(EIA)_2]Cl$  è in grado di legare direttamente il frammento sintetico C terminale della TrxR *in vitro*, suggerendo un eventuale possibile interazione anche con la TrxR nativa. Questa interazione potrebbe portare alla riduzione dell'attività dell'enzima. Questo dato è di notevole interesse poiché il sistema Trx/TrxR è notoriamente coinvolto nel processo di tumorigenesi e di progressione



tumorale. Alti livelli di Trx e TrxR sono stati ritrovati in molti tipi di tumori, tra i quali come già riportato i TNBC e il neuroblastoma (BERGGREN M. ET AL., 1996) e che si correlano in modo diretto sia con la resistenza verso l'apoptosi che con la cattiva prognosi (KAIMUL ET AL., 2007).

Lo sviluppo di farmaci in grado di interferire con il sistema Trx/TrxR potrebbe rendere le cellule tumorali sensibili all'apoptosi e contribuire a prevenire od invertire i meccanismi che portano alla resistenza chemioterapica. Alla luce dei risultati ottenuti in questo studio *in vitro*, [Ag(EIA)<sub>2</sub>]Cl potrebbe essere un possibile, futuribile, valido candidato per il trattamento di neoplasie.

### **3. PROGETTO II: Sintesi, caratterizzazione chimica ed effetti biologici di nanoparticelle (NPs) di PLGA funzionalizzate con (DOXO). Studio *in vitro***

#### 3.1 Nanotecnologia e nanomedicina

La nanotecnologia è l'insieme di tecniche e di conoscenze fisiche e chimiche che permettono di manipolare la materia a livello atomico per dar luogo a strutture le cui dimensioni siano nell'ordine di grandezza del nanometro. Nel 2000, la National Nanotechnology Initiative definì la nanotecnologia come *"lo studio e il controllo della materia alle dimensioni comprese tra 1 e 100 nm, dimensioni alle quali avvengono fenomeni che sono in grado di conferire ai materiali proprietà fisiche, chimiche e biologiche uniche e completamente diverse da quelle della materia di base"*. I nanomateriali (NM) infatti, hanno elevato rapporto superficie/volume, con una superficie esposta molto maggiore, a parità di massa, rispetto a quella dello stesso materiale in forma di macroparticelle e questo rende li molto più reattivi dal punto di vista chimico e biologico. (RAO CNR ET AL., 2006).

Gli ambiti dove queste nanotecnologie stanno prendendo campo sono vari: nelle comunicazioni, in ingegneria, in chimica, in fisica, in biologia e in medicina (XU T ET AL., 2007). Quest'ultimo campo ha portato alla nascita di una nuova branca del mondo scientifico chiamata nanomedicina che, nello specifico, si occupa di sviluppare nanomateriali per applicazioni farmacologiche e mediche, da utilizzare in campo diagnostico, terapeutico e teranostico. In particolare, in campo diagnostico, vengono sviluppati nanosistemi per la diagnosi precoce e per la valutazione della predisposizione a determinate malattie. In ambito terapeutico viene valutato l'utilizzo di nanostrutture come i nanocarrier, capaci di legare, trasportare e

rilasciare farmaci all'interno dell'organismo per il trattamento di patologie. In campo teranostico, che prevede l'integrazione di un metodo diagnostico con uno specifico intervento terapeutico, vengono sviluppati sistemi nanostrutturati in grado di accogliere al loro interno contemporaneamente farmaci a scopo terapeutico e NM a scopo diagnostico.

Recentemente è stata sviluppata l'idea di legare dei carrier di piccole dimensioni ai farmaci per aiutar loro a raggiungere i bersagli intracellulari e poterli localizzare. I NM, grazie alle loro piccole dimensioni, possono interagire facilmente con le membrane cellulari e le proteine, risultando degli ottimi candidati come scaffold ingegnerizzati e come sistemi per il Drug Delivery (DDS, Drug Delivery System) (VAN VLERKEN L.E. AND AMIJI M.M., 2006)

### 3.2 Drug Delivery System

Per la maggior parte dei farmaci l'attività terapeutica dipende dalla loro concentrazione nel sito bersaglio. Affinché venga raggiunta una concentrazione di farmaco efficace per il periodo di trattamento terapeutico, spesso è necessario somministrare il composto in dosi elevate e ripetute a causa della diluizione a cui esso è soggetto a livello sistemico. Come conseguenza è possibile la comparsa di effetti tossici che, talvolta, costringono alla sospensione o all'interruzione del trattamento. Una strategia vincente che consente di superare questo limite sembra essere il drug delivery, definito come la capacità di trasportare, in modo selettivo e quantitativo un determinato farmaco, compresi quelli difficilmente idrosolubili, a livello del sito d'azione. A tal fine vengono impiegati appositi dispositivi di trasporto definiti genericamente nanocarrier (MOGHASSEMI S. AND HADJIZADEH A., 2014; SAFARI J. AND ZARNEGAR Z., 2014). L'uso dei nanocarrier porta così ad un aumento dell'efficacia terapeutica con dosaggi ridotti del farmaco, ad un miglioramento nella farmacocinetica, nella biodistribuzione, alla diminuzione della tossicità per accumulo preferenziale nel sito target,

a una più facile e mirata veicolazione del farmaco all'interno delle cellule e al prolungamento di ritenzione a livello del circolo sanguigno. Tutto questo porta a minimizzare gli effetti collaterali e massimizzare l'efficacia d'azione rispetto alla somministrazione di farmaco libero, che potrebbe agire anche in tessuti sani caratterizzati da elevata proliferazione cellulare (HUANG Y. ET AL., 2018).

Tra i farmaci che possono essere veicolati dai nanocarrier ci sono anche i chemioterapici che possono essere distribuiti in maniera circoscritta nella zona tumorale. Per i motivi sopra elencati, la strategia DDS basata su nanocarrier leganti il farmaco porta, nel suo insieme, a una riduzione dei tipici effetti collaterali della chemioterapia classica (OTSUKA H. ET AL., 2003).

Esistono due principali sistemi di DDS. Il DDS passivo sfrutta l'effetto EPS caratteristico delle cellule tumorali: la differenza di struttura nelle giunzioni cellulari tra capillari normali e quelli tumorali permette ai nanocarrier coniugati col farmaco di essere passivamente indirizzati nel sito tumorale (YOO HS ET AL., 2000). Nei tessuti normali, inoltre, i nanosistemi caricati con il farmaco sono rimossi dal sistema linfatico mentre nei tumori solidi sono selettivamente trattenuti, in quanto, molti dei vasi linfatici sono compressi e collassati, provocando così uno scarso drenaggio (FANG J ET AL., 2011).

L'altro tipo di DDS, definito attivo, sfrutta il fatto che è possibile veicolare in modo specifico i nanosistemi contenenti farmaci verso uno specifico bersaglio. Questo tipo di trasporto si avvale della possibilità di coniugare al nanocarrier un "vettore", ossia una molecola di varia natura (peptide, proteine, oligonucleotidi, anticorpi ecc.) in grado di riconoscere e interagire con un sito attivo, un recettore, espresso esclusivamente o in prevalenza dalla cellula bersaglio. In tal modo quasi tutto il farmaco viene rilasciato nel sito bersaglio, aumentando la citotossicità del nanosistema, e riducendone gli effetti collaterali (CHO K, 2008).

Esistono vari tipi di nanocarrier tra i quali tra i più utilizzati ci sono i liposomi e le nanoparticelle (NPs).

### 3.2.1 Liposomi

I primi nanocarrier a essere sintetizzati furono i liposomi, vescicole sferiche caratterizzate da un core idrofilo e un guscio idrofobo formato da un doppio strato lipidico composto da lipidi naturali o sintetici (Fig.29).

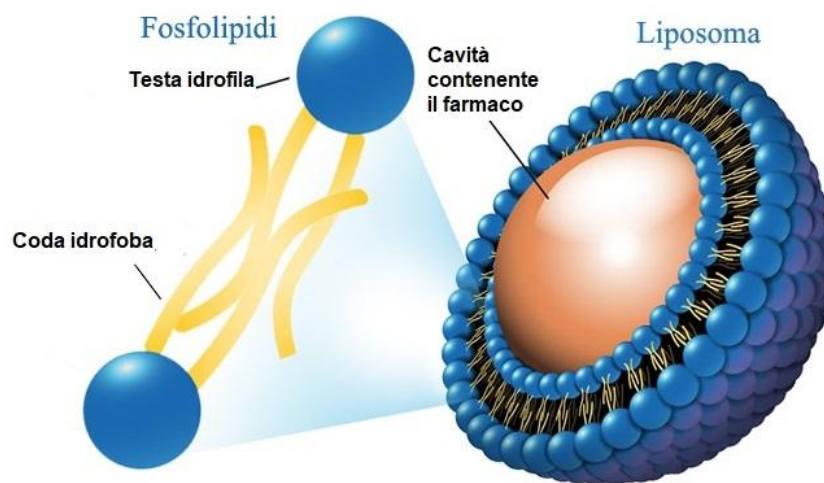


Fig. 29 – Rappresentazione grafica di un liposoma che mostra il guscio idrofobo formato da un doppio strato lipidico che racchiude una cavità idrofila utile per contenere il farmaco da veicolare all'interno dell'organismo.

Le loro dimensioni possono variare dai 10 nm al micrometro e sono dei validi carrier terapeutici considerato che sono biocompatibili, biodegradabili, molto stabili e capaci di incapsulare molecole idrofile nel loro core acquoso o di legare molecole idrofobiche al loro doppio strato lipidico (HILLAIREAU H AND COUVREUR P, 2009; WANG AZ ET AL., 2012). La loro superficie può essere funzionalizzata con l'aggiunta di ligandi in grado di aumentarne la specificità in caso di drug delivery. E' possibile inoltre creare liposomi pH-sensibili e termo-sensibili, in modo da attivarli per stimolare il rilascio del farmaco una volta raggiunto il sito tumorale (MILLS JK AND NEEDHAM D, 2004; SMALLBONE K ET AL., 2005). Alcune formulazioni di liposomi leganti DOXO ad azione

antitumorale sono già commercializzati e utilizzati in ambito terapeutico come, ad esempio, il *Caelyx* per il trattamento del tumore ovarico in stadio avanzato, del tumore mammario metastatico, del mieloma multiplo e del sarcoma di Kaposi correlato all'AIDS o il *Myocet* utilizzato per il trattamento del cancro metastatizzato della mammella nelle donne adulte.

L'utilizzo dei liposomi ha tuttavia alcune limitazioni dovute al fatto che tendono ad accumularsi al di fuori delle cellule bersaglio, rilasciano troppo velocemente il farmaco, hanno una scarsa stabilità di conservazione e una bassa efficienza di incapsulamento.

### 3.2.2 Le nanoparticelle

Attualmente gli sforzi dei ricercatori si sono concentrati sulla produzione di altri tipi di nanocarrier come le NPs costituite da materiali organici o inorganici. Le NPs devono avere determinate caratteristiche per svolgere in modo ottimale la loro funzione di trasportatori di farmaci. Devono essere stabili in ambiente fisiologico, non devono essere tossiche per l'organismo, devono riuscire ad oltrepassare le barriere biologiche presenti tra i capillari e il loro sito bersaglio, devono risultare "invisibili" al sistema immunitario in modo da evitare la loro opsonizzazione e la conseguente rimozione da parte dei macrofagi (STORM G ET AL., 1995; HILLAIREAU H AND COUVREUR P, 2009).

Le NPs possono essere di vario tipo: metalliche, magnetiche o polimeriche, ognuna con applicazioni specifiche. Quelle maggiormente utilizzate nel DDS sono le polimeriche.

#### 3.2.2.1 Le NPs polimeriche

Le NPs polimeriche sono dei sistemi nanostrutturati che possono essere preparati con polimeri naturali (eparina, destrano, collagene, chitosano) o polimeri sintetici (polietilenglicole, acido poliglutamico, acido polilattico). Hanno struttura sferica, dimensioni variabili tra 10 e 100 nm e rappresentano un'ottima strategia per

veicolare e accumulare il farmaco, a livello del sito tumorale. Possiedono un gran numero di caratteristiche desiderabili come biodegradabilità, biocompatibilità e stabilità colloidale che permette loro di prolungare la permanenza all'interno della circolazione sanguigna e che le rendono adatte per il Drug Delivery (HONG S.H ET AL., 2018). Possono raggiungere il sito bersaglio sia per DDS passivo, sfruttando l'effetto EPR del tumore, precedentemente descritto, che attivo, in quanto, come per i liposomi, la loro superficie può essere funzionalizzata con molecole in grado di guidarne il trasporto verso i siti target (RAKESH RK, 1999; ACHARYA S AND SAHOO SK, 2011; MIRAKABAD FST ET AL., 2014).

L'uptake delle NPs da parte delle cellule bersaglio dipende da vari fattori tra i quali le proprietà chimico-fisiche dei materiali usati per costruirle, ovvero la composizione chimica, le dimensioni, la forma, il rivestimento e quindi la carica superficiale (Fig.30). Quest'ultima sembra giocare un ruolo fondamentale nell'adesione con le cellule in quanto secondo alcuni studi, non sempre confermati, le NPs cationiche sembrano entrare più facilmente rispetto a quelle anioniche (ROSER M ET AL., 1998; CHITHRANI BD1 AND CHAN WC, 2007).

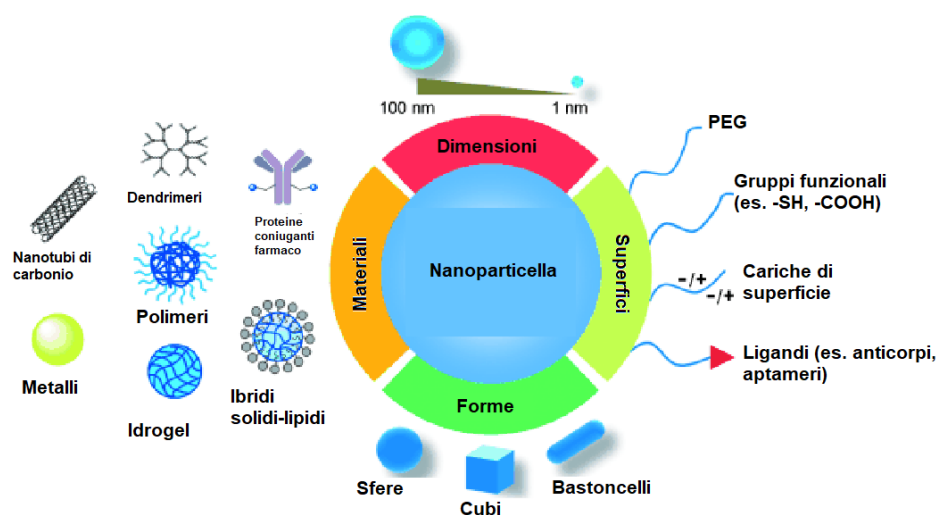


Fig. 30 – Schema riassuntivo delle caratteristiche principali costituenti le nanoparticelle quali: materiale, dimensione, superficie e forma.

Il principale meccanismo attraverso il quale le NPs entrano nelle cellule sembra essere l'endocitosi o l'endocitosi mediata da recettore nel caso di DDS attivo. Una volta all'interno della cellula, il rilascio del farmaco avviene o per diffusione attraverso la NP e/o per distruzione della NP attivo (KIM KT ET AL., 2019).

### 3.2.2.2 NPs a base di acido poli-(D,L-lattico-co-glicolico) (PLGA)

Negli ultimi decenni, l'interesse della ricerca si è spostato a formulare NPs costituite da polimeri naturali o sintetici, biocompatibili e già approvati nel loro uso dalla Food and Drug Administration (FDA) come ad esempio: l'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PGA), il poli-ε-caprolattone (PCL) o il poli(metil-metacrilato) (PMMA) (CAGEL M. ET AL., 2017).

In vari esperimenti, l'acido poli-(D,L-lattico-co-glicolico) (PLGA), il copolimero dell'acido lattico (PLA) e dell'acido glicolico (PGA), si è rivelato ottimale per la costruzione di NPs per il DDS in quanto biodegradabile, altamente biocompatibile, non antigenico e in grado di sostenere nel circolo sanguigno livelli adeguati di farmaco per un tempo prolungato (Fig.31) (PANYAM J AND LABHASETWAR V, 2003).

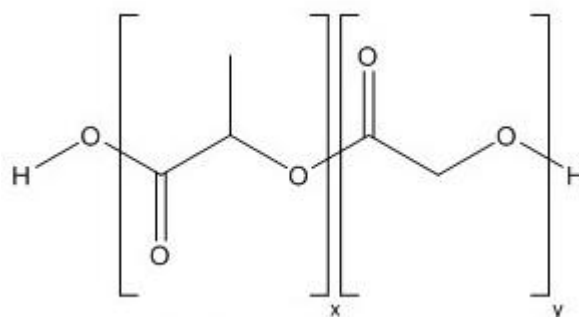


Fig. 31 – Struttura del monomero costituente l'acido poli-(D,L-lattico-co-glicolico) (PLGA).

Modulando il processo di polimerizzazione, è possibile preparare vari tipi di PLGA, in termini di peso molecolare e di



rapporto PLA:PGA. La diversa composizione di questi polimeri può influenzare la loro degradazione, il rilascio dei farmaci contenuti nelle PLGA-NPs, l'assorbimento cellulare e il loro destino *in vivo*. È stato osservato che il PLGA con PLA/PGA in rapporto 50:50 è quello più velocemente idrolizzabile (TAMADA JA AND LANGER R, 1993; MAKADIA HK AND SIEGEL SJ, 2011).

Le NPs-PLGA hanno una carica superficiale negativa a causa della struttura del polimero PLGA e, dal momento che la superficie cellulare, a pH fisiologico, presenta una debole carica negativa, la penetrazione di queste NPs-PLGA non è un processo favorito. Al contrario, NPs-PLGA funzionalizzate con un polimero cationico o con molecole in grado di ridurre la carica negativa superficiale, potrebbero incrementarne l'assorbimento e la velocità di ingresso nella cellula bersaglio (WUSIMAN A ET AL., 2019).

Al pari delle altre NPs anche le NPs di PLGA sono internalizzate nella cellula attraverso il processo di endocitosi o di endocitosi mediata da recettore in modo dose e tempo dipendente. Negli endosomi, a causa del pH acido presente al loro interno, la carica delle NPs passa da anionica a cationica. Questo switch di carica aiuta le NPs ad interagire con le membrane delle vescicole, destabilizzandole e permettendone la loro fuoriuscita. Solo il 15% delle NPs internalizzate riesce in tale processo. Nonostante ciò la quantità che si ritrova nel citoplasma è sufficiente per rilasciare il farmaco in modo sostenuto e prolungato nel tempo (PANYAM J AND LABHASETWAR V, 2003; VASIR JK AND LABHASETWAR V, 2007). All'interno delle cellule, le NPs di PLGA vengono poi idrolizzate in metaboliti biodegradabili, come l'acido lattico e l'acido glicolico, due composti normalmente presenti in quanto coinvolti in vari pathway fisiologici. L'acido lattico viene trasformato in piruvato per poi entrare nel ciclo di Krebs e degradato ulteriormente in acqua e CO<sub>2</sub> mentre l'acido glicolico è utilizzato come precursore per la sintesi di amminoacidi come la glicina (MAHAPATRO A AND SINGH K, 2011).

### 3.2.2.3 L'uso di sonde fluorescenti in nanomedicina: le cianine

Una tecnica diagnostica utilizzata nell'ambito delle NPs è l'imaging per fluorescenza. E' una tecnica facilmente applicabile, altamente sensibile e fortemente selettiva, oltre che dotata di un'elevata risoluzione. L'imaging che sfrutta la fluorescenza permette di valutare e localizzare i processi che avvengono all'interno di un organismo senza bisogno di ricorrere a una dissezione chirurgica. I ricercatori si sono focalizzati sulla produzione di sonde fluorescenti che emettono vicino all'area degli infrarossi (NIR, near-infrared) quindi intorno ai 650-900 nm, in quanto, in questo range di lunghezze d'onda l'autofluorescenza nei tessuti dovuta all'emoglobina è ridotta. Tali sonde vengono usate in nanomedicina incapsulandole all'interno di NPs polimeriche ottenendo così un incremento dell'intensità della fluorescenza, la protezione della sonda fluorescente dall'ambiente biologico ed evitando possibili interazioni con le proteine (VOLLRATH A. ET AL., 1994).

Le caratteristiche che devono possedere le sonde sono: buona solubilità in acqua, per evitare la loro aggregazione durante la sintesi, un alto coefficiente di assorbimento molare e fotostabilità nel solvente. Le sonde possono essere di due categorie: inorganiche e organiche. Quelle inorganiche si sono rivelate citotossiche, con costi di sintesi elevati e negli esperimenti fornivano risultati poco riproducibili in termini di quantificazione. Le sonde di tipo organico, di contro, si sono rivelate ottime candidate per il loro utilizzo in nanomedicina grazie capacità di legarsi a una tipologia più ampia di materiali, alla loro fotostabilità e ai loro elevati livelli di fluorescenza mantenuti per tempi molto lunghi (MISHRA A. ET AL., 2000). Tra le sonde di tipo organico ci sono le cianine (polimetin-cianine), piccole molecole caratterizzate da due anelli aromatici eterociclici contenenti un atomo di azoto carico positivamente, legati a una polimetina. Le polimetine, caratterizzate da un assorbimento nella regione vicino agli infrarossi, sono le pentametine (Cy5). Le cianine vengono classificate in 4 sottotipi: streptopolimetine cationiche,

streptopolimetine anioniche, streptopolimetine neutre e cianine squarene-zwitteroniche (Fig.32). Tutte queste categorie sono caratterizzate da una forma geometrica stabile di tipo trans e a seconda di come vengono sintetizzate il loro range di emissione può variare (LUO S. ET AL., 2011)

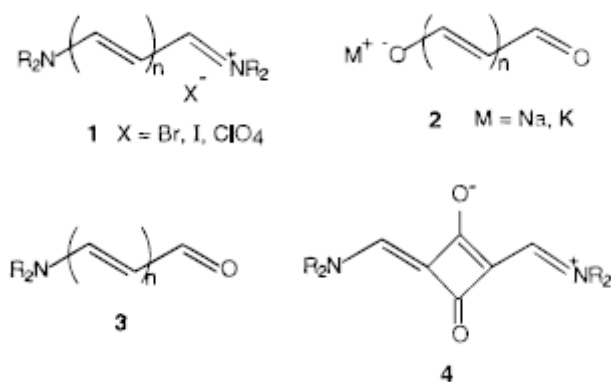


Fig. 32 – Classificazione grafica delle cianine: 1) streptopolimetine cationiche; 2) streptopolimetine anioniche, 3) streptopolimetine neutre; 4) cianine squarene-zwitteroniche.

#### 3.2.2.4 NPs di PLGA leganti DOXO

Numerose pubblicazioni hanno dimostrato come incapsulare la DOXO nei liposomi porti a un miglioramento dell'attività antitumorale del farmaco. Nonostante ciò due fattori ne hanno limitato l'utilizzo: l'instabilità del legame tra DOXO e liposomi e rilascio troppo rapido del farmaco che porterebbe quest'ultimo a essere esposto all'azione di enzimi metabolici con conseguente inattivazione (ACHARYA S AND SAHOO SK, 2011). Partendo da questi risultati e cambiando tipologia di nanocarrier è stato osservato che NPs di PLGA sono un efficace sistema per veicolare e controllare il rilascio della DOXO all'interno dell'organismo riducendone così la tossicità sistemica, incrementandone l'efficacia terapeutica e rendendo la terapia molto più accettabile da parte del paziente (YOO HS ET AL., 1999).

### 3.3 Scopo

Lo scopo di questo secondo progetto di ricerca è quello di sintetizzare e caratterizzare chimicamente e biologicamente nuovi materiali nanostrutturati per uso teranostico in ambito chemioterapico. In particolare, in questo studio sono state sintetizzate delle NPs polimeriche di PLGA, contenenti il noto chemioterapico DOXO ed un sistema fluorescente, chiamato dimero, appartenente alla famiglia delle cianine, e in grado di emettere nella regione del vicino IR. Le radiazioni IR sono ben più penetranti di quelle visibili e ciò può essere sfruttato per lo sviluppo di agenti teranostici contenenti una sonda fluorescente che ne permetta la localizzazione *in vitro* e *in vivo*. Gli effetti citotossici delle NPs caricate con la DOXO da sola o in combinazione con il dimero fluorescente, sono stati valutati in cellule umane di neuroblastoma SH-SY5Y, le cui caratteristiche sono già state riportate nel progetto precedentemente descritto. L'azione citotossica delle varie formulazioni di NPs è stata confrontata con quella della DOXO in soluzione, al fine di capire se, a parità di dose, le NPs siano più efficaci nell'indurre danno. Questi studi sono stati fatti in collaborazione con ricercatori del Dipartimento di Chimica dell'Università di Firenze.

### 3.4 Materiali e metodi

#### 3.4.1 Sintesi del dimero fluorescente

La sintesi del dimero inizia da quella della cianina che ne è un costituente: il trimetil-benzoindolo etilato (Fig. 33). Il processo di sintesi è stato effettuato come descritto in letteratura (PATONAY G. ET AL., 2005), apportando alcune modifiche.

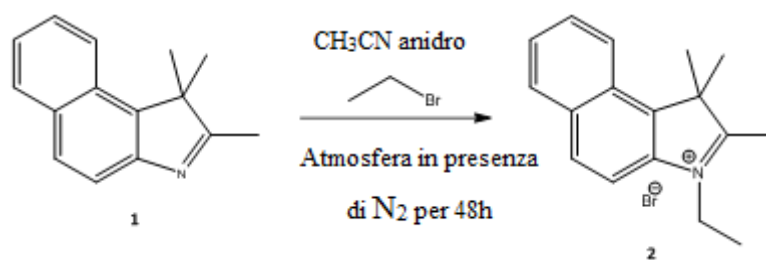


Fig. 33 - Schema di reazione della sintesi del trimetil-benzoindolo etilato.

In un pallone da 100 mL con rubinetto, si scioglie a caldo e sotto agitazione, il 2,3,3-trimetil-4,5-benzo-3H-indolo (Fig. 23-1) (25 mmoli) in aceto nitrile anidro sotto flusso di azoto: la dissoluzione è piuttosto lenta e il solido colora in giallo la soluzione. Alla miscela di reazione si aggiunge bromoetano (37,5 mmoli) e si mantiene, sotto flusso di azoto, per 48 ore. Si osserva, nel corso della reazione, la formazione di un precipitato oleoso violaceo. La reazione viene monitorata con TLC su supporto di silice, utilizzando una miscela eluente esano/acetato di etile 50:50 v/v. Il 2,3,3-trimetil-4,5-benzo-3H-indolo che non ha reagito viene rimosso. Il trimetil-benzoindolo etilato (Fig.34-2) in soluzione viene recuperato evaporando al rotavapor il solvente  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Il residuo viene ricristallizzato da  $\text{CH}_3\text{CN}$ /acetato di etile (resa: 35%).

Una volta ottenuto il trimetil-benzoindolo etilato, il passo successivo consiste nella sintesi del dimero fluorescente (Fig. 34-5) seguendo, anche in questo caso, la metodologia presente in letteratura (PATONAY G. ET AL., 2005).

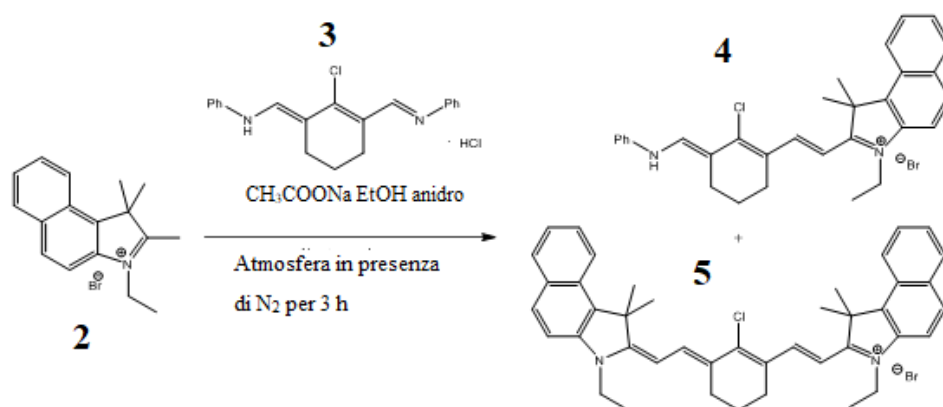


Figura 34 - Schema di reazione della sintesi del dimero fluorescente.

In un pallone da 100 mL con rubinetto, si sciolgono a caldo e sotto agitazione il reagente di Vilsmeier-Haack (Fig. 34-3) (1,57 mmoli) e acetato di sodio (3,14 mmoli) in etanolo anidro sotto flusso di azoto. La soluzione si colora in rosso intenso. Successivamente si aggiunge, goccia a goccia, per 1h, il trimetil-benzoindolo etilato (3,14 mmoli) preventivamente solubilizzato in etanolo anidro sotto flusso di azoto. Tale procedura viene effettuata continuando a scaldare e mantenendo in agitazione la soluzione che virerà dal rosso al verde. La miscela di reazione viene ulteriormente scaldata a riflusso per 3 ore monitorando il decorso della reazione con TLC su supporto di silice e utilizzando come eluente una miscela di CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (95:5 v/v).

Utilizzando 2 equivalenti di trimetil-benzoindolo etilato ed 1 equivalente di reagente di Vilsmeier-Haack si ottiene una miscela dei composti 4 (Fig. 34-4) e del dimero fluorescente, quest'ultimo presente come prodotto maggioritario.

La purificazione del dimero fluorescente dal composto 4, dal reagente di Vilsmeier-Haack non reagito e dalle altre impurezze, viene effettuata tramite l'ausilio di una colonna cromatografica impaccata con

silice, utilizzando come eluente una miscela di CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (95:5 v/v). Dopo rimozione del solvente tramite distillazione a bassa pressione, il dimero fluorescente è ricristallizzato da etanolo/etere dietilico (resa: 200 mg, 20%).

#### 3.4.2 Caratterizzazione del dimero fluorescente (5) e della DOXO mediante spettroscopia di assorbimento UV-Vis

Gli assorbimenti del dimero fluorescente (5) e della DOXO in soluzione acquosa e in DMSO vengono registrati mediante spettroscopia UV-visibile, nell'intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 350 e 950 nm. Per la DOXO si valuta l'assorbimento anche in tampone DMGA 10 mM a pH 4. Gli spettri di assorbimento UV-vis sono stati registrati con uno spettrofotometro a doppio raggio JASCO V-670, utilizzando cuvette di quarzo con cammino ottico di 1 cm, con velocità di scansione di 200 nm/min.

#### 3.4.3 Sintesi delle diverse formulazioni di NPs

La sintesi delle NPs polimeriche di PLGA contenenti il dimero fluorescente e/o DOXO è stata condotta seguendo un protocollo di nanoprecipitazione presente in letteratura (NORELLI D., 2017), ottimizzando alcuni passaggi, nel tentativo di ottenere: sistemi con fluoroforo e farmaco a concentrazione compresa tra 5 e 50µM, una diminuzione della polidispersione, dimensioni delle NPs inferiori ai 200 nm.

La formazione di NPs mediante tale procedura è istantanea e l'intero processo avviene in un unico passaggio. In breve, la nanoprecipitazione richiede l'impiego di due solventi miscibili. Idealmente, il polimero deve essere solubile soltanto in uno dei due, e con esso anche il farmaco e il dimero che si desiderano adsorbire nel "core" della NP. L'altro, solvente, solitamente acqua, viene indicato pertanto come "non solvente". Al suo interno è presente un tensioattivo con la funzione di stabilizzante del nanosistema da formare. Quando la soluzione di polimero è aggiunta al non solvente, una rapida

desolvatazione del polimero innesca la nucleazione delle NPs, che si blocca non appena esse raggiungono la stabilità. A causa della loro composizione chimica, le NPs polimeriche sono insolubili in solventi acquosi, ma all'interno di questi rimangono di regola perfettamente sospese (Fig.35).

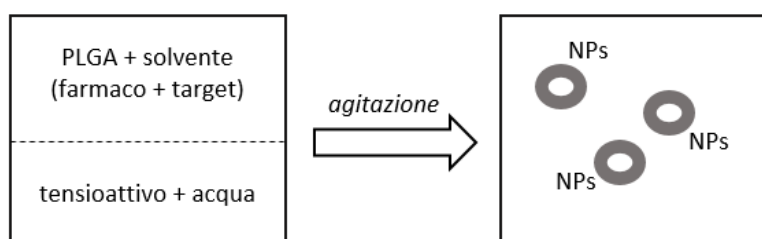


Fig. 35 – Schema generale del processo di nanoprecipitazione.

Per la sintesi di NPs di PLGA come tali, ad una soluzione acquosa di pluronic® F-127 ( $1.19 \cdot 10^{-3}$  mmoli) si aggiunge goccia a goccia, in un tempo di 10 minuti, una soluzione in acetone contenente PLGA ( $1.74 \cdot 10^{-4}$  mmoli) e si procede a vigorosa agitazione a 40 °C. La sospensione opalescente ottenuta viene lasciata sotto agitazione alla medesima temperatura per altri 10 minuti circa, al termine dei quali si lascia raffreddare. Quindi, la si concentra al rotavapor fino ad un volume di circa 2.5 mL.

Per sintetizzare NPs di PLGA funzionalizzate con il solo dimero o con la sola DOXO, o con dimero e DOXO, si esegue la stessa procedura usata per la formazione delle NPs di PLGA come tali ma alla soluzione acquosa di pluronic® F-127 ( $3,80 \cdot 10^{-3}$  mmoli), oltre ad aggiungere goccia a goccia, in 20 minuti, una soluzione in acetone contenente PLGA ( $5,63 \cdot 10^{-4}$  mmoli), si aggiungono anche o il solo dimero fluorescente (5) ( $2,27 \cdot 10^{-3}$  mmol), o la sola DOXO ( $2,53 \cdot 10^{-3}$  mmoli) o entrambi. La sospensione viene mantenuta a 40 °C sotto vigorosa agitazione. Prima di aggiungerli alla miscela, il dimero e la DOXO sono stati solubilizzati in DMSO, quest'ultimo usato a concentrazione massima del 10% in modo da evitare la citotossicità del composto nei successivi studi biologici. La sospensione ottenuta di color rosso mattone viene lasciata sotto



agitazione alla medesima temperatura per altri 20 minuti circa, al termine dei quali si lascia raffreddare. Quindi, la si concentra al rotavapor e la si microfiltra con filtri da 450 nm modo da ottenere un miglior indice di polidispersione. La sospensione delle NPs viene separata dai componenti non assorbiti tramite una procedura di dialisi (MWCO: 8-10 kDa) contro acqua a 37 °C. La dialisi è stata portata avanti fino al raggiungimento di una concentrazione costante di dimero e DOXO nel bagno esterno (20 ore).

Successivamente sono stati prodotti degli spettri di assorbimento delle diverse formulazioni delle NPs, in mezzo acquoso, per valutare se ci fossero delle variazioni nella fluorescenza dovute a possibili interazioni tra fluoroforo e farmaco una volta incapsulati all'interno delle NPs.

#### 3.4.4 Sintesi delle NPs con acido fosfotungstico

Per poter rendere visibili le NPs al microscopio elettronico, sono state sintetizzate NPs+dimero e/o DOXO contenenti anche l'acido fosfotungstico (HPT), un composto opaco agli elettroni. A una soluzione acquosa tamponata a pH 7.4 con PBS contenente PluronicF-127 (16.5 eq) è stato aggiunto HPT in forte forte eccesso (277 eq). Il precipitato bianco formatosi viene ridisciolto riaggiustando il pH attorno alla neutralità usando una soluzione di HCl e mantenendo la soluzione a 40°C. A tale soluzione è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione in acetone contenente PLGA (2.4 eq), dimero fluorescente (1 eq) e Doxo (11 eq). Per promuovere la solubilizzazione del dimero fluorescente e della DOXO è stato usato DMSO con una concentrazione non più alta del 10% sul volume finale in modo da evitare la citotossicità del composto. Al termine del gocciolamento, il pH della soluzione viene riaggiustato attorno alla neutralità. Dopo 20' di agitazione a 40°C, la miscela di reazione è stata lasciata raffreddare a temperatura ambiente. La sospensione di NPs caricate col dimero fluoroforo e/o il farmaco e HPT sono state sottoposte a preventiva filtrazione (filtri da 450 nm) in modo da ottenere un miglior indice di polidispersione. La sospensione acquosa

di NPs è stata poi ulteriormente purificata tramite dialisi contro PBS dai componenti non reagiti in modo da poter successivamente valutare la concentrazione di fluoroforo e/o farmaco effettivamente internalizzato.

#### 3.4.5 Misure di Dynamic Light Scattering (DLS) e potenziale zeta

Per valutare le dimensioni delle NPs e la relativa carica superficiale, le varie formulazioni acquose sono state caratterizzate mediante misure di Dynamic Light Scattering (DLS) e potenziale zeta (Zeta Potential Analysis).

La tecnica DLS permette di calcolare le dimensioni delle NPs e consiste nel misurare le variazioni d'intensità della radiazione diffusa in funzione del tempo per ogni campione, dopo che questo è stato illuminato da un raggio laser. Tali variazioni d'intensità sono generate dai moti browniani delle NPs all'origine dello scattering. A parità di temperatura e di viscosità, le NPs più piccole si muovono più rapidamente, creando fluttuazioni più repentine dell'intensità della radiazione diffusa; all'aumentare delle dimensioni, il movimento è più lento e tali sono le variazioni d'intensità osservate. Le dimensioni delle NPs sono state risolte mediante Brookhaven 90Plus Particle Size Analyzer, impostando un angolo di scattering di 90° e la temperatura a 25 °C.

Il potenziale zeta è un indice della stabilità delle NPs e dipende dalla densità di carica superficiale (negativa o positiva) attorno alla NP. Si analizzano campioni delle varie formulazioni di NPs diluiti in acqua con concentrazioni di dimero fluorescente (5) nel range  $3 - 3.5 \cdot 10^{-6}$  M e di DOXO nel range  $7 \cdot 10^{-6} - 4 \cdot 10^{-5}$  M.

#### 3.4.6 Caratterizzazione del dimero fluorescente (5) e della DOXO mediante spettroscopia di fluorescenza

L'emissione del dimero fluorescente (5) ( $1 \cdot 10^{-6}$  M) viene misurata sia in forma libera (in etanolo, in soluzione acquosa con un 10% di DMSO) che nelle NPs eccitando in tutti i casi a 740 nm ed osservando il segnale relativo alla radiazione emessa nell'intervallo di lunghezze

d'onda compreso tra 750 e 900 nm.

L'emissione della DOXO ( $1 \cdot 10^{-6}$  M) viene misurata sia in forma libera (in soluzione acquosa, in DMSO e in tampone DMGA 10 mM a pH 4) che nelle NPs eccitando in tutti i casi a 480 nm ed osservando il segnale relativo alla radiazione emessa nell'intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 490 e 700 nm.

Gli spettri di fluorescenza sono stati registrati con uno spettrofotometro Perkin-Elmer LS 55, utilizzando cuvette di quarzo con cammino ottico di 1 cm, nel range spettrale di lunghezze d'onda compreso tra 490 e 900 nm con velocità di scansione di 120 nm/min e larghezza delle fenditure di 15 nm.

#### 3.4.7 Analisi della cinetica di rilascio della DOXO da parte delle NPs

La cinetica di rilascio della DOXO è stata testata a 37 °C sia in acido 3,3-dimetilglutarico (DMGA) 10 mM a pH 4, sia in tampone PBS 10 mM a pH 7,4. In due membrane da dialisi (MWCO: 8 – 10 kDa), sono state inserite separatamente due aliquote da 1 mL ciascuna di NPs leganti il dimero fluorescente e la DOXO. Le membrane sono state immerse nei due diversi tamponi, mantenuti sotto agitazione costante. In entrambi i casi, a intervalli regolari di tempo, per un totale di 220 ore, sono stati prelevati 2 mL della sospensione per analisi spettroscopica UV-visibile. La quantità di DOXO rilasciata dalle NPs viene calcolata utilizzando il valore del coefficiente di estinzione molare in acqua a 481 nm ( $\epsilon_{481} = 15396 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), dove per coefficiente di estinzione molare si intende l'assorbanza specifica di una soluzione a concentrazione molare unitaria, ad una data lunghezza d'onda, attraverso una cella di lunghezza ottica unitaria (1 cm). L'aliquota prelevata è stata poi reinserita nel rispettivo bagno di tampone.

#### 3.4.8 Saggio di citotossicità

La vitalità delle cellule è stata misurata usando il kit CellTiter-Blue® Reagent (Promega, Milano, Italia), il cui principio è stato descritto nella sezione “Materiali e metodi” del primo progetto di questa tesi. Le cellule SH-SY5Y sono state seminate in una piastra a 96 pozzetti ( $1 \times 10^4$

cellule/pozzetto) e trattate per 24, 48 e 72 ore con: DOXO in soluzione, (NPs+DOXO), (NPs+dimero+DOXO) (concentrazione finale della DOXO sia libera che assorbita alle NPs = 0,6  $\mu$ M; concentrazione del dimero = 0,3  $\mu$ M). La concentrazione di DOXO da usare è stata scelta dopo prove preliminari in cui il farmaco è stato testato a concentrazioni finali nel mezzo di coltura variabili tra 0,1 e 5  $\mu$ M. Per escludere un possibile effetto sulla vitalità cellulare delle sole NPs o del dimero, sia libero che assorbito alle NPs, abbiamo effettuato esperimenti di tossicità trattando le cellule con queste preparazioni (concentrazione del dimero = 0,3  $\mu$ M) per 24, 48 e 72 ore. Al termine del trattamento, il reagente CellTiter-Blue® è stato aggiunto in ogni pozzetto e incubato per 2 ore a 37 °C. La fluorescenza è stata misurata in un lettore multi piastre Infinite M200PRO (Tecan, Svizzera) usando come lunghezza d'onda 590 nm.

#### 3.4.9 Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM)

Una volta dimostrato, mediante il saggio di citotossicità, che la formulazione delle NPs più efficace ad indurre danno cellulare era quella con assorbiti sia il dimero che la DOXO, abbiamo con questa trattato le cellule SH-SY5Y per valutare il meccanismo attraverso il quale le NPs entrano al loro interno e il tipo di danno indotto. Come precedentemente riportato abbiamo usato NPs con HPT. Cellule SH-SY5Y sono state piastrate in una piastra multipozzetto da 6 ( $5 \times 10^5$ /pozzetto) e trattate con solo NPs con dimero e DOXO (0,6  $\mu$ M) in tre differenti tempi: 30 minuti, 1 e 2 ore. Successivamente le cellule sono state staccate e centrifugate per ricavare il pellet che è stato in seguito fissato in glutaraldeide 4% in buffer cacodilato di sodio (0,1 M, pH 7,4) per 1 ora a temperatura ambiente e post-fissato in tetrossido di osmio freddo all'1% in buffer fosfato (pH 7,4) per 1 ora a temperatura ambiente. Il pellet è stato disidratato in acetone, passato attraverso l'ossido di propilene e incluso in Eom 812. Le sezioni ultrasottili sono state colorate con Uranylless e nitrato di bismuto alcalino. Il tutto è stato esaminato con un microscopio elettronico Jeol (Giappone, 80 kV).

#### 3.4.10 Localizzazione intracellulare della DOXO mediante microscopia confocale a scansione laser

Cellule aderenti di neuroblastoma SH-SY5Y sono state seminate su vetrini coprioggetto ( $3 \times 10^5$  cellule) e trattate con: DOXO, (NPs+DOXO) e (NPs+dimero+DOXO) per 2 differenti tempi: 2 e 24 ore. Sono stati allestiti anche vetrini coprioggetto con cellule di controllo non trattate. Alla fine del trattamento, le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 2% per 10 minuti a temperatura ambiente. La fluorescenza emessa dalla DOXO è stata osservata usando un microscopio confocale a scansione Leica TCS SP5 (Leica, Mannheim, Germania) equipaggiato con una fonte laser ad argon ( $\lambda$  eccitazione 480 nm) e con un obiettivo 63x a immersione in olio. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

#### 3.4.11 Valutazione della DOXO intracellulare mediante citofluorimetria a flusso

Cellule SH-SY5Y sono state seminate in piastre da 6 pozzetti ( $3 \times 10^5$  cellule) e trattate con: DOXO, (NPs+DOXO) e (NPs+dimero+DOXO) per 2 e 24 ore. Alla fine del trattamento, le cellule sono state staccate, centrifugate a 113g per 10 minuti e il pellet risospeso in PBS, pH 7.4. Allo stesso modo sono stati preparati e processati campioni di controllo non trattati. Le varie preparazioni sono state analizzate al citofluorimetro FACSCanto (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) ( $\lambda$  eccitazione 480 nm).

#### 3.4.12 Analisi statistica

I dati ottenuti sono stati riportati come media  $\pm$  SEM di almeno 3 esperimenti indipendenti. L'analisi statistica della varianza è stata eseguita mediante il Test One way ANOVA seguito dal Test di Student-Newman-Keuls per la comparazione multipla dei risultati. I calcoli sono stati fatti usando come programma statistico GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Valori di  $P < 0.05$  sono stati considerati significativi.

### 3.5 Risultati

#### 3.5.1 Caratterizzazione del dimero fluorescente (5) e della DOXO mediante spettroscopia di assorbimento UV-Vis

La lunghezza d'onda massima di assorbimento del dimero in soluzione dipende dal solvente in cui è disciolto: in soluzione acquosa la  $\lambda_{\max} = 688$ , nm in DMSO  $\lambda_{\max} = 832$  nm. Il massimo di assorbimento in DMSO mostra una maggiore intensità rispetto a quello in soluzione acquosa (Fig.36).

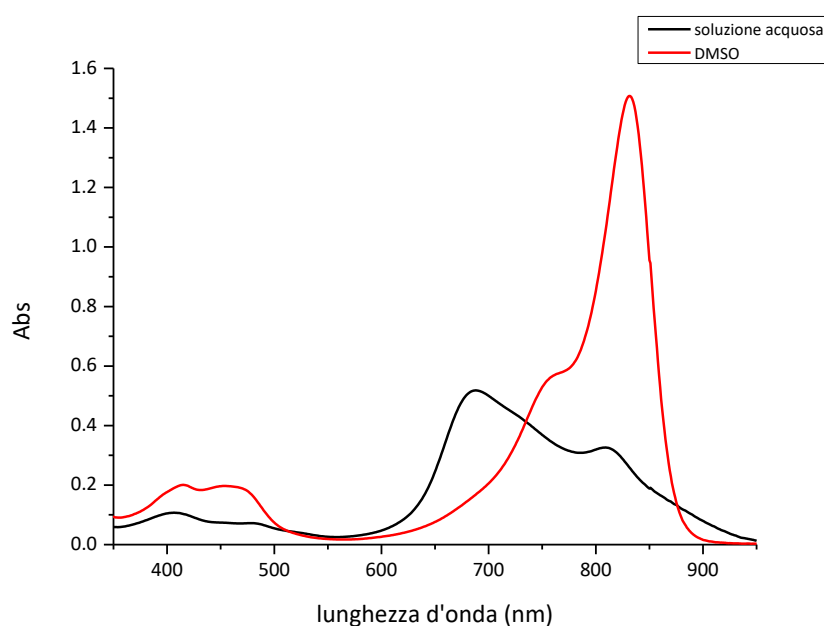


Fig. 36 - Spettri di assorbimento di soluzioni di dimero a concentrazione  $1 \cdot 10^{-5}$  M in acqua e in DMSO  $\lambda_{\max}$  in soluzione acquosa = 688 nm;  $\lambda_{\max}$  in DMSO = 832 nm.

In particolare, lo spettro di assorbimento del dimero in acqua mostra una banda con due massimi a 688 e 809 nm, mentre quello in DMSO un massimo a 832 nm ed una spalla a circa 755 nm, che possono essere attribuiti al sistema coniugato della struttura cianinica (transizione  $\pi \rightarrow \pi^*$ ). Entrambi gli spettri presentano anche una banda larga e poco intensa tra 350 e 550 nm, ma nello spettro in soluzione acquosa la porzione con massimo a circa 400 nm è maggiormente visibile rispetto a quella a circa 480 nm.

La lunghezza d'onda massima di assorbimento della DOXO è la stessa nel solvente acquoso, in DMSO e in DMGA:  $\lambda_{\max} = 481$  nm (Fig.37). Gli spettri di assorbimento in acqua, in DMSO e in tampone DMGA mostrano un'unica banda con massimo a 481 nm ed una spalla a circa 535 nm.

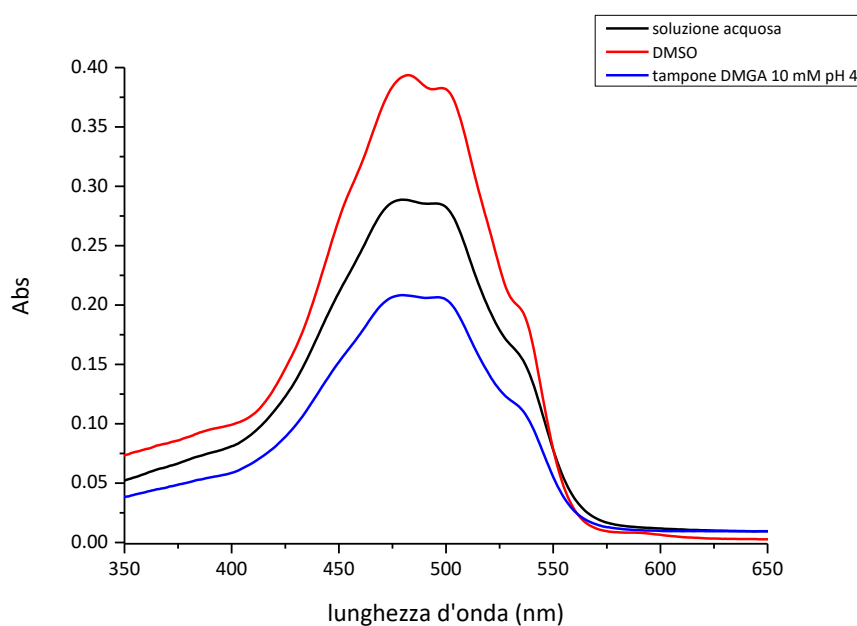


Fig. 37 - Spettri di assorbimento di soluzioni di doxorubicina a concentrazione  $1.82 \cdot 10^{-5}$  M in acqua,  $1 \cdot 10^{-5}$  M in DMSO e  $1.15 \cdot 10^{-5}$  M in tampone DMGA 10 mM a pH 4);  $\lambda_{\max}$  in soluzione acquosa, tampone DMGA= 481 nm;  $\lambda_{\max}$  in DMSO = 482 nm.

Anche i coefficienti di estinzione molare del dimero (Tab.4) variano in base al solvente in cui è disciolto, mentre rimangono molto simili tra loro quelli della DOXO.

	<i>dimero fluorescente (5)</i>	<i>Doxorubicina</i>
<i>soluzione acquosa</i>	$\epsilon_{808} = 27364 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $\epsilon_{688} = 51873 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\epsilon_{481} = 15396 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
<i>DMSO</i>	$\epsilon_{832} = 193666 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\epsilon_{482} = 13951 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
<i>tampone DMGA 10 mM pH 4</i>	-----	$\epsilon_{481} = 15173 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Tab. 4 - Coefficienti di estinzione molare del dimero e della DOXO in base al solvente nel quale sono disciolti.

### 3.5.2 Caratterizzazione delle NPs con assorbimenti dimero fluorescente (5) o DOXO mediante spettroscopia di assorbimento UV-vis

Lo spettro di assorbimento tra 600 e 900 nm della sospensione acquosa di (NPs+DIMERO) è molto simile a quella del solo dimero in DMSO, e differisce notevolmente dallo spettro del dimero in soluzione acquosa (Fig.38). Le proprietà di assorbimento del dimero all'interno dell'ambiente lipofilo delle NPs, quindi, si avvicinano maggiormente a quelle del solo dimero in un solvente polare aprotico come il DMSO piuttosto che a quelle in un solvente polare protico come l'acqua. Per questo motivo, nonostante le sospensioni di NPs siano in mezzo acquoso, per calcolare la quantità di dimero al loro interno, è stato usato il coefficiente di estinzione molare in DMSO a 832 nm.



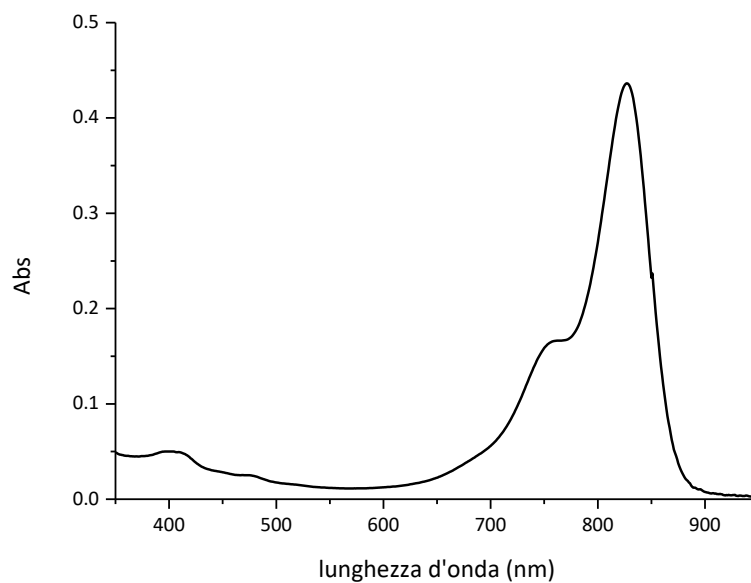


Fig. 38 - Spettro di assorbimento della sospensione acquosa di NPs con dimero assorbito ( $2.20 \cdot 10^{-5}$  M).

Lo spettro di assorbimento della sospensione acquosa di NPs con DOXO è molto simile a quella della sola DOXO in tutti i solventi usati (Fig. 39) con un picco intorno a 480 nm.

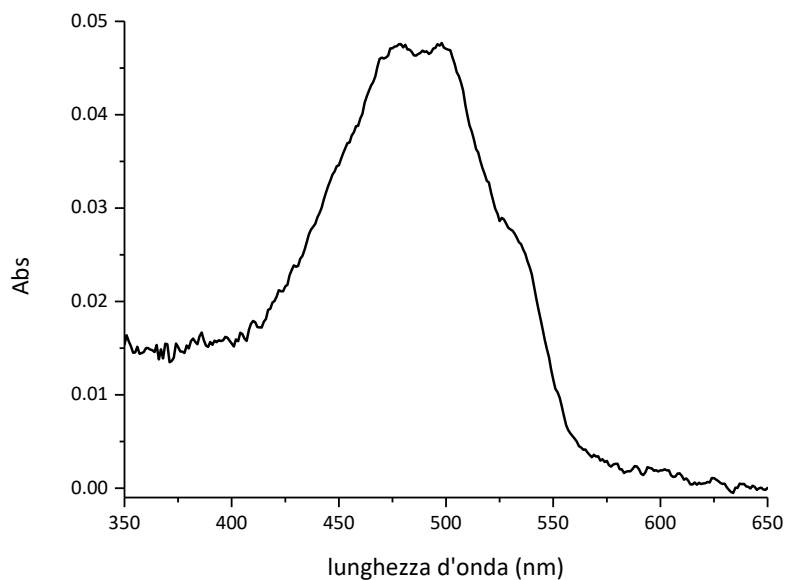


Fig. 39 - Spettro di assorbimento della sospensione acquosa di NPs con DOXO assorbita ( $5.81 \cdot 10^{-6}$  M).

### 3.5.3 Caratterizzazione delle NPs con assorbitori fluorescente (5) e DOXO mediante spettroscopia di assorbimento UV-vis

Lo spettro di assorbimento della sospensione acquosa di NPs contenenti dimero e DOXO è molto simile a quello delle NPs con solo dimero che hanno un picco massimo di assorbimento intorno a 830 nm e un segnale tra 350 e 550 nm (Fig.40).

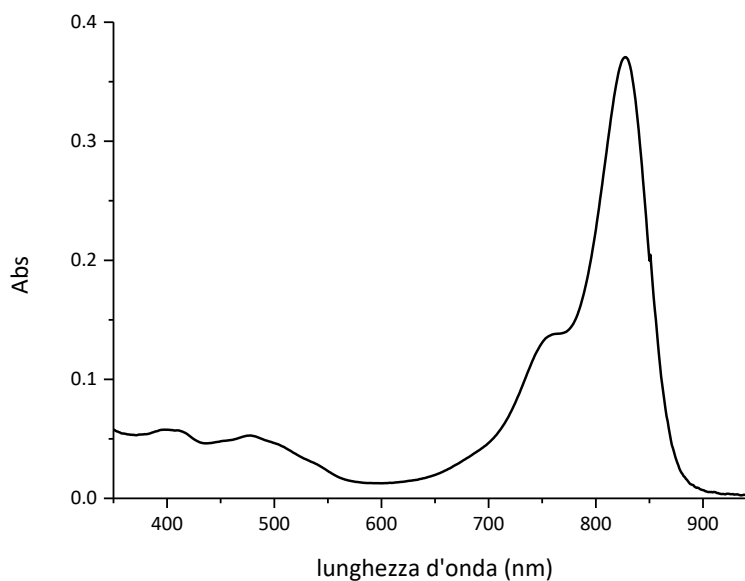


Fig 40 - Spettri di assorbimento della sospensione acquosa di NPs contenenti dimero ( $3.75 \cdot 10^{-5}$  M) e DOXO ( $6.79 \cdot 10^{-5}$  M).

### 3.5.4 Confronto tra le proprietà di assorbimento delle varie formulazioni di NPs

In Fig. 41 sono confrontati tra loro gli spettri di assorbimento delle diverse formulazioni di NPs in mezzo acquoso.

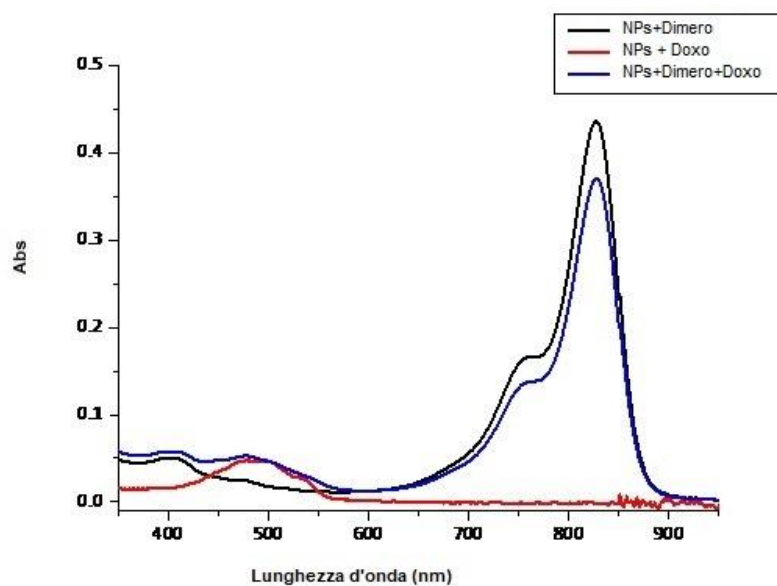


Fig. 41 - Spettri di assorbimento delle varie formulazioni: NPs+Dimero ( $2,20 \cdot 10^{-5}$  M), NPs+DOXO ( $5,81 \cdot 10^{-6}$  M), NPs+Dimero ( $3,75 \cdot 10^{-5}$  M) + DOXO ( $6,79 \cdot 10^{-5}$  M).

L'analisi mediante spettrometro a fluorescenza ha dimostrato che i due componenti, dimero e DOXO, quando contemporaneamente presenti, non si influenzano a vicenda. Come si può effettivamente osservare dagli spettri di fluorescenza (Fig. 41) si ha un massimo di assorbimento a 832 nm per il dimero ed a 481 nm per la DOXO per tutte le formulazioni analizzate.

Lo spettro tra 350 e 550 nm è il risultato della sovrapposizione degli spettri di assorbimento del dimero e della DOXO. In particolare, la banda a 400 nm sembra essere dovuta solo all'assorbimento del dimero, mentre quella con massimo a 481 nm deriverebbe solo dal contributo della DOXO, essendo l'assorbimento del fluoroforo a 480 nm trascurabile rispetto a quello del farmaco. Per questo motivo, nei successivi calcoli relativi alla quantificazione della DOXO all'interno delle NPs verrà trascurato il contributo del dimero.

### 3.5.5 Misure di Dynamic Light Scattering (DLS) e potenziale zeta

Nella Tab.5 sono riportati i valori delle dimensioni medie delle NPs in sospensione e le misure di potenziale zeta per le varie preparazioni.

	<u>diametro medio</u> (nm)	<u>potenziale zeta medio</u> (mV)
<u>NPs di solo PLGA</u>	183.3 ± 1.6	-28.23 ± 0.59
<u>NPs dimero</u>	138.2 ± 1.4	-19.70 ± 0.61
<u>NPs doxo</u>	135.1 ± 1.6	-23.37 ± 0.65
<u>NPs dimero + doxo</u>	131.1 ± 2.8	-7.57 ± 2.24

Tab. 5 – Valori delle dimensioni medie delle NPs in sospensione e le misure di potenziale zeta per le varie preparazioni.

Le NPs di solo PLGA risultano di poco più grandi rispetto a quelle funzionalizzate con il dimero e/o la DOXO che hanno dimensioni medie comprese nel range 110 – 140 nm.

I valori di potenziale zeta delle varie preparazioni di NPs indicano la presenza di una carica negativa sulla superficie delle NPs che genera una repulsione di carattere elettrostatico tra le stesse, impedendone così l'aggregazione e rendendo i vari sistemi stabili. Da notare come le preparazioni di NPs con dimero e DOXO hanno un valore di potenziale zeta significativamente inferiore rispetto a quello delle altre preparazioni di NPs. Nessuna variazione nel diametro medio delle nanoparticelle è stata rilevata dopo l'aggiunta dell'acido fosforico utilizzato per le preparazioni di NPs da visualizzare al TEM (dato non mostrato).

### 3.5.6 Caratterizzazione del dimero fluorescente (5) in soluzione e assorbito nelle NPs mediante spettroscopia di fluorescenza

In Fig.42. sono mostrati gli spettri di emissione del dimero in etanolo, tipico solvente usato per studiare la fluorescenza delle cianine, in soluzione acquosa contenente il 10% di DMSO, e del dimero all'interno delle NPs con o senza DOXO.

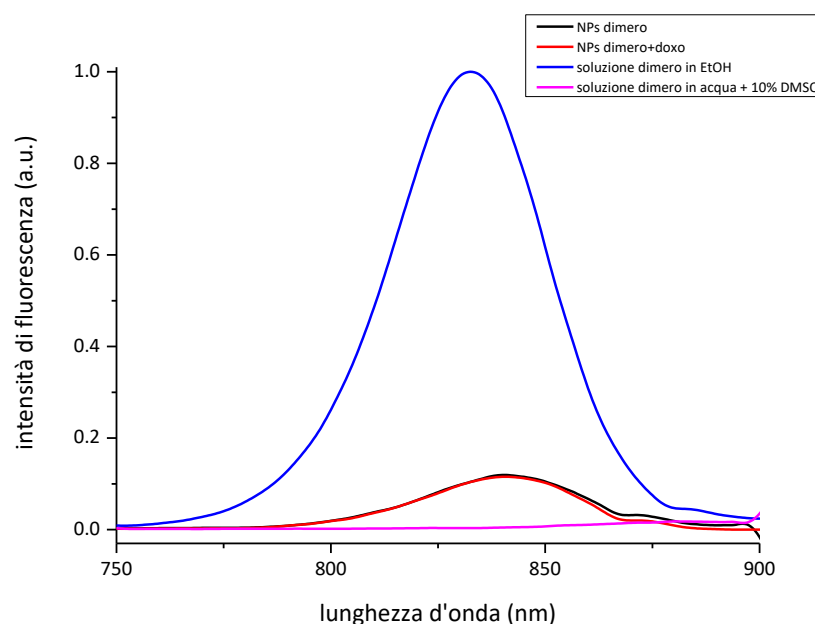


Fig. 42 - Spettri di emissione di fluorescenza delle sospensioni acquose di NPs (con solo dimero), con dimero e DOXO, delle soluzioni del dimero in EtOH ed in acqua con 10% di DMSO. Concentrazione del dimero in sospensione/soluzione:  $1 \cdot 10^{-6}$  M.  $\lambda_{ecc} = 740$  nm.

Gli spettri di emissione delle NPs contenenti solo dimero e delle NPs con dimero e DOXO sono pressoché uguali, suggerendo che la presenza della DOXO non modifica lo spettro di emissione del fluoroforo: in entrambi i casi è presente un'unica banda a 840 nm.

Lo spettro di emissione del dimero in etanolo presenta anche esso un picco massimo prossimo a quello del dimero assorbito nelle NPs con o senza DOXO, anche se di maggiore intensità.

L'emissione del fluoroforo in mezzo acquoso è completamente spenta a causa dei fenomeni di quenching dovuti ai moti collisionali con le molecole di acqua.

### 3.5.7 Caratterizzazione della DOXO in soluzione e assorbita nelle NPs mediante spettroscopia di fluorescenza

In Fig.43 sono mostrati gli spettri di emissione della DOXO in acqua, in DMSO, in tampone DMGA 10 mM a pH 4 e all'interno delle NPs con dimero.

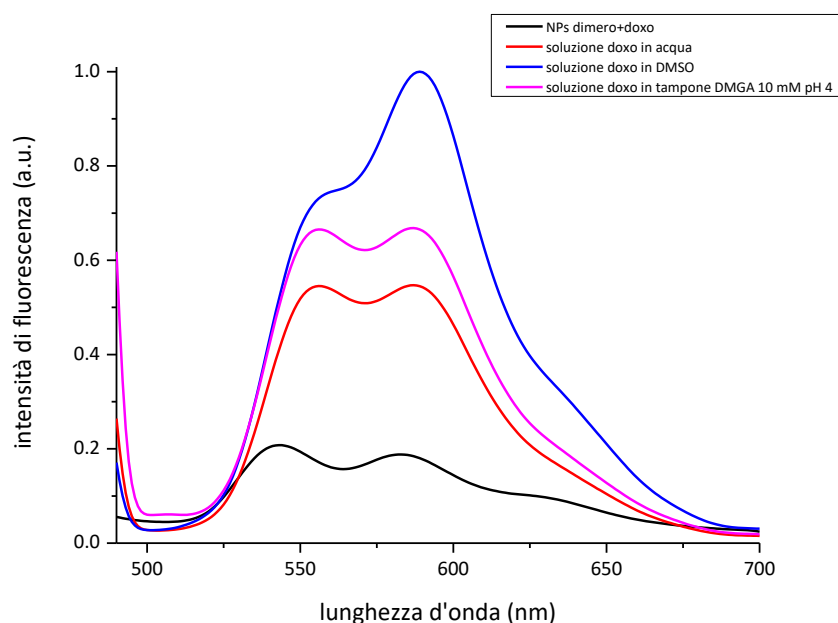


Fig. 43 - Spettri di emissione della DOXO in acqua, in DMSO, in tampone DMGA 10 mM a pH 4 e all'interno delle NPs.

Gli spettri di emissione della DOXO in acqua e in tampone DMGA mostrano una banda strutturata con due massimi a 557 e 587 nm di pari intensità; quello in DMSO presenta gli stessi massimi ma quello a lunghezza d'onda maggiore risulta più intenso. Lo spettro di emissione NPs con DOXO e dimero è simile a quello osservato per la DOXO in soluzione acquosa e in tampone DMGA.

### 3.5.8 Analisi della cinetica di rilascio della DOXO da parte delle NPs

La cinetica di rilascio della DOXO dalle NPs con dimero e DOXO è stata studiata tramite una procedura di dialisi, come precedentemente descritto. Per simulare la cinetica di rilascio della DOXO dalle NPs con fluoroforo e farmaco sia in ambiente tumorale, dove il pH è più acido (HASHIM ET AL., 2011) che in ambiente fisiologico

è stata allestita una procedura di dialisi, della durata di 220 ore, in tampone DMGA 10 mM a pH 4 e in tampone PBS 10 mM a pH 7,4. In Fig.44 è riportata la sovrapposizione degli spettri di assorbimento della DOXO rilasciata dalle NPs in tampone DMGA a pH 4 per 220 ore totali.

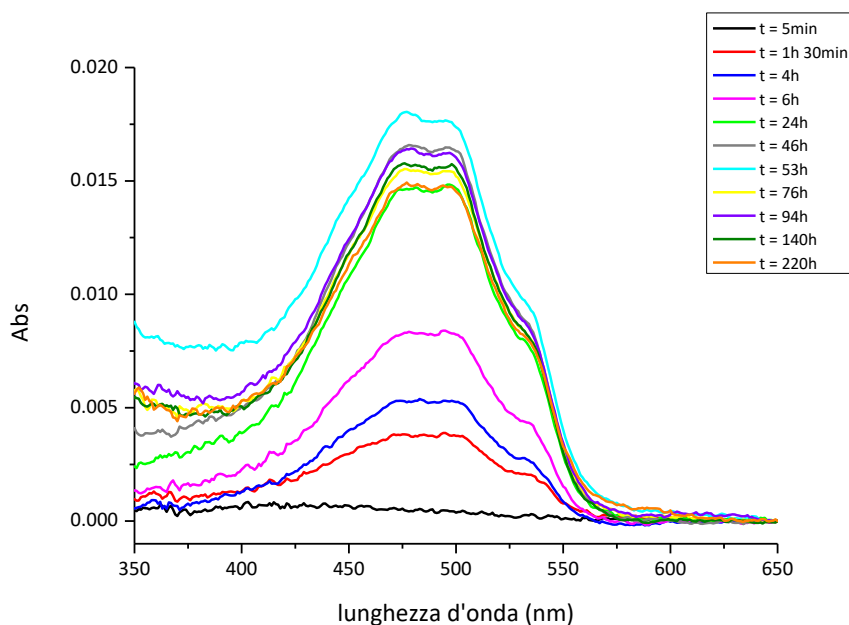


Fig. 44 - Sovrapposizione degli spettri di assorbimento della DOXO rilasciata dalle NPs dializzate contro tampone DMGA 10 mM a pH 4 in 220 ore totali.

L'assorbimento della DOXO rilasciata dalle NPs aumenta nel tempo fino a raggiungere sostanzialmente un valore costante. Al contrario, l'assorbimento del dimero resta pressoché nullo per tutto l'intervallo di tempo investigato (dati non mostrati).

A conferma dei dati mostrati in Fig.44, la percentuale di rilascio della DOXO dalle NP sin tampone DMGA 10 mM a pH 4 aumenta nel tempo fino a raggiungere un plateau. Dopo le prime 55 ore, si ha il 70% del rilascio di DOXO che si mantiene pressoché costante fino alla fine dell'esperimento (Fig.45).

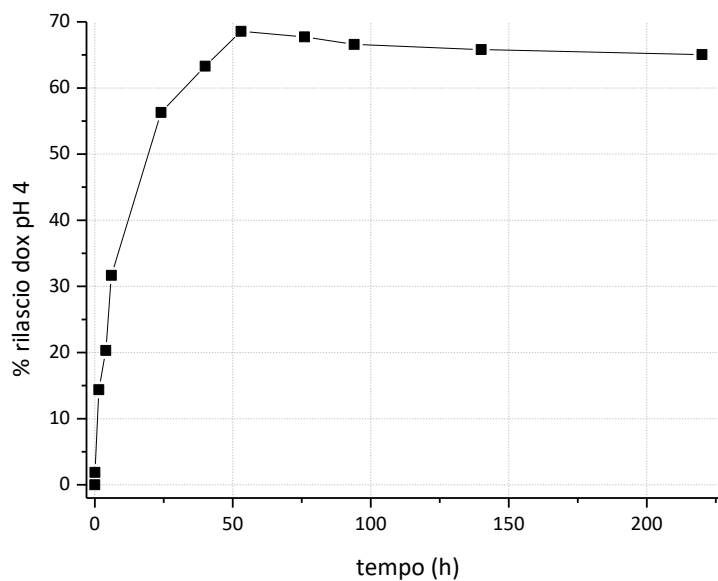


Fig. 45 - Percentuale di DOXO rilasciata a pH 4 dalle NPs con fluoroforo e farmaco in 220 ore totali.

In particolare, come mostrato in Fig. 46, dopo le prime 24 h quasi il 60% della DOXO assorbita è stata liberata dopodiché la cinetica di rilascio tende a decrescere per raggiungere, dopo 55 h, il rilascio di circa il 70% del farmaco e poi raggiungere il plateau.

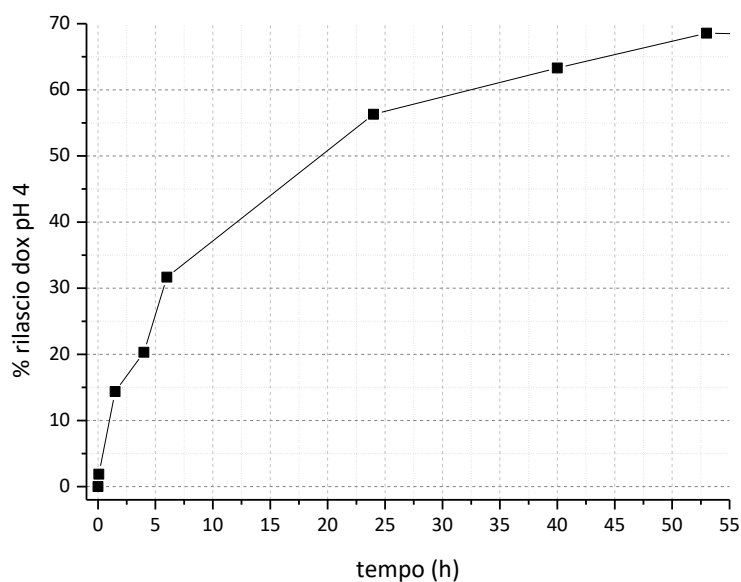


Fig. 46 - Percentuale di DOXO rilasciata a pH 4 dalle NPs con fluoroforo e farmaco internalizzati nelle prime 55 ore.



Dagli spettri di assorbimento della soluzione in tampone a pH fisiologico non emerge, a differenza di quelli rilevati a pH4, nessuna variazione significativa dell'assorbimento della DOXO, indicando che il rilascio della DOXO è minimo.

Questo ci permette di concludere che il pH acido tende a favorire maggiormente il rilascio della DOXO dalle NPs rispetto a un pH fisiologico.

### 3.5.9 Saggio di citotossicità

Gli studi di citotossicità dimostrano che il trattamento delle cellule SH-SY5Y con NPs da sole o con il dimero sia libero che assorbito nelle NPs non ha alcun effetto sulla vitalità delle cellule a tutti i tempi valutati. (Fig.47.).

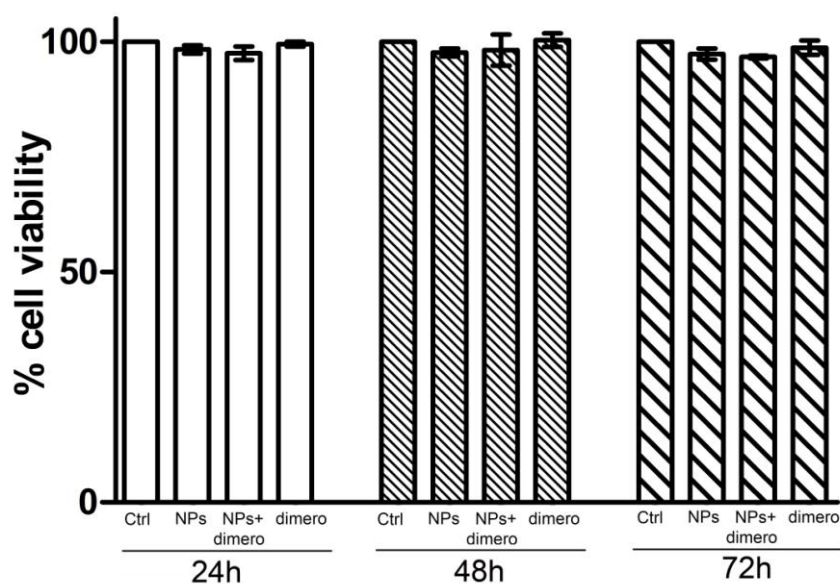


Fig. 47 - Rappresentazione grafica dei risultati ottenuti dai test di citotossicità compiuti sulla linea cellulare SH-SY5Y trattata per 24, 48 e 72 h con: NPs, NPs+Dimero, dimero. Dai risultati si può osservare l'assenza di citotossicità in tutte le formulazioni.

Una volta esclusa l'azione citotossica delle NPs in quanto tali, abbiamo valutato gli effetti delle NPs contenenti DOXO da sola o con il dimero, paragonandoli a quelli indotti dal trattamento con la DOXO in soluzione (Fig48.)

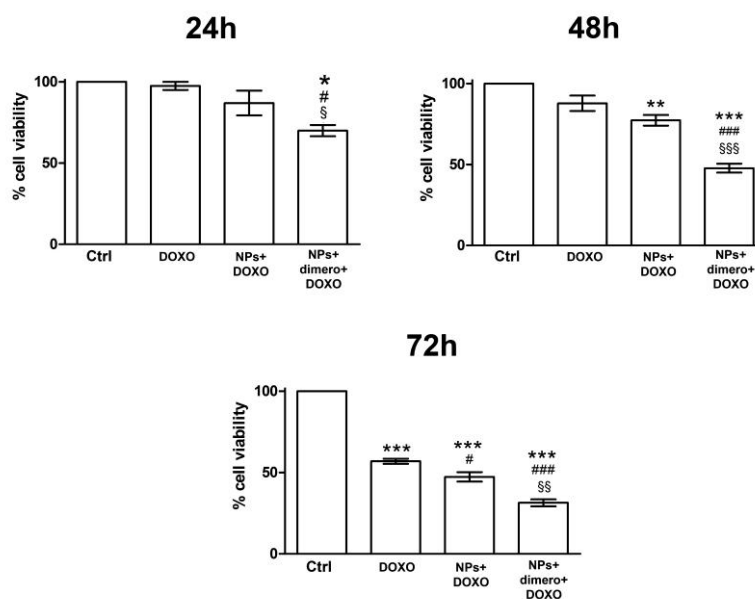


Fig. 48 – Rappresentazione grafica dei risultati ottenuti dai test di citotossicità compiuti sulla linea cellulare SH-SY5Y trattata per 24, 48 e 72 h con: DOXO, NPs+ DOXO, NPs+dimer+DOXO, (\*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001. vs ctrl; # <0.05 ###p<0.001. vs DOXO libera; §<0.05 §§ p<0.01 §§§ p<0.01 vs. NPs+DOXO).

Dopo 24 ore di trattamento, c'è una significativa diminuzione della vitalità cellulare (30%) solo nei campioni trattati con (NPs+dimer+DOXO) mentre la DOXO in soluzione o assorbita nelle NPs risulta inefficace. Dopo 48h l'effetto citotossico diventa significativo anche per le cellule trattate con (NPs+DOXO) con riduzione della vitalità cellulare intorno al 25-30%. Il trattamento con (NPs+dimer+DOXO) risulta significativamente più efficace di quello delle NPs+DOXO con riduzione della vitalità superiore al 50%. Anche a questo tempo di trattamento, la DOXO libera in soluzione non ha alcun evidente effetto citotossico. Solo dopo 72 ore la DOXO libera inizia ad avere una significativa azione tossica rispetto alle cellule di controllo, con riduzione della vitalità di circa il 40%. La formulazione (NPs+dimer+DOXO) si conferma anche a 72 ore la più efficace a diminuire la vitalità cellulare (70%).

Riassumendo possiamo affermare che le NPs con assorbiti il dimero e la DOXO hanno un maggiore effetto citotossico di tutte le altre preparazioni, con un'azione che dipende dal tempo di somministrazione (Fig. 49).

### 3.5.10 Studi di Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM)

Le cellule SH-SY5Y trattate con (NPs+dimero+DOXO con tungsteno) sono state osservate al microscopio elettronico dopo 30 minuti, 1 e 2 h dal trattamento, al fine di seguirne la localizzazione intracellulare, valutare il possibile meccanismo di ingresso all'interno delle cellule e i danni eventualmente indotti (Fig.50). Le NPs appaiono omogeneamente di forma sferica e della dimensione di poco superiori ai 100 nm (Fig.50A) (ben visibili nell'inserito a maggiore ingrandimento: x80.000). Dopo 30 minuti di incubazione si iniziano a vedere delle NPs prossime alla superficie cellulare (Fig.50B). Dopo 1 ora dal trattamento, alcune NPs sono visibili all'interno delle cellule nel citoplasma corticale, più prossimo al plasmalemma (Fig.50C). Infine, dopo 2 ore di trattamento, è possibile ritrovare NPs nel citoplasma in prossimità del nucleo (Fig.50D)

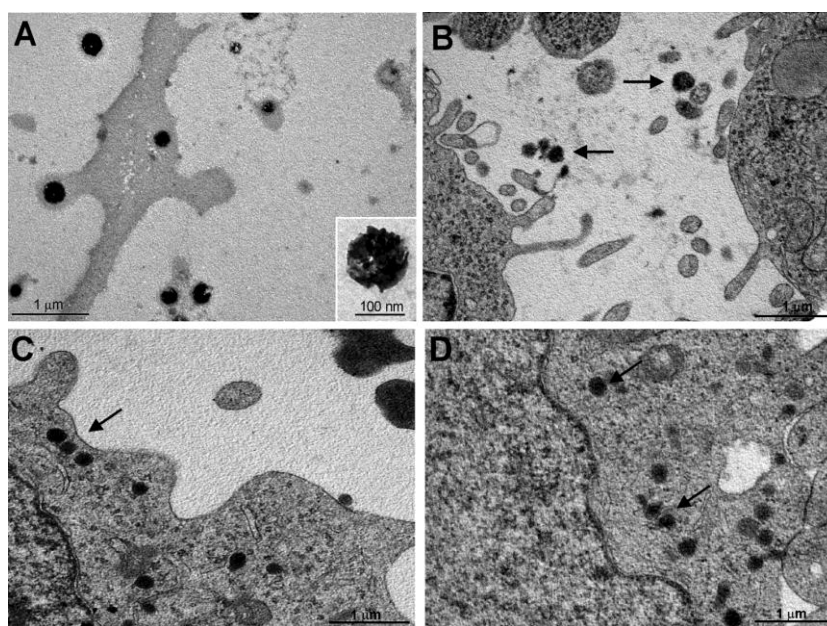


Fig. 50 - Immagini ultrastrutturali ottenute mediante osservazione al TEM dopo trattamento delle cellule SH-SY5Y con NPs+dimero+DOXO dopo 30 minuti, 1 ora e 2 ore (A) (x25000; inserto x80000), B), C), D) (x25000).

Le NPs sembrano entrare all'interno delle cellule mediante un processo di endocitosi, in accordo con quanto riportato dalla letteratura. Infatti in Fig.51 è possibile osservare all'interno della cellula, prossime alla superficie cellulare, delle NPs contenute all'interno di vescicole

rivestite da membrana (vedi frecce), presumibilmente endosomi di tipo precoce.

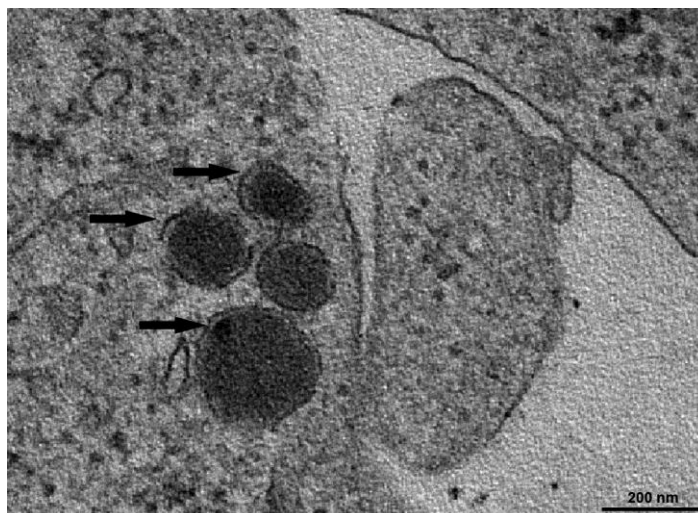


Fig. 51 - Immagini ultrastrutturali ottenute mediante osservazione al TEM dopo trattamento delle cellule SH-SY5Y con NPs+dimero+DOXO dove è possibile notare vescicole contenenti le NPs (frecce) prossime alla superficie cellulare (x80000).

Dopo la prima ora di trattamento molte delle cellule non mostrano apparenti segni di danno come è evidente da alcuni mitocondri presenti dall'aspetto normale (Fig.52A, asterischi). Dopo due ore di incubazione invece, le cellule iniziano a mostrare evidenti segni di alterazioni morfologiche indice di morte cellulare: i mitocondri appaiono rigonfi (asterischi), la membrana cellulare è interrotta in più punti (frecce) e il citoplasma risulta rarefatto (Fig.52B).

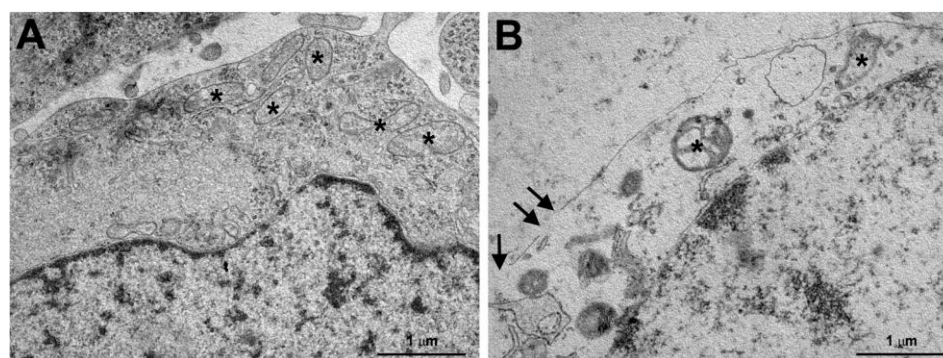


Fig. 52 - Immagini ultrastrutturali ottenute mediante osservazione al TEM dopo trattamento delle cellule SH-SY5Y con NPs+dimero+DOXO dopo 1 ora (A) dove sono presenti mitocondri (asterischi) dall'aspetto normale e dopo 2 ore (B) dove le cellule iniziano a mostrare segni di alterazioni morfologiche con membrana cellulare interrotta (frecce) e mitocondri rigonfi (asterischi) (x80000).

### 3.5.11 Localizzazione intracellulare della DOXO mediante microscopia confocale

L'analisi effettuata mediante microscopio confocale a scansione laser, per valutare la distribuzione intracellulare della DOXO, sfrutta la proprietà del farmaco di emettere fluorescenza a 480nm. Dopo 2h di trattamento si nota un debole aumento della fluorescenza nelle cellule trattate con la DOXO libera rispetto al controllo. Tale segnale è leggermente più marcato nelle cellule trattate con (NPs+DOXO) e ancora di più in quelle (NPs+dimer+DOXO). Il segnale fluorescente sembra diffuso nel citoplasma e solo nelle cellule trattate con (NPs+dimer+DOXO) sembra concentrarsi nel nucleo. Dopo 24 ore di trattamento, si ha un evidente aumento del segnale fluorescente in tutte le cellule trattate, rispetto al controllo, che si localizza principalmente a livello nucleare. Dall'intensità del segnale fluorescente, si può notare come, a parità di tempo di trattamento e di dose somministrata, la DOXO, entri nel nucleo in quantità notevolmente maggiore nelle cellule trattate con (NPs+dimer+DOXO) rispetto a quelle con (NPs+DOXO) e soprattutto rispetto a quelle trattate con la sola DOXO. (Fig.53).

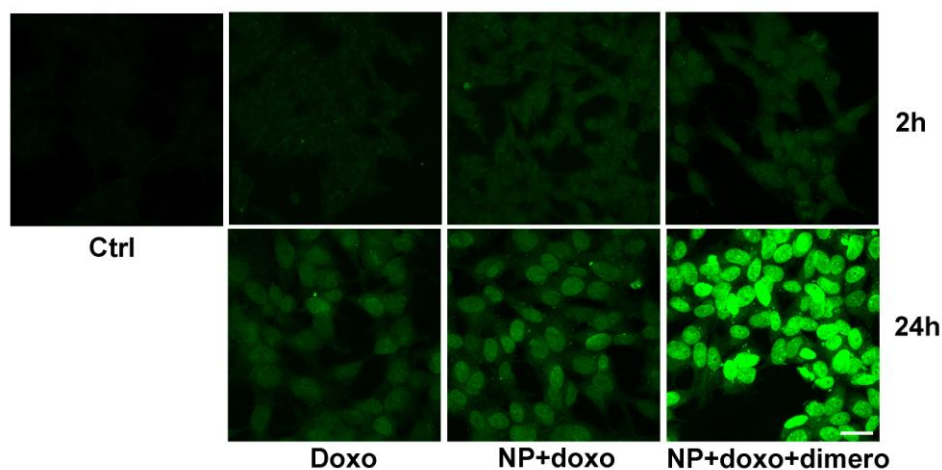


Fig. 53 - Immagini ottenute mediante microscopio confocale a scansione (Leica TCS SP5,  $\lambda$  480 nm, obiettivo 63x) delle cellule SH-SY5Y trattate per 2 e 24 ore con: DOXO, (NPs+DOXO), (NPs+DOXO+Dimer) (barra di misurazione 20  $\mu$ m).

### 3.5.12 Valutazione intracellulare della DOXO mediante analisi al citofluorimetro

La quantificazione del segnale fluorescente nelle cellule incubate con le varie preparazioni di NPs e con la DOXO libera, si deduce che dopo 2 ore di trattamento, solo le cellule trattate con (NPs+dimero+DOXO) mostrano un aumento significativo della DOXO incorporata nelle cellule rispetto al controllo (Fig.54). Dopo 24 ore, invece, la quantità intracellulare di DOXO è aumentata rispetto alle cellule di controllo a seguito di tutti i trattamenti. A conferma, il trattamento delle cellule con (NPs+dimero+DOXO), si dimostra quello in cui si misurano i maggiori livelli di DOXO intracellulare (Fig.55).

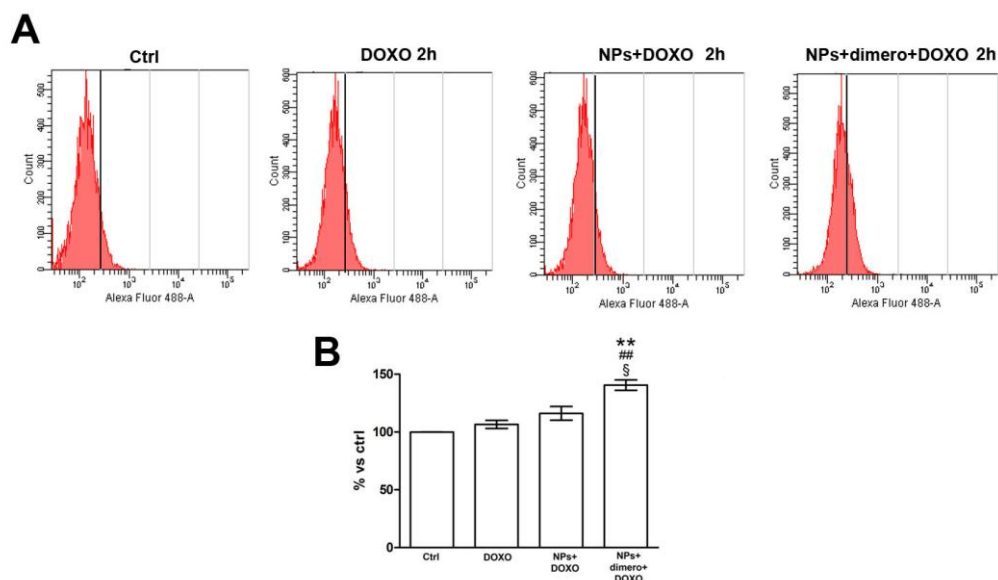


Fig. 54 – Quantificazione del segnale fluorescente nelle cellule SH-SY5Y incubate con le varie preparazioni di NPs e con la DOXO dopo 2 ore di trattamento A) Spettri citofluorimetrici B) Analisi statistica dei risultati ottenuti dal citofluorimetro (\*\*p<0.01 vs. ctrl; ## p<0.01 vs. DOXO libera; § p<0.05 vs. NPs+DOXO).

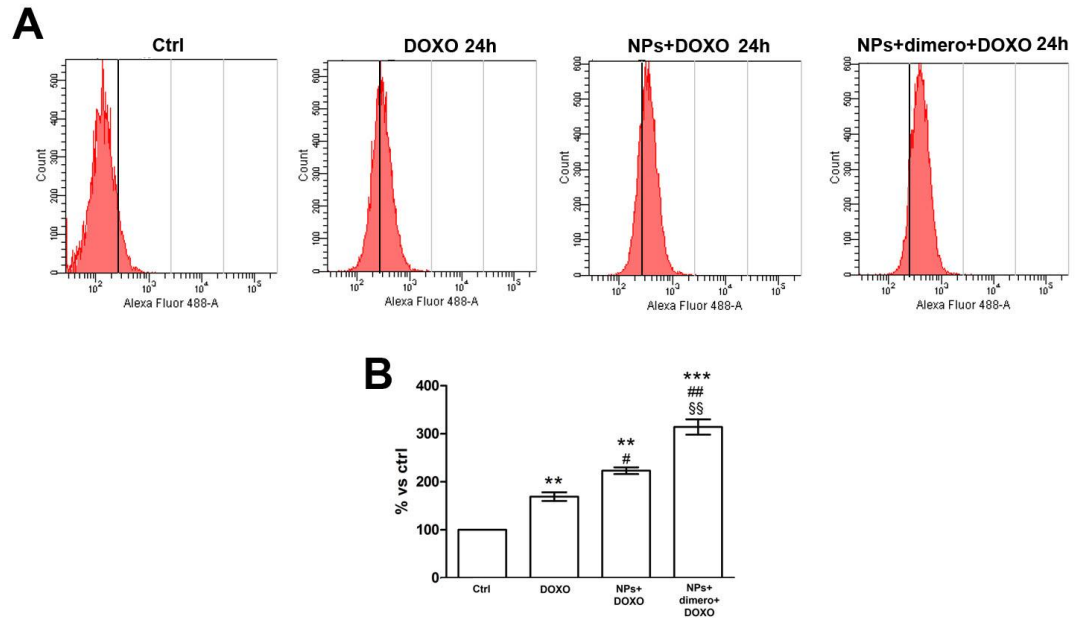


Fig. 55 – Quantificazione del segnale fluorescente nelle cellule SH-SY5Y incubate con le varie preparazioni di NPs e con la DOXO dopo 24 ore di trattamento A) Spettri citofluorimetrici B) Analisi statistica dei risultati ottenuti al citofluorimetro (\*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$ . vs ctrl; ##  $p < 0.01$  vs. DOXO libera e §§  $p < 0.01$  vs. NPs+DOXO).

#### 4. Discussione

La nanomedicina ha come obiettivo quello di riuscire ad assemblare in un unico nanocarrier, opportunamente ingegnerizzato, molecole biologicamente attive o farmaci a fini teranostici. In particolare, il campo del drug delivery prevede lo sviluppo di sistemi per l'indirizzamento dei farmaci in specifici distretti dell'organismo, in modo da circoscriverne l'effetto biologico su una determinata tipologia di cellule, migliorando l'efficacia e riducendo la tossicità di una terapia (VAN VLERKEN L.E. AND AMIJI M.M., 2006).

Negli ultimi anni la strategia DDS sulla quale la ricerca si è principalmente focalizzata è quella che prevede l'utilizzo dei nanocarrier basati su nanoparticelle (NPs) polimeriche come ad esempio quelle a base di PLGA (SAFARI J. AND ZARNEGAR Z., 2014; HONG S.H ET AL., 2018). Studi precedenti hanno osservato come l'uso delle NPs leganti chemioterapici, come la DOXO, porti così ad un aumento dell'efficacia terapeutica minimizzando gli effetti collaterali (OTSUKA H. ET AL., 2003; HUANG Y. ET AL., 2018).

Lo scopo di questo progetto è stato sintetizzare, caratterizzare e valutare la tossicità di una nuova formulazione di NPs di PLGA caricate con DOXO in comparazione con la DOXO libera. Le NPs ottenute mediante il metodo di sintesi della nanoprecipitazione, sono state strutturate in modo da legare sia la DOXO che un dimero fluorescente, neosintetizzato a partire dal trimetil-benzoindolo etilato, una cianina portante carica positiva. Questo dimero assorbe nello spettro delle radiazioni vicino l'infrarosso che sono molto più penetranti di quelle visibili, e possono tornare utili per lo sviluppo di agenti teranostici contenenti una sonda fluorescente che consenta di monitorare la diffusione del farmaco *in vitro* ed *in vivo*.

Le NPs sintetizzate hanno dimensioni simili tra loro, superiori ai 100 nm, sono monodisperse e hanno una carica superficiale negativa che ne limita l'aggregazione e ne migliora la stabilità. Il valore assoluto del potenziale zeta è diverso tra le varie preparazioni. Le (NPs+dimero+DOXO) hanno il valore di potenziale zeta meno negativo,



indicando una carica superficiale meno negativa rispetto a quella delle altre.

Dallo studio delle caratteristiche spettroscopiche UV-Vis del dimero e della DOXO è emerso che le lunghezze d'onda dei massimi di assorbimento di entrambi i componenti non cambiano significativamente a seguito del loro inserimento nelle NPs. Studi spettro fluorimetrici hanno, anche loro, ulteriormente escluso una possibile interferenza tra DOXO e dimero all'interno delle NPs, in quanto i massimi picchi di emissione dei due componenti in soluzione sono simili a quelli osservati quando essi si trovano assorbiti nei nanosistemi.

Gli studi di cinetica di rilascio della DOXO hanno evidenziato come il rilascio del farmaco dalle nostre NPs è favorito in ambiente acido rispetto a quello in ambiente a pH fisiologico. L'ambiente acido è caratteristico dei tumori solidi, dove a causa di cause concomitanti, come la scarsa perfusione vascolare, l'ipossia locale e l'aumento del flusso di carbonio attraverso la glicolisi, si genera acidosi con valori di pH extracellulari anche inferiori a 6,5. L'acidificazione del microambiente tumorale si verifica inizialmente durante la fase avascolare e sembra essere positivamente correlata alla tendenza delle cellule tumorali all'invasione locale (HASHIM ET AL., 2011). Il lento e ridotto rilascio della DOXO osservato a pH fisiologico potrebbe favorire la stabilità delle NPs nella circolazione sanguigna, mentre il più rapido e maggiore rilascio in ambiente acido potrebbe rendere l'azione delle NPs maggiormente selettiva nei confronti del tumore. Questo dato potrebbe spiegare il meccanismo alla base del rilascio del farmaco dalle NPs una volta entrate nella cellula. Come mostrato dagli studi di microscopia elettronica, le NPs entrano all'interno delle cellule per endocitosi: NPs avvolte da membrana sono infatti visibili nel citoplasma corticale, presumibilmente all'interno di endosomi precoci. Queste osservazioni effettuate al TEM sono in linea con la letteratura e confermano l'endocitosi come il principale meccanismo attraverso il quale le NPs entrano nelle cellule (Kim KT et al., 2019). Negli endosomi il pH è acido e tale ambiente potrebbe favorire il rilascio della DOXO dalle NPs. Una volta rilasciata

dalle NPs, la DOXO può esercitare i suoi effetti citotossici, tanto che dopo 2 ore di trattamento le cellule iniziano a mostrare evidenti segni di alterazioni morfologiche, indice di morte cellulare: i mitocondri appaiono rigonfi, la membrana cellulare è interrotta in più punti e il citoplasma risulta rarefatto.

La preparazione di NPs che si è dimostrata maggiormente citotossica è quella in cui alle NPs sono stati assorbiti sia il dimero che la DOXO. I risultati ottenuti dagli studi di vitalità cellulare sulle cellule SH-SY5Y infatti dimostrano che il trattamento delle cellule con (NPs+dimero+DOXO) è il solo in grado di ridurre la vitalità cellulare dopo 24 ore ed è quello maggiormente citotossico sia a 48 che a 72 ore. Le (NPs+DOXO) risultano citotossiche solo a 48 e 72 ore, mentre la DOXO libera dopo 72 ore. Le NPs, così come il solo dimero e le (NPs+dimero) sono invece inerti a tutti i tempi di trattamento previsti. Questi risultati indicano che la DOXO somministrata all'interno di nanosistemi è significativamente più efficace della DOXO libera in soluzione.

Il motivo per il quale le (NPs+dimero+DOXO) risultano maggiormente citotossiche rispetto alle (NPs+DOXO) non è del tutto chiaro. È possibile ipotizzare che giochi un ruolo importante la carica superficiale dei due tipi di NPs che ne può condizionare l'ingresso all'interno delle cellule. Le NPs possono permeare facilmente le membrane cellulari (KASHIWADA ET AL, 2006) e questo sembra essere dipendente dalle proprietà fisico-chimiche della stessa NP. Le cariche di superficie presenti sulle NPs influenzano la capacità di essere internalizzate dalle cellule (PALCHETTI ET AL, 2016). Secondo alcuni studi, non sempre confermati, le NPs cationiche sembrano entrare più facilmente rispetto a quelle anioniche e questo a causa della presenza di una leggera carica negativa sulla membrana cellulare (ROSER M ET AL., 1998; CHITHRANI BD AND CHAN WC, 2007). Le NPs-PLGA hanno una carica superficiale negativa a causa della struttura del polimero stesso. E' stato visto in studi recenti come NPs di PLGA funzionalizzate con un polimero cationico o con molecole in grado di ridurre la carica negativa

superficiale ne incrementino l'assorbimento e la velocità di ingresso nella cellula bersaglio (WUSIMAN A ET AL., 2019). La presenza all'interno delle NPs del dimero, che porta una carica positiva, potrebbe ridurre la carica superficiale negativa delle NPs di PLGA funzionalizzate, favorendone la capacità di ingresso attraverso le membrane cellulari. Tale ipotesi troverebbe supporto nel valore di potenziale zeta delle NPs con dimero e DOXO, che risulta, a confronto con quello delle NPs con solo DOXO, meno negativo ma comunque in grado di garantire la giusta repulsione tra NPs e la stabilità del nanosistema.

Osservazioni condotte mediante microscopia confocale e analisi citofluorimetrica confermano l'ipotesi di un più rapido ingresso nelle cellule delle (NPs+dimero+DOXO) rispetto alle (NPs+DOXO). Infatti, dopo solo 2 ore di trattamento, la quantità intracellulare di DOXO è maggiore nelle cellule trattate con (NPs+dimero+DOXO) rispetto alle cellule trattate con (NPs+DOXO) o con sola DOXO. Questi risultati si ripetono anche dopo 24 ore di trattamento. La distribuzione del segnale fluorescente è a livello nucleare, suggerendo il passaggio della DOXO dalle NPs al nucleo. Ciò è in accordo con le note proprietà del farmaco, che una volta entrato all'interno della cellula, si lega alla subunità 20S del proteosoma e trasloca attraverso i pori nucleari all'interno del nucleo, dove si intercala tra le basi azotate del DNA (CARVALHO C. ET AL., 2009).

Ulteriori studi sono in corso per :

- Localizzare, mediante microscopia confocale a scansione laser, le NPs all'interno delle cellule, sfruttando l'emissione del dimero vicina all'IR.
- Valutare l'eventuale danno apoptotico o il danno causato dalla formazione di ROS indotto nelle cellule trattate dalla DOXO libera o dalle varie formulazioni di NPs.

In conclusione, dai risultati ottenuti in questo studio, possiamo affermare che le NPs da noi sintetizzate e funzionalizzate con DOXO potrebbero rappresentare un approccio alternativo alla chemioterapia

classica per il trattamento di tumori. In particolare, se i risultati fossero confermati da studi futuri condotti *in vivo*, le NPs con dimero e DOXO assorbiti potrebbero essere usate come specifici nanocarrier per il drug delivery del farmaco, in modo da aumentarne la specificità e ridurre gli effetti tossici.

## 5. CONCLUSIONI

La chemioterapia ha un ruolo cruciale sia nel trattamento delle fasi iniziali del tumore, al fine di evitare un'operazione chirurgica o per ridurre la massa prima di asportarla, sia nelle fasi finali, dopo un'eventuale asportazione, per scongiurare possibili recidive. La chemioterapia ha però delle limitazioni soprattutto a causa della sua scarsa efficacia su alcune tipologie tumorali, per gli effetti collaterali dovuti all'azione citotossica del farmaco impiegato e per l'insorgenza di chemio-resistenza. Per tali motivi, la ricerca in ambito chemioterapico ha da sempre provato a sviluppare nuovi farmaci anti-tumorali, alternativi a quelli classicamente utilizzati o a sviluppare nuovi meccanismi di somministrazione del farmaco tra i quali nanocarrier in grado di veicolare il farmaco direttamente nel sito tumorale, aumentandone l'efficacia e limitandone gli effetti collaterali.

In questa tesi, in collaborazione con ricercatori del Dipartimento di Chimica dell'Università di Firenze, ho partecipato alla sintesi e alla caratterizzazione chimica di un nuovo composto carbene a base d'argento indicato come,  $[Ag(EIA)_2]Cl$  e di NPs di PLGA funzionalizzate con il chemioterapico DOXO. Mi sono successivamente occupato di valutare gli effetti citotossici di tali composti in linee tumorali umane di neuroblastoma SH-SY5Y e di adenocarcinoma mammario triplo negativo, MDA-MB-231 e di studiarne l'attività biologica. I risultati di questo studio hanno dimostrato la maggiore citotossicità di  $[Ag(EIA)_2]Cl$  nei confronti del cisplatino e di un composto carbene analogo  $[Ag(MIA)]Cl$ . Anche le NPs da noi funzionalizzate si sono dimostrate più efficaci della DOXO libera nel ridurre la vitalità cellulare in cellule SH-SY5Y. Se  $[Ag(EIA)_2]Cl$  e le NPs funzionalizzate si dimostrassero efficaci anche in studi *in vivo*, potrebbero in futuro trovare applicazione nel trattamento di tumori come metodi alternativi alla chemioterapia classica.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- ACHARYA S AND SAHOO SK *PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect*, Adv. Drug Deliv. Rev., 2011, 63(3): 170-83.
- ALBERT B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K AND WALTER P *Molecular Biology of the Cell 4th edition*, 2002, Garland Science.
- ANDREWS PA, VELURY S, MANN SC, HOWELL SB *Cis-diamminedichloroplatinum(II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells*, Cancer Research, 1988, 48: 68-73.
- ARCAMONE F, CASSINELLI G, FANTINI G, GREIN A, OREZZI P, POL C, SPALLA C *Adriamycin, 14-hydroxydaimomycin, a new antitumor antibiotic from S. Peucetius var. caesius*, Biotechnology and Bioengineering, 1969, 11(6): 1101-1110.
- ARGILÉS JM AND AZCÓN-BIETO J *The metabolic environment of cancer*, 1988, Molecular and Cellular Biochemistry, 81:3-17.
- ARNÉR ESJ AND HOLMGREN A. *Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase*, Eur. J. Biochem., 2000, 267: 6102-6109.
- ASSELIN E, MILLS GB, TSANG BK *XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells*, Cancer. Res., 2001, 61(5): 1862-1868.

- BALKWILL FR, CAPASSO M AND HAGEMAN T *The tumor microenvironment at a glance*, Journal of Cell Science, 2012, 125: 5591-5596.
- BERGERS G AND BENJAMIN LE *Tumorigenesis and the angiogenic switch*, Nat. Rev. Cancer, 2003, 3(6): 401-410.
- BERGGREN M, GALLEGOS A, GASDASKA PY, WARNEKE J, POWIS G *Thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in human tumors and cell lines, and the effects of serum stimulation and hypoxia*, Anticancer Research, 1996, 16(6B): 3459-3466.
- BERNERS-PRICE S.J. AND SADLER PJ *Phosphines and metal phosphine complexes: Relationship of chemistry to anticancer and other biological activity*, Bioinorganic Chemistry, 1985, Vol. 70, Springer, Berlin, Heidelberg.
- BERNERS-PRICE SJ, JOHNSON RK, GIOVENNELLA AJ, FAUCETTE LF, MIRABELLI CK, SADLER PJ *Antimicrobial and anticancer activity of tetrahedral, chelated, diphosphine silver(I) complexes: Comparison with copper and gold*, J. Am. Chem. Soc., 2007, 129: 15042-15053.
- BLINKS SP AND DOBROTA M *Kinetics and mechanism of uptake of platinum-based pharmaceuticals by the rat small intestine*, Biochem. Pharmacol., 1990, 40(6): 1329-1336.
- BODIGA S, VEMURI PK, BODIGA VL *Low Ctr1p, due to lack of Sco1p results in lowered cisplatin uptake and mediates insensitivity of rho0 yeast to cisplatin*, Inorg Biochem., 2018 187:14-24.
- BOUMA J, BEIJNEN JH, BULT A, UNDERBERG WJ *Anthracycline antitumour agents*, Pharmaceutisch Weekblad, 1986, 8(2): 109-133.
- BRAND MD, AFFOURTIT C, ESTEVES TC, GREEN K, LAMBERT AJ, MIWA S, PAKAY JL, PARKER N *Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins*, Free Radic. Biol. Med., 2004, 37(6):755-67.

- BRANNON-PEPPAS L AND BLANCHETTE JO *Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004, 56: 1649-1659.
- BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, SIEGEL RL, TORRE LA, JEMAL A *Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*, 2018, *CA Cancer J. Clin.*, 68: 394-424.
- BRODEUR GM *Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma*, *Nat Rev. Cancer.*, 2003, 3(3): 203-216.
- BURGESS DJ, DOLES J, ZENDER L, XUE W, MA B, MCCOMBIE WR, HANNON GJ, LOWE SW, HEMANN MT *Topoisomerase levels determine chemotherapy response in vitro and in vivo*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(26): 9053-8.
- BYUN SS, KIM SW, CHOI H, LEE C, LEE E *Augmentation of cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant human bladder cancer cells by modulating glutathione concentrations and glutathione-related enzyme activities*, *BJU International*, 2005, 95(7): 1086-1090.
- CAGEL M, GROTZ E, BERNABEU E, MORETTON MA, CHIAPPETTA DA *Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside*, *Drug Discovery Today*, 2017, 22(2): 270-281.
- CAPELÔA T, BENYAHIA Z, ZAMPIERI LX, BLACKMAN MCNM, SONVEAUX P *Metabolic and non-metabolic pathways that control cancer resistance to anthracyclines*, *Semin. Cell Dev Biol.*, 2019, S1084-9521(18): 30220-30229.
- CARR HS, WLODKOWSKI TJ, ROSENKRANZ HS *Silver sulfadiazine: in vitro antibacterial activity*, *Antimicrob Agents Chemother.*, 1973, 4(5):585-587.
- CARVALHO C, SANTOS RX, CARDOSO S, CORREIA S, OLIVEIRA PJ, SANTOS MS, MOREIRA PI *Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect*, *Current Medicinal Chemistry*, 2009, 16: 3267-3285.



- CHANEY SG, CAMPBELL SL, BASSETT E, WU Y *Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts*, Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2005, 53(1): 3-11.
- CHITHRANI BD1 AND CHAN WC *Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes*, Nano Lett., 2007, 7(6): 1542-1550.
- CHO K, WANG X, NIE S, CHEN ZG, SHIN DM *Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer*, Clin. Cancer Res., 2008, 14(5): 1310-1316.
- CITTA A, SCHUH E, MOHR F, FOLDA A, MASSIMINO ML, BINDOLI A, CASINI A, RIGOBELLO MP *Fluorescent silver(I) and gold(I) N-heterocyclic carbene complexes with cytotoxic properties: mechanistic insights*, Metallomics, 2013, 5: 1006-1015.
- CORRIE PG *Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects*, Medicine, 2011, 39(12): 717-722.
- DABHOLKAR M, VIONNET J, BOSTICK-BRUTON F, YU JJ, REED E *Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy*, The Journal of Clinical Investigation, 1994, 94(2): 703-708.
- DANHIER F, ANSORENA E, SILVA JM, COCO R, LE BRETON A, PRÉAT V *PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications*, Journal of Controlled Release, 2012, 161: 505-522.
- DASARI S AND TCHOUNWOU PB *Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action*, European Journal of Pharmacology, 2014, 740: 364-378.
- DOROSHOW JH *Doxorubicin-induced cardiac toxicity*, N. Engl. J. Med., 1991, 324: 843-845.
- ELMENIER FM, LASHEEN DS, ABOUZID KAM *Phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) inhibitors as new weapon to combat cancer*, Eur. J. Med. Chem., 2019, 183: 1-28.
- ELOY L, JARROUSSE AS, TEYSSOT ML, GAUTIER A, MOREL L, JOLIVALT C, CRESTEIL T, ROLAND S *Anticancer Activity of Silver-N-Heterocyclic Carbene Complexes: Caspase-Independent*

- Induction of Apoptosis via Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor (AIF)*, ChemMedChem, 2012, 7: 805-814.
- EVAN G AND LITTLEWOOD T, *A matter of life and cell death*, Science, 1998, 281(5381):1317-22.
  - FANG J, NAKAMURA H, MAEDA H *The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2011, 63: 136-151.
  - FARINA AR, TACCONELLI A, CAPPABIANCA L, MASCIULLI MP, HOLMGREN A, BECKETT GJ, GULINO A, MACKAY AR *Thioredoxin alters the matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of metalloproteinase balance and stimulates human SK-N-SH neuroblastoma cell invasion*, Eur. J. Biochem., 2001, 268: (405-413).
  - FEDI P, TRONICK SR AND AARONSON SA, *Growth factors*, Cancer Medicine, 1997, 41–64.
  - FENG SS AND CHINE S *Chemotherapeutic engineering: application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases*, Chemical Engineering Science, 2003, 58:4087-4114.
  - FYNAN TM AND REISS M *Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-beta and its role in oncogenesis*, Crit. Rev. Oncog., 1993, 4(5):493-540.
  - FOLKMAN J AND KLAGSBRUN M *Angiogenic Factors*, Science, 1987, 235(4787): 442-4477.
  - FOLKMAN J *Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis*, Seminars in Oncology, 2002, 29(6): 15-18.
  - FRANCO YL, VAIDYA TR, AIT-OUDHIA S *Anticancer and cardio-protective effects of liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer*, Breast Cancer (Dove Med Press), 2018, 10: 131-141
  - FUERTES MA, ALONSO C, PÉREZ JM *Biochemical Modulation of Cisplatin Mechanisms of Action: Enhancement of Antitumor*

- Activity and Circumvention of Drug Resistance*, Chem. Rev., 2003, 103(3): 645-662.
- GASDASKA PY, GASDASKA JR, COCHRAN S, POWIS G *Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase*, FEBS Lett., 1995, 373(1): 5-9.
  - GATENBY RA AND GILLIES RJ *A microenvironmental model of carcinogenesis*, Nat. Rev. Cancer, 2008,8(1): 56-61.
  - GAUTIER A AND CISNETTI F *Advances in metal-carbene complexes as potent anti-cancer agents*, Metallomics, 2012, 4: 23-32.
  - GELPERINA S, MAKSIMENKO O, KHALANSKY A, VANCHUGOVA L, SHIPULO E, ABBASOVA K, BERDIEV R, WOHLFART S, CHEPURNOVA N, KREUTER J *Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of the formulation parameters*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2010, 74: 157-163.
  - GIUSTARINI D, DALLE-DONNE I, TSIKAS D, ROSSI R *Oxidative stress and human diseases: origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers*, Crit. Rev. Clin. Lab Sci., 2009, 46(5-6): 241-281.
  - GOHR K, HAMACHER A, ENGELKE LH, KASSACK MU *Inhibition of PI3K/Akt/mTOR overcomes cisplatin resistance in the triple negative breast cancer cell line HCC38*, BMC Cancer., 2017, 17(1): 1-13.
  - GOLOMBEK SK, MAY JN, THEEK B, APPOLD L, DRUDE N, KIESSLING F, LAMMERS T *Tumor Targeting via EPR: Strategies to Enhance Patient Responses*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2018, 130:17-38.
  - GOTOH Y AND COOPER JA *Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction*, J Biol Chem., 1998, 273(28): 17477-82.

- HANAHAN D AND FOLKMAN J *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*, Cell, 1996, 86: 353–364.
- HANAHAN D AND WEINBERG RA, *The Hallmarks of Cancer*, Cell, 2000, 100: 57-70.
- HANNON MJ *Metal-based anticancer drugs: From a past anchored in platinum chemistry to a post-genomic future of diverse chemistry and biology*, Pure Appl. Chem., 2007, 79(12): 2243-2261.
- HARRIS CC *Structure and Function of the p53 TumorSuppressor Gene: Clues for Rational CancerTherapeutic Strategies*, Journal of the National Cancer Institute, 1996, 88(20): 1442-1455.
- HASHIM AI, ZHANG X, WOJTKOWIAK JW, MARTINEZ GV, GILLIES RJ *Imaging pH and metastasis*, NMR Biomed., 2011, 24(6):582-91.
- HERRMANN W A AND KÖCHER C *N-Heterocyclic Carbenes*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1997, 36: 2162-2187.
- HILLAIREAU H AND COUVREUR P *Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery*, Cell. Mol. Life Sci., 2009, 66: 2873-2896.
- HINDI KM, PANZNER MJ, TESSIER CA, CANNON CL, YOUNGS WJ *The medicinal applications of imidazolium carbene metal complexes*, Chem Rev., 2009, 109(8): 3859-3884.
- HIROTA K, MATSUI M, IWATA S, NISHIYAMA A, MORI K, YODOI J *AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1*, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1997, 94(8): 3633-3638.
- HIROTA K, MURATA M, SACHI Y, NAKAMURA H, TAKEUCHI J, MORI K, YODOI J *Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB*, J. Biol. Chem., 1999, 274(39): 27891-27897.

- HONG SH, LAROCQUE K, JAUNKY DB, PIEKNY A, OH JK *Dual disassembly and biological evaluation of enzyme/oxidation-responsive polyester-based nanoparticles for tumor targeting delivery*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2018, 172: 608-617.
- HOPKINSON MN, RICHTER C, SCHEDLER M, GLORIUS F *An overview of N-heterocyclic carbenes*, Nature, 2014, 510: 485-496.
- HUANG Y, XIE P, YANG ST, ZHANG X, ZENG G, XIN Q, TANG XH *Carbon nanoparticles suspension injection for the delivery of doxorubicin: comparable efficacy and reduced toxicity*, Materials Science & Engineering C, 2018, 92: 416-423.
- IGHODARO O.M. AND AKINLOYE OA *First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid*, Alexandria Journal of Medicine, 2018, 54(4): 287-293.
- ISHIDA S, LEE J, THIELE DJ, HERSKOWITZ I *Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals*, Proc. Natl. Acad. Sci., 2002, 99(22): 14298-14302
- JAYARAMAN L, MURTHY KG, ZHU C, CURRAN T, XANTHOUDAKIS S, PRIVES C *Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53*, Genes Dev., 1997, 11(5): 558-70.
- KAIMUL AM, NAKAMURA H, MASUTANI H, YODOI J *THIOREDOXIN AND THIOREDOXIN-BINDING PROTEIN-2 IN CANCER AND METABOLIC SYNDROME*, Free Radic. Biol. Med., 2007, 43(6): 861-868.
- KALARIA DR, SHARMA G, BENIWAL V, RAVI KUMAR MN *Design of biodegradable nanoparticles for oral delivery of doxorubicin: in vivo pharmacokinetics and toxicity studies in rats*, Pharmaceutical Research, 2008, 26(3): 492-501.

- KARUKSTIS KK, THOMPSON EH, WHILES JA, ROSENFELD RJ *Deciphering the fluorescence signature of daunomycin and doxorubicin*, Biophysical Chemistry, 1998, 73: 249-263.
- KASHIWADA S *Distribution of nanoparticles in the see-through medaka (Oryziaslatipes)*, Environ health persp., 2006, 114(11): 1697-1702.
- KIM KT, LEE JY, KIM DD, YOON IS, CHO HJ *Recent Progress in the Development of Poly(lactic-co-glycolic acid)-Based Nanostructures for Cancer Imaging and Therapy*, Pharmaceutics, 2019, 11(6): 280.
- KIM NW, PIATYSZEK MA, PROWSE KR, HARLEY CB, WEST MD, HO PL, COVIELLO GM, WRIGHT WE, WEINRICH SL, SHAY JW *Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer*, Science, 1994, 266(5193): 2011-2015.
- KLUZA J, MARCHETTI P, GALLEGRO MA, LANCEL S, FOURNIER C, LOYENS A, BEAUVILLAIN JC, BAILLY C *Mitochondrial proliferation during apoptosis induced by anticancer agents: effects of doxorubicin and mitoxantrone on cancer and cardiac cells*, Oncogene, 2004, 23(42): 7018-7030.
- LAMAR JM, PUMIGLIA KM, AND DiPERSIO CM *An immortalization-dependent switch in integrin function upregulates MMP-9 to enhance tumor cell invasion*, Cancer Res., 2008, 68(18): 7371–7379.
- LANSDOWN ABG *A Pharmacological and Toxicological Profile of Silver as an Antimicrobial Agent in Medical Devices*, Advances in Pharmacological Sciences, 2010, 2010: 1-16.
- LEE S, KIM SM, AND LEE RT *Thioredoxin and Thioredoxin Target Proteins: From Molecular Mechanisms to Functional Significance*, Antioxid. Redox Signal, 2013, 18(10): 1165–1207.
- LEONE A, ROCA MS, CIARDIELLO C, COSTANTINI S, BUDILLON A *Oxidative Stress Gene Expression Profile Correlates with Cancer Patient Poor Prognosis: Identification of Crucial Pathways*

- Might Select Novel Therapeutic Approaches*, Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017:1-18.
- LEVINA V, MARRANGONI AM, DEMARCO R, GORELIK E, LOKSHIN AE *Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties*, PLoS One 3, 2008, 3(8): e3077.
  - LIEDERT B, MATERNA V, SCHADENDORF D, THOMALE J, LAGE H *Overexpression of cMOAT (MRP2/ABCC2) is associated with decreased formation of platinum-DNA adducts and decreased G2-arrest in melanoma cells resistant to cisplatin*, Journal of Investigative Dermatology, 2003, 121(1): 172-176.
  - LIU W AND GUST R *Metal N-heterocyclic carbene complexes as potential antitumor metallodrugs*, Chem. Soc. Rev., 2013, 42: 755-773.
  - LOMELI N, DI K, CZERNIAWSKI J, GUZOWSKI JF, BOTA DA *Cisplatin-induced mitochondrial dysfunction is associated with impaired cognitive function in rats*, Free Radic Biol Med., 2017, 102:274-286.
  - LUO S, ZHANG E, SU Y, CHENG T, SHI C *A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging*, Biomaterials, 2011, 32: 7127-7138.
  - MAHAPATRO A AND SINGH DK *Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines*, Journal of Nanobiotechnology, 2011, 9(55): 1-11.
  - MAKADIA HK AND SIEGEL SJ *Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier*, Polymers (Basel), 2011, 3(3): 1377-1397.
  - MAKALE M *Cellular mechanobiology and cancer metastasis*, Birth Defects Res C Embryo Today, 2007, 81(4): 329-343.
  - MARKOWITZ S, WANG J, MYEROFF L, PARSONS R, SUN L, LUTTERBAUGH J, FAN RS, ZBOROWSKA E, KINZLER KW, VOGELSTEIN B, ET AL. *Inactivation of the type II TGF-beta*

- receptor in colon cancer cells with microsatellite instability.* Science, 1995, 268(5215):1336-1338.
- MARZO T, PILLOZZI S, HRABINA O, KASPARKOVA J, BRABEC V, ARCANGELI A, BARTOLI G, SEVERI M, LUNGI A, TOTTI F, GABBIANI C, QUIROGA AG, MESSORI L *Cis-Pt I2(NH3)2: reappraisal*, Dalton Transactions, 2015, 44:14896-14905.
  - MATSUMURA Y AND MAEDA H *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs*, Cancer. Res., 1986, 46:6387-6392.
  - MEDVETZ DA, HINDI KM, PANZNER MJ, DITTO AJ, YUN YH, YOUNGS WJ *Anticancer activity of Ag(I) N-Heterocyclic carbene complexes derived from 4,5-dichloro-1H-imidazole*, Metal-Based Drugs, 2008, 2008: 1-7.
  - MELAIYE A AND YOUNGS WJ *Silver and its application as an antimicrobial agent*, Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2005, 15(2): 125-130.
  - MERCS L AND ALBRECHT M *Beyond catalysis: N-heterocyclic carbene complexes as components for medicinal, luminescent, and functional materials applications*, Chem. Soc. Rev., 2010, 39: 1903-1912.
  - MILLS JK AND NEEDHAM D *The materials engineering of temperature-sensitive liposomes*, Methods Enzymol., 2004, 387:82-113
  - MIRAKABAD FST, NEJATI-KOSHKI K, AKBARZADEH A, YAMCHI MR, MILANI M, ZARGHAMI N, ZEIGHAMIAN V, RAHIMZADEH A, ALIMOHAMMADI S, HANIFEHPOUR Y, JOO SW *PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems*, Asian Pac. J. Cancer. Prev., 2014, 15(2): 517-535.
  - MIRANDA-VIZUETE A, DAMDIMOPOULOS AE, PEDRAJAS JR, GUSTAFSSON JA, SPYROU G *Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expression and genomic organization*, Eur J Biochem., 1999, 261(2): 405-412.



- MISHRA A, BEHERA RK, BEHERA PK, MISHRA BK, BEHERA GB *Cyanines during the 1990s: a review*, Chem. Rev., 2000, 100: 1973-2011.
- MIYAZAKI Y, NAKAMIZO M, SHIBASAKI T, KIRINO T, KAWAHARA K, OTSUKA K, TACHIBANA H, YAMADA K, TACHIKAWAET D *Immune enhancing effects of fucoidan-agaricus mix under treatment of an immunosuppressive anti-cancer agent (TUM7P.939)*, J. Immunol., 2014, 192 (1) 203.21.
- MOGHASSEMI S AND HADJIZADEH A, *Nano-niosomes as nano scale drug delivery systems: an illustrated review*, Journal of Controlled Release, 2014, 185: 22-36.
- NIELSEN D, MAARE C, SKOVSGAARD T *Kinetics of daunorubicin transport in Ehrlich ascites tumor cells with different expression of P-glycoprotein*, Biochem Pharmacol., 1994, 47(12): 2125-35.
- NORELLI D *Sintesi e caratterizzazione di nanoparticelle fluorescenti di PLGA per applicazioni in teranostica*, 2017.
- OTSUKA H, NAGASAKI Y, KATAOKA K *PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2003, 55: 403–419.
- PALCHETTI S, POZZI D, MAHMOUDI M, CARACCILO G *Exploitation of nanoparticle–protein corona for emerging therapeutic and diagnostic applications*, J. Mater. ChemB, 2016, 4: 4376-4381.
- PANYAM J AND LABHASETWAR V *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue*, Adv. Drug Deliv. Rev., 2003, 55(3): 329-47.
- PANYAM J AND LABHASETWAR V *Sustained cytoplasmatic delivery of drugs with intracellular receptors using biodegradable nanoparticles*, Molecular Pharmaceutics, 2003, 1(1): 77-84.
- PARDOLL DM *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*, Nat. Rev. Cancer., 2012, 12(4): 252-264.

- PASCUAL-AHUIR A, MANZANARES-ESTREDE R S, AND PROFT M  
*Pro- and antioxidant functions of peroxisome-mitochondria connection and its impact on aging and disease*, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 2017: 1-17.
- PATONAY G, KIM JS, KODAGAHALLY R, STREKOVSKY L  
*Spectroscopic Study of a Novel Bis(heptamethine cyanine)Dye and Its Interaction with Human Serum Albumin*, *Applied Spectroscopy*, 2005, 59(5): 682-690.
- PATRA M, GASSER G, METZLER-NOLTE N *Small organometallic compounds as antibacterial agents*, *Dalton Trans.*, 2012, 41: 6350-6358.
- PAWAR VK, SINGH Y, SHARMA K, SHRIVASTAV A, SHARMA A, SINGH A, MEHER JG, SINGH P, RAVAL K, KUMAR A, BORA HK, DATTA D, LAL J, CHOURASIA MK *Improved chemotherapy against breast cancer through immunotherapeutic activity of fucoidan decorated electrostatically assembled nanoparticles bearing doxorubicin*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 122: 1100-1114.
- PELLEI M, GANDIN V, MARINELLI M, MARZANO C, YOUSUFUDDIN M, DIAS HV, SANTINI C *Synthesis and biological activity of ester- and Amide- functionalized imidazolium salts and related water-soluble coinage metal N-Heterocyclic carbene complexes*, *Inorg. Chem.*, 2012, 51: 9873-9882.
- PEREZ JM, FUERTES MA, ALONSO C, NAVARRO-RANNINGER C  
*Current status of the development of trans-platinum antitumor drugs*, *Critical Review in Oncology/Hematology*, 2000, 35(2): 109-120.
- PITTI RM, MARSTERS SA, LAWRENCE DA, ROY M, KISCHKEL FC, DOWD P, HUANG A, DONAHUE CJ, SHERWOOD SW, BALDWIN DT, GODOWSKI PJ, WOOD WI, GURNEY AL, HILLAN KJ, COHEN RL, GODDARD AD, BOTSTEIN D, ASHKENAZI A *Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer*, *Nature*, 1998, 396: 699-703.

- RAY S, MOHAN R, SINGH JK, SAMANTARAY MK, SHAIKH MM, PANDA D, GHOSH P *Anticancer and Antimicrobial Metallopharmaceutical Agents Based on Palladium, Gold, and Silver N-Heterocyclic Carbene Complexes*, J. Am. Chem. Soc., 2007, 129: 15042-15053.
- RABIK CA AND DOLAN ME *Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents*, Cancer Treatment Reviews, 2007, 33: 9– 23.
- RABINOVICH GA, GABRILOVICH D, SOTOMAYOR EM *Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells*, 2007, Annu. Rev. Immunol., 25: 267–96.
- RAKESH RK *Transport of Molecules, Particles, and Cells in Solid Tumors*, Annual Review of Biomedical Engineering, 1999, 1:241-263.
- RANINGA PV, LEE AC, SINHA D, SHIH YY, MITTAL D, MAKHALE A, BAIN AL, NANAYAKARRA D, TONISSEN KF, KALIMUTHO M, KHANNA KK *Therapeutic cooperation between auranofin, a thioredoxin reductase inhibitor and anti-PD-L1 antibody for treatment of triple-negative breast cancer*, Int J Cancer., 2019, 00: 1-14.
- RAO CNR, GOVINDARAJA A AND VIVEKCHANDA SRC *Inorganic nanomaterials: current status and future prospects*, Annual Reports Section "A" (Inorganic Chemistry), 2006, 102: 20-45.
- ROSENBERG B, VANCAMP L, TROSKO JE, MANSOUR VH *Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents*, Nature, 1969, 222: 385-386.
- ROSER M, FISCHER D, KISSEL T *Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats*, 1998, Eur. J. Pharm. Biopharm, 1998, 46(3): 255-63
- SAFARI J AND ZARNEGAR Z *Advanced drug delivery systems: nanotechnology of health design a review*, Journal of Saudi Chemical Society, 2014, 18: 85-99.

- SAITOH M, NISHITOH H, FUJII M, TAKEDA K, TOBIUME K, SAWADA Y, KAWABATA M, MIYAZONO K, ICHIJO H *Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1*, EMBO J., 1998, 17(9): 2596-606.
- SARAVANAKUMAR K, HU X, SHANMUGAM S, CHELLIAH R, SEKAR P, OH DH, VIJAYAKUMAR S, KATHIRESAN K, WANG MH *Enhanced cancer therapy with pH-dependent and aptamer functionalized doxorubicin loaded polymeric (poly D, L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 2019, 671: 143-151.
- SHAO L, DICCIANNI MB, TANAKA T, GRIBI R, YU AL, PULLEN JD, CAMITTA BM, YU J *Thioredoxin expression in primary T-cell acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic implication*, Cancer Res., 2001, 61(19): 7333-7338.
- SIES H AND CADENAS E *Oxidative stress: damage to intact cells and organs*, Philos Trans R Soc. Lond. B Biol Sci, 1985, 17: 617-31.
- SMALLBONE K, GAVAGHAN DJ, GATENBY RA, MAINI PK *The role of acidity in solid tumour growth and invasion* J. Theor. Biol., 2005, 235(4): 476-484.
- SMART DK, ORTIZ KL, MATTSON D, BRADBURY CM, BISHT KS, SIECK LK, BRECHBIEL MW, GIUS D, *Thioredoxin reductase as a potential molecular target for anticancer agents that induce oxidative stress*, Cancer Res., 2004, 64(18): 6716-24.
- SPENCER DM, BILARDI RA, KOCH TH, POST GC, NAFIE JW, KIMURA K, CUTTS SM, PHILLIPS DR *DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: a role for both homologous recombination and nucleotide excision repair*, Mutat. Res., 2008, 638(1-2): 110-21.
- ŠTEFANKOVÁ P, KOLLÁROVÁ M, BARÁK I *Thioredoxin-structural and functional complexity*, Gen. Physiol. Biophys., 2005, 24: 3-11.

- STORM G, BELLIOU SO, DAEMEN T, LASIC DD *Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1995, 17(1): 31-48.
- TACAR O, SRIAMORNSAK P, DASS CR *Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2013, 65(2): 157-70.
- TAMADA JA AND LANGER R *Erosion kinetics of hydrolytically degradable polymers*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*, 1993, 90(2): 552-6.
- TEYSSOT ML, JARROUSSE AS, MANIN M, CHEVRY A, ROCHE S, NORRE F, BEAUDOIN C, MOREL L, BOYER D, MAHIOU R, GAUTIER *A Metal-NHC complexes: a survey of anti-cancer properties*, *Dalton Trans.*, 2009, 35: 6894–6902.
- THORN CF, OSHIRO C, MARSH S, HERNANDEZ-BOUSSARD T, MCLEOD H, KLEIN TE, ALTMAN RB *Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects*, *Pharmacogenetics and Genomics*, 2011, 21:440-446.
- TOKUMARU T, SHIMIZU Y, FOX CL JR. *Antiviral activities of silver sulfadiazine in ocular infection*, *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.*, 1974, 8(1):151-158.
- TSIMBERIDOU AM, BRAITEH F, STEWART DJ, KURZROCK R *Ultimate Fate of Oncology Drugs Approved by the US Food and Drug Administration Without a Randomized Trial*, *Journal of Clinical Oncology*, 2009, 27(36): 6243-6250.
- VAN VLERKEN LE AND AMIJI MM *Multi-functional polymeric nanoparticles for tumour-targeted drug delivery*, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2006, 3(2): 205-216.
- VASIR JK AND LABHASETWAR V *Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 59: 718-728.
- WANG AZ, LANGER R, FAROKHZAD OC *Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs*, *Annu. Rev. Med.*, 2012, 63: 185-198.

- WANG D AND LIPPARD SJ *Cellular processing of platinum anticancer drugs*, Nat. Rev. Drug Discov., 2005, 4(4): 307-320.
- WEIDNER N, CARROLL PR, FLAX J, BLUMENFELD W, FOLKMAN J *Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma*, 1991, The New England Journal Medicine, 324(1): 1-8.
- WELSH S, BELLAMY WT, BRIEHL MM, POWIS G *The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis*, Cancer Res. 2002, (62): 5089 – 5095.
- WHITESIDE TL *The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth*, 2008, Oncogene, 27: 5904-5912
- WUSIMAN A, GU P, LIU Z, XU S, ZHANG Y, HU Y, LIU J, WANG D, HUANG X *Cationic polymer modified PLGA nanoparticles encapsulating Alhagi honey polysaccharides as a vaccine delivery system for ovalbumin to improve immune responses*, Int. J. Nanomedicine 2019, 14: 3221-3234.
- XU T, ZHANG N, NICHOLS HL, SHI D, WEN X *Modification of nanostructured materials for biomedical applications*, Materials Science and Engineering C, 2007, 27: 579-594.
- YAMADA M, TOMIDA A, YOSHIKAWA H, TAKETANI Y, TSURUO T *Increased expression of thioredoxin/adult T-cell leukemia-derived factor in cisplatin-resistant human cancer cell lines*, Clin. Cancer Res., 1996, 2: 427-432.
- YANG F, TEVES SS, KEMP CJ, HENIKOFF S *Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics*, Biochimica et Biophysica Acta, 2014, 1845(1): 84-89.
- YAŞAR S, KÖPRÜLÜ TK, TEKİN S, YAŞAR SM *Synthesis, characterisation and cytotoxic properties of N-heterocyclic carbene silver(I) complexes*, Inorganica Chimica Acta, 2018, 479: 17-23.

- YOKOMIZO A, ONO M, NANRI H, MAKINO Y, OHGA T, WADA M, OKAMOTO T, YODOI J, KUWANO M, KOHNO K *Cellular levels of thioredoxin associated with drug sensitivity to cisplatin, mitomycin C, doxorubicin, and etoposide*, *Cancer. Res.* 1995, 55(19): 4293-6.
- YOO HS, OH JE, LEE KH, PARK TG *Biodegradable nanoparticles containing doxorubicin-PLGA conjugate for sustained release*, *Pharm. Res.*, 1999, 16: 1114–1118.
- YOO HS, LEE KH, OH JE, PARK TG *In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates*, *Journal of Controlled Release*, 2000, 68: 419-431.
- ZHOU Y, HILEMAN EO, PLUNKETT W, KEATING MJ, HUANG P *Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents*, *Blood*, 2003, 101(10): 4098-4104.

## 7. RINGRAZIAMENTI

INIZIARE E CONCLUDERE UN DOTTORATO NON È SEMPLICE. INVESTIRE TRE ANNI DELLA PROPRIA VITA POTREBBE RIVELARSI UN AZZARDO. BISOGNA TENTARE, A VOLTE NON SI HA ALTRO CHE IL RISCHIO A DISPOSIZIONE, SOPRATTUTTO QUANDO UNA PASSIONE SEMBRA NON VOLERTI LASCIARE ANDARE. LA BIOLOGIA PER ME È STATA QUESTO. ME NE SONO INNAMORATO A 15 ANNI NELL'UNICO ANNO DELLE SUPERIORI DOVE MI È STATA INSEGNATA E FIN DA SUBITO HO CAPITO CHE SAREBBE DIVENTATA QUALCOSA CHE MI AVREBBE ACCOMPAGNATO NEGLI ANNI SUCCESSIVI. L'HO AMATA E RIPUDIATA MA È SEMPRE TORNATA A FAR PARTE DI ME IN QUALCHE MODO.

E' DIFFICILE STILARE UNA LISTA DI PERSONE DA RINGRAZIARE PERCHÉ SPESSO SI PENSA SOLO A CHI TI HA DATO UNA MANO (E CE NE SONO MOLTE) MA ANCHE CHI NON SEMPRE ERA D'ACCORDO CON ME MI HA INSEGNATO AD APPREZZARE ULTERIORMENTE IL CONTRIBUTO DEGLI ALTRI.

NON SON STATI TRE ANNI FACILI ANCHE A CAUSA DELLA MIA VITA PERSONALE, SEMPRE COSÌ DISSESTATA, MA SON STATI ANNI UTILI. HO IMPARATO MOLTO DA CHI HA CONDIVISO CON ME IL SUO SAPERE. QUESTA È STATA SEMPRE PER ME LA SCIENZA: CONDIVIDERE IL SAPERE CON IL PROSSIMO. SENZA CONDIVISIONE NON ESISTEREBBE NIENTE. I LABORATORI SAREBBERO DEI CUBICOLI VUOTI E FREDDI.

NON SO COME PROSEGUIRÀ IL MIO FUTURO MA RINGRAZIO TUTTI QUELLI CHE HAN FATTO PARTE DEL MIO PERCORSO E CHE HANNO CONTRIBUITO PORTANDO UN PO' DI SÉ IN QUESTI TRE ANNI PASSATI IN LABORATORIO.

SE SAI DI FAR PARTE DI QUELLE PERSONE:

GRAZIE.

*ALFONSO DELL'ACCIO*