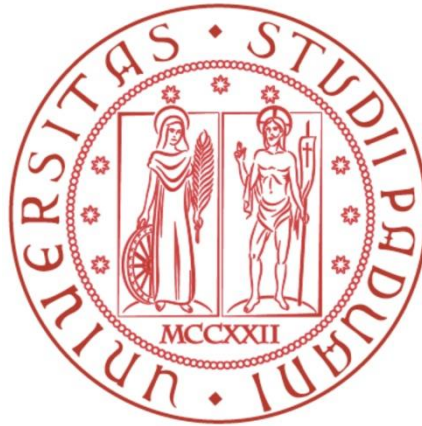


Università degli studi di Padova

Dipartimento di Biologia

Corso di Laurea in Scienze Naturali



Elaborato di Laurea

**Trattamento combinato di chemioterapia e terapia fotodinamica
di cellule tumorali *in vitro*.**

**Combination of chemotherapy and photodynamic therapy for the
treatment of tumor cells *in vitro*.**

Tutor: Prof.ssa Elena Reddi
Dipartimento di Biologia

Co-Tutor: Dott.ssa Francesca Moret
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Camilla Lucca

Anno Accademico 2016/2017

INDICE

1. ABSTRACT	pag. 3
2. INTRODUZIONE	pag. 5
2.1 Terapia fotodinamica (PDT)	pag. 5
2.1.1 Meta-tetra(idrossifenil)clorina (mTHPC)	pag. 8
2.2 Chemioterapia	pag. 10
2.2.1 Docetaxel (DTX)	pag. 10
2.3 Terapie combinate	pag. 13
3. SCOPO DELLA TESI	pag. 15
4. MATERIALI E METODI	pag. 16
4.1 Soluzioni e prodotti commerciali	pag. 16
4.2 Linea cellulare	pag. 17
4.3 Subcoltura cellulare	pag. 17
4.4 Semina cellulare per gli esperimenti di vitalità cellulare	pag. 18
4.5 Trattamenti con mTHPC, DTX e loro combinazione in assenza di irradiazione	pag. 19
4.6 PDT <i>in vitro</i>	pag. 20
4.7 Saggio MTS	pag. 20
4.8 Analisi statistica	pag. 21
5. RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 22
5.1 Citotossicità docetaxel (DTX), mTHPC e loro combinazione in assenza di luce	pag. 22
5.2 Citotossicità di mTHPC e mTHPC + DTX in presenza di luce	pag. 24
5.3 Citotossicità di DTX + mTHPC somministrati in sequenza in assenza di luce	pag. 25
6. CONCLUSIONI	pag. 27
BIBLIOGRAFIA	pag. 29

1. ABSTRACT

La combinazione di più terapie nel trattamento antitumorale rappresenta un approccio medico oggi molto utilizzato che consente di ottenere un effetto terapeutico nettamente maggiore di quello osservato in seguito alle rispettive monoterapie. Le terapie tradizionali, se applicate singolarmente, spesso non sono sufficienti ad eradicare completamente il tumore, rendendo elevato il rischio di recidive. Frequente causa di insuccesso della monoterapia è, inoltre, l'insorgenza di meccanismi di farmacoresistenza e di importanti effetti collaterali che possono rendere necessaria una interruzione anticipata del trattamento. L'utilizzo di più farmaci con differenti profili di tossicità, infine, consente di somministrare il farmaco più tossico in dosi minori riducendo, così, gli effetti collaterali. In questa tesi è stato valutato, in particolare, l'effetto del trattamento combinato di terapia fotodinamica (PDT) e chemioterapia in cellule tumorali HeLa, derivanti da un adenocarcinoma della cervice uterina. Il chemioterapico utilizzato è il docetaxel (DTX) e il fotosensibilizzante per la PDT è la meta-tetra(idrossifenil)clorina (mTHPC). Le cellule sono state incubate con concentrazioni crescenti di DTX e mTHPC, co-somministrando i due farmaci oppure con somministrazioni sequenziali. L'efficacia terapeutica è stata misurata in termini di citotossicità mediante saggio di vitalità cellulare MTS. I risultati ottenuti individuano la presenza di un'interazione negativa tra i due farmaci quando somministrati contemporaneamente, che comporta un'inibizione dell'attività del chemioterapico per concentrazioni inferiori a 0.03 µg/ml e che sembra essere, pertanto, dose-dipendente. Ulteriori esperimenti mostrano tuttavia che l'attività citotossica del chemioterapico alla concentrazione di 0.03 µg/ml non risulta alterata se l'mTHPC viene aggiunto al mezzo di incubazione delle cellule 4 ore dopo il DTX, suggerendo la necessità di ulteriori studi per la definizione di specifici protocolli di somministrazione dei farmaci considerati.

2. INTRODUZIONE

2.1 TERAPIA FOTODINAMICA (PDT)

La terapia fotodinamica (PDT) è una modalità terapeutica approvata per il trattamento di varie tipologie di tumori solidi e alcune patologie non oncologiche. Questa tecnica innovativa prevede la somministrazione di un particolare agente fotosensibilizzante (PS) e la sua successiva attivazione tramite irradiazione con luce di specifica lunghezza d'onda. Le lunghezze d'onda più indicate sono quelle del vicino infrarosso poiché penetrano maggiormente attraverso i tessuti così da migliorare l'efficacia terapeutica. Il potere di penetrazione della luce nei tessuti biologici risulta massimo in un intervallo denominato "finestra terapeutica", che include radiazioni di lunghezza d'onda compresa tra 600 e 1200 nm. Tuttavia, lunghezze d'onda superiori a 800 nm non vengono impiegate nel trattamento PDT poiché non possiedono energia sufficiente per dare inizio alla reazione fotodinamica (Agostinis *et al.*, 2011). Una volta attivato, il PS eccitato trasferisce l'energia assorbita all'ossigeno, portando alla formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), altamente citotossiche, che possono condurre a morte cellulare per apoptosi o necrosi (Master *et al.*, 2013).

I fotosensibilizzanti, quando si trovano nel loro stato fondamentale di singoletto (S_0), possiedono due elettroni con orientamento antiparallelo, localizzati in orbitali a bassa energia in una condizione estremamente stabile. L'assorbimento della luce da parte del PS provoca il trasferimento di un elettrone in un orbitale ad energia maggiore e la conversione del fotosensibilizzante dallo stato S_0 allo stato eccitato di singoletto (S_1). In questa nuova forma il PS risulta altamente instabile e tende dunque a tornare al suo stato fondamentale, processo che avviene mediante emissione di energia sotto forma di fluorescenza o calore. Può avvenire, inoltre, un processo denominato "intersystem crossing", durante il quale il PS allo stato instabile di singoletto (S_1) viene convertito in uno stato più stabile di tripletto (T_1), mediante inversione dello spin di uno dei due elettroni (Agostinis *et al.*, 2011). A seconda della quantità di ossigeno presente nel tessuto possono avvenire, a livello cellulare, due tipi di fotoreazioni denominate di tipo I e di tipo II, mediante le quali il PS allo stato eccitato di tripletto (T_1) decade nuovamente allo stato fondamentale di singoletto (S_0) trasferendo energia. La reazione di tipo I avviene in tessuti caratterizzati da una bassa concentrazione di ossigeno e si basa sull'interazione diretta tra il PS allo stato eccitato di tripletto (T_1) e un substrato biologico. Le specie radicaliche così prodotte, reagiscono rapidamente con l'ossigeno molecolare presente nel sito di reazione portando alla formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che giocano un ruolo fondamentale nel danneggiamento cellulare mediato dalla PDT. La reazione di tipo II ha luogo in tessuti che

presentano un'alta concentrazione di ossigeno e prevede il trasferimento diretto di energia dal PS all'ossigeno molecolare, portando alla sua conversione in ossigeno di singoletto ($^1\text{O}_2$), una forma molto reattiva e citotossica che danneggia profondamente il tessuto bersaglio (Oniszczuk *et al.*, 2016). Pertanto, il trattamento con PDT richiede la presenza di tre elementi fondamentali: un fotosensibilizzante, che rende il tessuto bersaglio sensibile alla fonte luminosa; una luce di appropriata lunghezza d'onda in grado di attivare il PS e una sufficiente quantità di ossigeno molecolare nel sito bersaglio. L'efficacia terapeutica è raggiunta solo in presenza di un'adeguata cooperazione tra questi elementi.

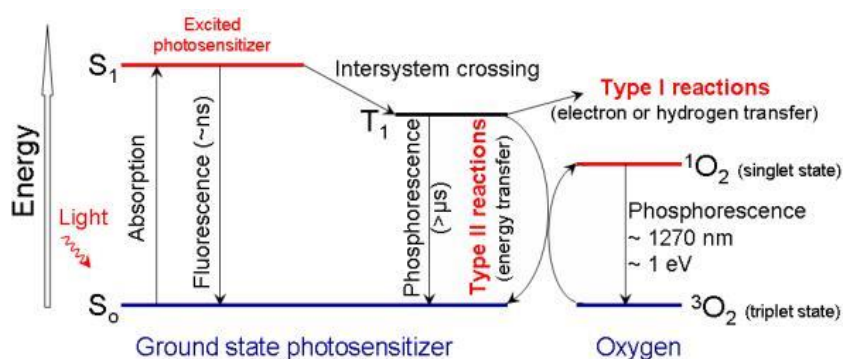


Figura 2.1: Processo di attivazione del fotosensibilizzante (PS), illustrato tramite un diagramma di Jablonski modificato (Agostinis *et al.*, 2011).

La terapia fotodinamica (PDT) rappresenta una tecnica minimamente invasiva in grado di distruggere il tumore mediante molteplici meccanismi d'azione. L'attività antitumorale della PDT consiste in un effetto citotossico diretto, che colpisce le cellule tumorali portandole a morte per necrosi o apoptosi, e in un'azione indiretta, che induce un'alterazione della vascolarizzazione del tumore, portando ad una diminuzione del flusso sanguigno a livello microcircolatorio con conseguente ipossia e morte cellulare (Krammer, 2001). In aggiunta, la PDT induce un'acuta risposta infiammatoria locale, con conseguente attivazione della risposta immunitaria contro le cellule tumorali (Korbelik, 2009). Il controllo a lungo termine del tumore è possibile solo mediante un'adeguata interazione tra questi meccanismi d'azione (Dolmans *et al.*, 2003). L'efficacia del trattamento con PDT dipende strettamente dal tipo di fotosensibilizzante, dalla sua concentrazione nel sistema vascolare e nel sito tumorale e dalla sua localizzazione intracellulare. I principali siti di accumulo dei PS all'interno delle cellule bersaglio, che possono essere individuati mediante studi di microscopia di fluorescenza, sono: membrana plasmatica, mitocondri, lisosomi, reticolo endoplasmatico e apparato di Golgi (Castano, 2004). I fotosensibilizzanti tendono invece a non accumularsi nel nucleo, evitando eventuali danni al DNA, insorgenza di mutazioni e carcinogenesi (Allison e Sibata, 2010). Un buon fotosensibilizzante per PDT deve inoltre possedere determinate caratteristiche che consentano il raggiungimento degli

effetti fototossici desiderati. Un PS ideale deve essere chimicamente puro e di composizione nota; deve presentare minima tossicità al buio ed attivarsi solo dopo irradiazione; deve inoltre accumularsi preferenzialmente nel tessuto tumorale ed essere eliminato rapidamente in modo da garantire bassa tossicità sistemica; deve infine avere coefficiente di assorbimento massimo a lunghezze d'onda comprese tra 600-800 nm, caratterizzate da elevato potere di penetrazione nei tessuti (Sharman *et al.*, 1999).

I primi composti utilizzati nel trattamento con PDT, definiti fotosensibilizzanti di prima generazione, sono le porfirine, caratterizzate da una struttura ciclica costituita da quattro anelli pirrolici legati da ponti metinici. Il primo PS approvato nel 1993 per il trattamento di molteplici tipologie tumorali, quali il cancro della cervice uterina, dei bronchi, dell'esofago, vescica e il tumore gastrico (Dolmans *et al.*, 2003) è un derivato parzialmente purificato dell'ematoporfirina (HpD), conosciuto con il nome commerciale di Photofrin. Sebbene questo farmaco risulti efficace e ampiamente utilizzato in PDT, presenta alcuni importanti limiti, che hanno indotto i ricercatori verso la sintesi di nuove molecole. Il Photofrin è, infatti, costituito da una miscela di monomeri ed oligomeri di diverse porfirine, non ben definita chimicamente. Esso presenta inoltre scarso assorbimento alla lunghezza d'onda di 630 nm, e affinché abbia effetto deve essere somministrato in dosi elevate. Il Photofrin, infine, tende ad accumularsi prevalentemente nella pelle, dove permane per 4-6 settimane, durante le quali si osserva elevata fotosensibilità cutanea (Sibata *et al.*, 2001). Le clorine e, in particolare, la meta-tetra(idrossifenil)clorina (mTHPC) utilizzata in questo lavoro di tesi, appartengono ai PS di seconda generazione (vedi 2.2.1).

I PS si accumulano preferenzialmente nel tessuto tumorale. I meccanismi che regolano tale distribuzione non sono del tutto noti ma un ruolo predominante viene attribuito alla natura stessa del tessuto neoplastico. Esso, infatti, si distingue dal tessuto sano per la presenza di un sistema vascolare alterato, un pH più acido rispetto ai tessuti normali, un elevato numero di recettori per lipoproteine plasmatiche, una composizione stromale anomala e per la mancanza di un efficiente drenaggio linfatico (Dougherty *et al.*, 1998). L'accumulo selettivo del farmaco nel sito tumorale rappresenta tuttavia, ancor oggi, un traguardo solo ideale. La selettività del trattamento con PDT è garantita dall'utilizzo di moderni sistemi di distribuzione della luce che consentono di raggiungere con elevata precisione anche tumori situati in profondità. Inoltre, poiché l'ossigeno di singoletto (1O_2) prodotto dalla reazione fotodinamica ha vita breve e presenta un ridotto raggio d'azione, l'effetto fototossico indotto da PDT riflette il sito di localizzazione del PS al momento dell'irradiazione, rendendo minimo il danno ai tessuti sani circostanti (Allison, 2014). Se paragonata alle tradizionali tecniche terapeutiche quali chemioterapia, radioterapia e chirurgia, la PDT

offre dunque innumerevoli vantaggi. Oltre ad essere selettiva, la PDT risulta minimamente invasiva, avendo come unico effetto collaterale una variabile fotosensibilità cutanea nelle settimane successive al trattamento. La PDT può inoltre essere somministrata in day hospital e richiede tempi di infusione non elevati, risultando talvolta già efficace dopo il primo trattamento. La PDT trova ampie applicazioni anche nel trattamento di patologie non oncologiche, specialmente in campo dermatologico, dove viene impiegata per la cura di herpes, acne e psoriasi (Oniszczyk *et al.*, 2016). Recenti studi hanno inoltre individuato un possibile utilizzo della PDT come terapia antimicrobica (aPDT) (Rosa e da Silva, 2014). Infine, la PDT viene somministrata in pazienti che presentano tumori resistenti a chemioterapia e radioterapia con scopo palliativo.

2.1.1 Meta-tetra(idrossifenil)clorina (mTHPC)

La meta-tetra(idrossifenil)clorina (mTHPC, nome commerciale Foscan®) rappresenta uno tra i più noti fotosensibilizzanti di seconda generazione impiegati in PDT, approvato in Europa per il trattamento di tumori di testa e collo. La struttura chimica è costituita da quattro anelli pirrolici, di cui uno in forma ridotta, uniti tra loro da ponti metinici e legati a quattro fenili idrossilati in posizione *meta* (Fig. 2.2).

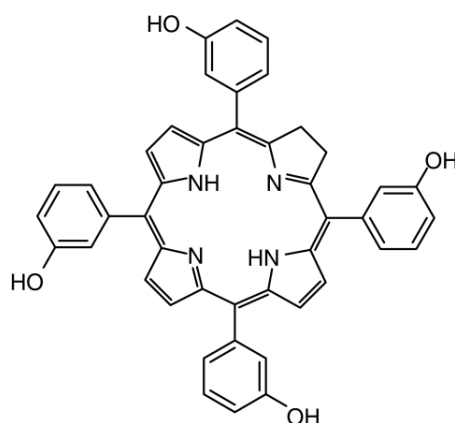


Figura 2.2: Struttura chimica della meta-tetra(idrossifenil)clorina (mTHPC).

L'mTHPC rappresenta un farmaco di ampio interesse clinico, che consente il raggiungimento degli effetti terapeutici desiderati nonostante le dosi e la luce vengano somministrate in quantità fino a cento volte inferiori a quelle necessarie nel trattamento PDT con Photofrin (Triesscheijn *et al.*, 2005). Questa clorina altamente idrofobica, una volta internalizzata nelle cellule bersaglio, tende a localizzarsi nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato di Golgi mentre i mitocondri non sembrano essere un sito preferenziale di accumulo di questo particolare agente fotosensibilizzante. L'elevata idrofobicità di tale

molecola, la rende tuttavia poco solubile nel circolo sanguigno, promuovendo la formazione di aggregati e limitandone, così, l'efficacia terapeutica (Petri *et al.*, 2012). Una migliore veicolazione al tessuto tumorale viene pertanto garantita tramite l'incorporazione di questo PS in nanostrutture, generando formulazioni adatte alla somministrazione endovenosa denominate Foslip e Fospeg (Senge, 2011). Se sciolta in solventi organici, l'mTHPC mantiene la sua forma monomerica e presenta il tipico spettro di assorbimento come si può vedere in Figura 2.3.

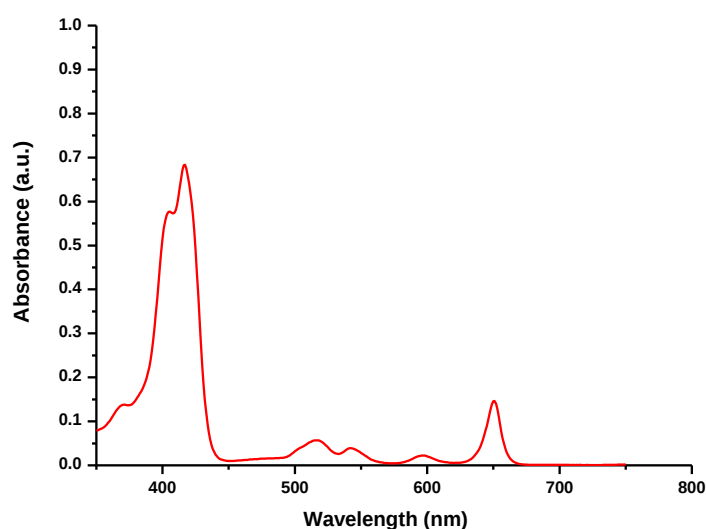


Figura 2.3: Spettro di assorbimento dell'mTHPC.

Il picco massimo di assorbimento si osserva a 416 nm e corrisponde alla cosiddetta “banda di Soret”. Vi sono poi picchi minori a 520, 540, 600 e 650 nm. L'attivazione dell'mTHPC in PDT si ottiene mediante somministrazione di luce alla lunghezza d'onda di 650 nm. Generalmente l'irradiazione viene effettuato dopo un certo intervallo di tempo dalla somministrazione dei fotosensibilizzanti, in modo da consentirne l'ingresso nelle cellule tumorali. Diversi studi hanno dimostrato, tuttavia, che un'elevata concentrazione sistemica dei PS al momento dell'irradiazione, determina un effetto terapeutico maggiore rispetto a quello osservato nel caso di irradiazione dopo lungo intervallo dalla somministrazione del farmaco (Agostinis *et al.*, 2011). Nel caso dell'mTHPC viene confermata tale evidenza (Cramers *et al.*, 2003).

2.2 CHEMIOTERAPIA

La chemioterapia rappresenta la forma di trattamento principale per la cura di tumori in stadio avanzato. I pazienti possono essere sottoposti a chemioterapia prima della chirurgia, con lo scopo di ridurre le dimensioni del tumore e semplificarne l'asportazione (chemioterapia neoadiuvante) e in seguito al trattamento chirurgico, con lo scopo di aumentare l'efficacia terapeutica e di rendere minimo il rischio di recidive (chemioterapia adiuvante). I tradizionali agenti chemioterapici presentano elevata citotossicità e agiscono interferendo con diverse fasi del ciclo cellulare. Il loro bersaglio è rappresentato da cellule neoplastiche in rapida proliferazione. Tuttavia, data la scarsa selettività di questi farmaci, vengono in parte danneggiate anche cellule sane, in special modo quelle caratterizzate da processi di divisione particolarmente rapidi, come le cellule presenti nel midollo osseo, nel tratto digestivo, nei follicoli piliferi e nelle gonadi. Ne conseguono gravi effetti collaterali quali mielosoppressione, nausea, vomito, perdita dei capelli e riduzione della fertilità (Corrie, 2008). I farmaci chemioterapici impiegati nel trattamento antitumorale appartengono a diverse categorie e vengono comunemente classificati in base al loro meccanismo d'azione. I Taxani costituiscono un'importante famiglia di farmaci ad azione antimitotica la cui scoperta risale agli anni Sessanta, quando ricerche condotte dal *National Cancer Institute* (NCI) rivelarono che un estratto della corteccia del *Taxus brevifolia*, un tasso della costa californiana del Pacifico, mostrava attività antineoplastica in diverse tipologie tumorali. Fu in seguito a questa osservazione che venne isolato e caratterizzato il primo componente di tale classe farmacologica, denominato paclitaxel (taxolo) (Wani *et al.*, 1971). Tuttavia, difficoltà incontrate nell'estrazione e nella formulazione di questa molecola, in aggiunta alla sua scarsa disponibilità, condussero ad ulteriori studi che portarono i ricercatori dell'*Institut de Chimie des Substances Naturelles* in Francia, in collaborazione con il *Centre National de la Recherche Scientifique* e *Rhône-Poulenc Rorer*, alla sintesi del docetaxel, un analogo semisintetico del paclitaxel.

2.2.1 Docetaxel (DTX)

Il docetaxel (taxotere) è un farmaco chemioterapico di ampio interesse clinico e rappresenta uno dei più attivi agenti antineoplastici impiegati nel trattamento di tumori solidi. Utilizzato per contrastare molteplici patologie tumorali, questo composto si dimostra particolarmente efficace in caso del tumore al seno e ovaie, carcinoma polmonare non a piccole cellule e tumori di testa e collo (Cortes *et al.*, 1995). Il docetaxel appartiene ai taxani di seconda generazione e viene sintetizzato a partire dal 10-deacetyl baccatin III, un precursore non

citotossico estratto dagli aghi di un tasso europeo, il *Taxus baccata*, che viene successivamente esterificato con una catena laterale sintetizzata chimicamente (Colin *et al.*, 1989).

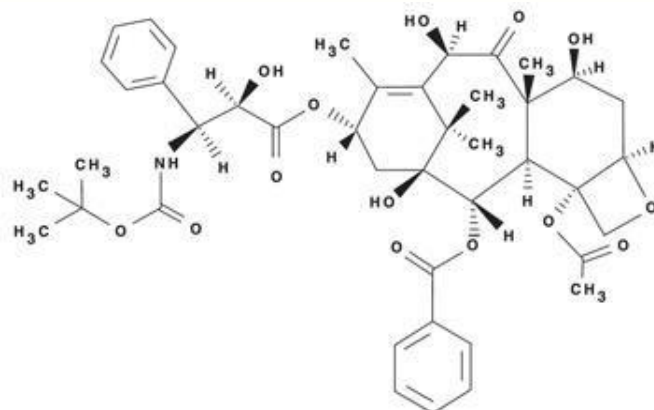


Figura 2.4: Struttura chimica del docetaxel (DTX).

Studi condotti *in vitro* hanno dimostrato che il docetaxel condivide il medesimo meccanismo d'azione antitumorale proprio di tutti i taxani (Ringel e Horwitz, 1991). Questa classe farmacologica agisce a livello dei microtubuli del citoscheletro, interferendo con le normali funzioni vitali della cellula associate al delicato equilibrio esistente tra polimerizzazione e depolimerizzazione di queste strutture cellulari. I microtubuli sono complesse strutture tubulari presenti in tutte le cellule eucariotiche. Sono costituiti da un eterodimero di proteine globulari, la α -tubulina e la β -tubulina. Questi polimerizzano disponendosi in modo alternato dando origine a lunghi protofilamenti che successivamente si associano per dare origine ai singoli microtubuli. Si tratta di strutture dinamiche, che si allungano e si accorciano continuamente mediante l'aggiunta e la rimozione di eterodimeri di tubulina alle due estremità. Questa proprietà dei microtubuli è strettamente correlata alle loro molteplici funzioni. Essi, infatti, oltre a ricoprire un ruolo cruciale durante il processo di divisione cellulare, contribuendo alla formazione del fuso mitotico, sono attivi anche durante l'interfase, garantendo il mantenimento della forma, della motilità, della trasmissione dei segnali e del trasporto intracellulare (Dustin, 1980). I taxani si legano preferenzialmente alla subunità β della tubulina, promuovendone la polimerizzazione in microtubuli stabili e disorganizzati e inibendone la fisiologica depolimerizzazione. L'assenza di un fuso mitotico funzionante impedisce un'adeguata migrazione dei cromosomi durante l'anafase della mitosi, con conseguente arresto del ciclo cellulare in fase G2/M e morte cellulare.

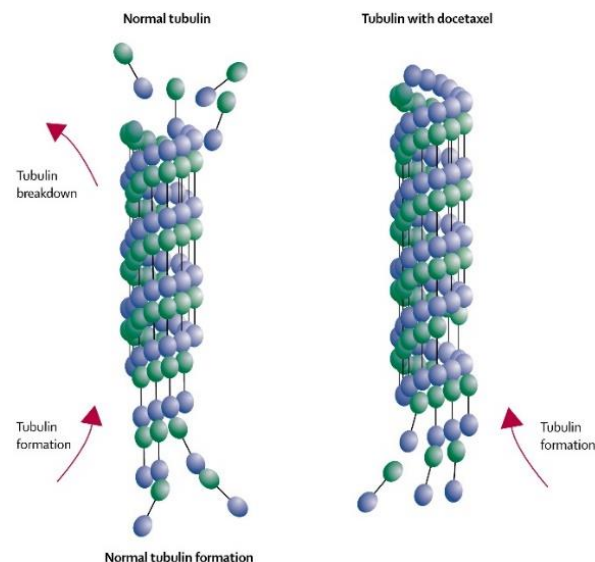


Figura 2.5: Meccanismo d'azione del docetaxel.

Nonostante il docetaxel sia un analogo del paclitaxel e presenti un simile meccanismo d'azione, si osserva un più alto grado di uptake cellulare, una maggiore efficacia nella stabilizzazione dei microtubuli e minore tossicità sistemica (Gueritte-Voegelein *et al.*, 1991). Il trattamento con docetaxel, inoltre, prevede infusioni di breve durata (1h), offrendo considerevoli vantaggi clinici rispetto alla terapia con paclitaxel, che richiede tempi di somministrazione più lunghi (Cortes e Pazdur, 1995). Il docetaxel è altamente insolubile in acqua e viene dunque diluito in solventi organici dando origine alla formulazione attualmente presente in commercio (Taxotere®) composta da 40 mg/ml di DTX e 1040 mg/ml di polisorbato 80 (Tween® 80), diluita con il 13% di etanolo. Diversi sono gli effetti collaterali osservati in seguito all'assunzione di questo potente farmaco antitumorale, molti dei quali sono attribuibili proprio alla tossicità dei solventi organici contenuti nella soluzione farmacologica. Gli effetti collaterali variano a seconda della sensibilità individuale e possono portare, in casi estremi, ad una interruzione anticipata della terapia. I più noti sono neutropenia, alopecia, astenia, nausea e vomito, diarrea, ulcere del cavo orale, reazioni cutanee, reazioni allergiche e ritenzione di liquidi (Ho e Mackey, 2014). Il DTX viene eliminato con le feci (75%) e solo in piccola parte per via urinaria (< 5%) (de Valeriola *et al.*, 1993). L'insorgenza di innumerevoli effetti collaterali in seguito al trattamento con i comuni agenti chemioterapici ha condotto alla continua ricerca di nuovi farmaci che risultino più potenti e più selettivi nei confronti delle cellule neoplastiche e allo sviluppo di sofisticati meccanismi di trasporto al sito tumorale.

2.3 TERAPIE COMBinate

La combinazione di più terapie nel trattamento antitumorale rappresenta una pratica medica molto frequente. L'utilizzo di più farmaci con differenti meccanismi d'azione nel trattamento della patologia tumorale, consente di agire su più fronti a livello cellulare, ottenendo una maggiore efficacia terapeutica e riducendo l'instaurarsi di meccanismi di farmacoresistenza. In alcuni casi le terapie tradizionali, se applicate singolarmente, non sono sufficienti ad eradicare completamente il tumore e il rischio di recidive risulta, pertanto, elevato. Alcune terapie, infatti, come la terapia fotodinamica (PDT), di particolare interesse in questo lavoro di tesi, ma anche radioterapia e chirurgia, agiscono a livello locale direttamente sul tumore primario, non consentendo l'eliminazione di eventuali cellule metastatiche. La combinazione di queste forme di trattamento con terapie che agiscono a livello sistemico, come la chemioterapia, consente dunque di ottenere un controllo maggiore, distruggendo anche eventuali micrometastasi localizzate in organi distanti (Luo *et al.*, 2017). È stato dimostrato, anche nel caso della combinazione di chemioterapia e terapia fotodinamica (PDT) (Jin *et al.*, 1992; Li *et al.*, 2010; Postiglione *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2014), che uno dei vantaggi derivanti dall'associazione di più terapie antitumorali è un aumento dell'effetto terapeutico generale, che risulta maggiore di quello osservato in seguito ai rispettivi trattamenti singoli. La combinazione può portare sia alla somma degli effetti di ciascuna terapia coinvolta, ma anche ad effetti sinergici, permettendo di diminuire la dose del farmaco più tossico e riducendo, così, gli effetti collaterali (Postiglione *et al.*, 2011).

In questa tesi è stata valutata in particolare la combinazione tra terapia fotodinamica (PDT) e chemioterapia. Entrambe le modalità terapeutiche, ampiamente utilizzate nel trattamento antitumorale, presentano tuttavia dei limiti quando somministrate singolarmente. La terapia fotodinamica (PDT), infatti, non risulta curativa nel trattamento di tumori avanzati e metastatici, mentre la chemioterapia è fortemente limitata dall'elevata tossicità sistemica dose-dipendente e dall'insorgenza di farmacoresistenza. Combinando le due forme di trattamento si potrebbe ottenere una maggiore efficacia terapeutica ed una diminuzione della ricomparsa del tumore a distanza di tempo.

3. SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo di questo lavoro è valutare se il trattamento combinato di chemioterapia e terapia fotodinamica (PDT), in cellule tumorali HeLa, possa aumentare l'effetto terapeutico generalmente osservato in seguito al trattamento con il solo chemioterapico o con la sola PDT. Il chemioterapico è il docetaxel (DTX), un potente farmaco antimitotico ampiamente utilizzato in chemioterapia e il fotosensibilizzante usato per la PDT è la metatetra(idrossifenil)clorina (mTHPC), nota con il nome commerciale di Foscan. Per raggiungere tale obiettivo sono stati condotti studi preliminari sulla citotossicità di PDT con mTHPC e DTX somministrati in monoterapia. Le cellule HeLa sono state esposte a concentrazioni crescenti di DTX per 24 h e la vitalità cellulare misurata al termine dell'incubazione così come 24 h dopo (24 + 24 h). In maniera analoga le cellule sono state esposte per 24 h a concentrazioni crescenti di mTHPC e la tossicità del fotosensibilizzante è stata verificata sia al buio che in seguito a PDT *in vitro*. Successivamente, per verificare l'effetto del trattamento combinato, le cellule sono state incubate con concentrazioni crescenti di DTX + mTHPC, con opportuni rapporti di concentrazioni. Come per i trattamenti in monoterapia, la vitalità cellulare è stata misurata dopo 24 h e dopo 24 + 24 h dall'incubazione o 24 h dopo PDT. La tossicità dei farmaci è stata valutata, anche in questo caso, sia in assenza di luce che in seguito a PDT *in vitro*. Il trattamento combinato è stato effettuato co-somministrando DTX e mTHPC oppure con somministrazioni sequenziali in cui mTHPC veniva aggiunto al mezzo di incubazione delle cellule 4 h dopo il DTX, per verificare se l'intervallo tra le due somministrazioni possa produrre una maggiore efficacia terapeutica.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Soluzioni e prodotti commerciali

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*): terreno liquido per colture cellulari fornito dalla ditta *Life Technologies*.

FBS (*Foetal Bovine Serum*): siero bovino fetale fornito dalla ditta *Life Technologies*.

Versene: soluzione acquosa costituita da PBS ed EDTA allo 0.2%.

Trypsina: tripsina bianca liquida allo 0.25% con EDTA, fornita dalla ditta *Life Technologies*.

Trypan Blue: colorante ad esclusione vitale in soluzione acquosa allo 0.4%, fornito dalla ditta *Sigma*.

PBS (*Phosphate Buffered Saline*) **con Ca^{2+} e Mg^{2+}** : soluzione acquosa salina di NaCl, KCl, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ alla quale vengono aggiunti CaCl_2 e MgCl_2 .

DTX (*Docetaxel*): P.M. 807.88; chemioterapico fornito in polvere da *LC Laboratories* (USA) e sciolto in DMSO.

mTHPC (*meta-tetra-idrossifenil*)clorina, nome commerciale *Foscan®*: P.M. 680.77; fotosensibilizzante fornito dalla ditta *Biolitec AJ* (Jena, Germania).

CellTiter 96® AQueous One Solution Proliferation Assay: kit per il test di vitalità cellulare MTS, fornito dalla ditta *Promega Italia S.r.l.*

Materiale plastico: fornito dalla ditta *Falcon®* e *Sarstedt*.

4.2 Linea cellulare

La linea cellulare HeLa (ATCC, USA) deriva da un adenocarcinoma della cervice uterina di una donna di 31 anni, Henrietta Lacks. Le cellule sono mantenute in colture in monostrato in fiasche da 75 cm² in terreno DMEM, contenente 1 g/l di glucosio e 0.1 mM di amminoacidi non essenziali, 100 unità/ml di streptomicina, 100 µg/ml di penicillina G e arricchito con il 10% di FBS (terreno completo). Il tempo di replicazione della linea è di circa 24 h, durante le quali le cellule vengono mantenute in incubatore a 37 °C, 5% di CO₂ e 90% di umidità. Poiché la proliferazione cellulare provoca il progressivo consumo dei fattori nutrizionali contenuti nel terreno ed un graduale accumulo di cataboliti tossici e poiché lo spazio di adesione disponibile nella fiasca si riduce e le cellule giunte a confluenza tendono a staccarsi dalla parete, ogni tre o quattro giorni è necessario subcoltivare le cellule in una nuova fiasca.

4.3 Subcoltura cellulare

Per eseguire la subcoltura è necessario rimuovere il terreno contenuto nella fiasca. In seguito si esegue un lavaggio del monostrato cellulare con 5 ml di versene e il distacco delle cellule dalla fiasca è ottenuto tramite l'aggiunta di 2 ml di tripsina-EDTA allo 0.25%. Le cellule vengono incubate a 37 °C per 4 minuti, al termine dei quali occorre verificare al microscopio ottico che tutte le cellule si siano staccate e, se necessario, si completa il processo di distacco mediante agitazione meccanica della fiasca. L'azione della tripsina viene neutralizzata mediante l'aggiunta di 8 ml di terreno completo (il siero contiene inibitori della tripsina). Dopo un'accurata risospensione, si procede con il trasferimento di parte delle cellule in una nuova fiasca, contenente 12 ml di terreno completo fresco. Generalmente si esegue una diluizione della sospensione cellulare pari a 1:5 per passaggi di tre giorni e 1:7 per passaggi di quattro giorni.

4.4 Semina cellulare per gli esperimenti di vitalità cellulare

Per valutare la vitalità di cellule incubate con mTHPC, DTX o la loro combinazione in assenza di irradiazione o in seguito a PDT *in vitro*, si procede con la semina di 6000 cellule/pozzetto in piastre da 96 pozzetti.

Per effettuare la semina di un numero preciso di cellule bisogna conoscere la quantità di cellule/ml della sospensione cellulare precedentemente staccata da fiasca da 75 cm² con cellule semi-confluenti. Per fare ciò è necessario prelevare una piccola aliquota di sospensione cellulare per la conta al microscopio ottico tramite la camera di Burkner. Questa è costituita da una base in vetro su cui si individuano due settori separati tra loro da un solco orizzontale e contenenti ciascuno un reticolo di conta. Ad 1 mm dal supporto viene posizionato un vetrino coprioggetto. Ogni reticolo è suddiviso in 9 quadrati con lati di 1 mm, composti a loro volta da 16 quadrati di 0.04 mm².

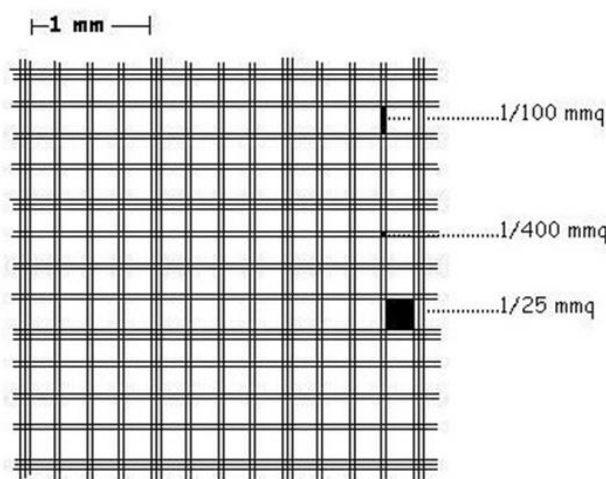


Figura 4.1: Schema illustrante il reticolo della camera di Burkner.

Dopo aver risospeso accuratamente l'aliquota da esaminare, si prelevano 30 µl di cellule ai quali viene aggiunto un pari volume di Trypan Blue, un colorante ad esclusione vitale che penetra nelle cellule morte. Successivamente, mediante l'uso di una micropipetta, viene rilasciata in prossimità del bordo del vetrino coprioggetto una goccia del campione, che diffonde per capillarità all'interno delle due camere. La conta viene effettuata al microscopio ottico conteggiando solamente le cellule che si trovano nei quadrati posti sulle diagonali (48 quadrati totali, 24 per ciascun settore). La quantità di cellule/ml viene calcolata mediante la seguente formula:

$$Cellule/ml = \frac{N}{48} \cdot \left(\frac{1}{4} \cdot 10^6\right) \cdot 2$$

dove:

- **N** è il numero totale di cellule contate
- **48** sono i quadrati che costituiscono le 4 diagonali
- $(\frac{1}{4} \cdot 10^6)$ è il fattore che riporta il volume di ciascun quadrato
- **2** è il fattore di diluizione della sospensione cellulare (sono stati aggiunti 30 µl di Trypan Blue ai 30 µl di sospensione cellulare).

Una volta calcolato il numero di cellule/ml, è possibile procedere con la semina, calcolando quanti ml di sospensione è necessario prelevare dalla fiasca contenente la sospensione cellulare per ottenere una determinata quantità di cellule per pozzetto. Le cellule vengono quindi seminate in 200 µl di terreno completo/pozzetto ed incubate a 37 °C per 24 h prima di procedere con i trattamenti.

4.5 Trattamenti con mTHPC, DTX e loro combinazione in assenza di irradiazione

Prima di procedere al trattamento delle cellule, si procede alla preparazione di stock di mTHPC e DTX. Mentre la polvere di DTX viene facilmente sciolta tramite pesata in DMSO poiché risulta insolubile in acqua, la preparazione della soluzione di mTHPC è più complicata e necessita il controllo dell'effettiva concentrazione del fotosensibilizzante tramite spettrometria.

La polvere di mTHPC viene sciolta nel cosiddetto solvente standard, una soluzione contenente il 20% di etanolo assoluto, il 30% di PEG 400 e il 50% di acqua milliQ (v/v/v). La concentrazione precisa di fotosensibilizzante è determinata in seguito alla registrazione dello spettro di assorbimento della clorina in etanolo assoluto, opportunamente diluita (1:40). La concentrazione viene quindi ricavata sulla base della legge di Lambert-Beer, ricavando il valore di assorbanza della clorina alla lunghezza d'onda di 420 nm direttamente dallo spettro e utilizzando il coefficiente di estinzione molare ($\epsilon = 199700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) dell'mTHPC calcolato in etanolo alla stessa lunghezza d'onda. Prima del trattamento delle cellule, la soluzione di mTHPC opportunamente diluita in terreno completo, viene sterilizzata mediante filtrazione con siringa e filtri da 0.22 µm.

La citotossicità di mTHPC, DTX e loro combinazione è stata misurata in cellule incubate per 24 h con concentrazioni crescenti di farmaci tramite saggio di vitalità cellulare MTS (vedi 4.7). Per ogni concentrazione di farmaco da testare vengono trattati 3 pozzetti di cellule, ciascuno con 150 µl di terreno completo contenenti mTHPC e/o DTX opportunamente diluiti. In ogni esperimento vengono allestiti anche i controlli, ovvero 3 pozzetti di cellule incubati con il solo terreno completo. Il test MTS viene eseguito allo scadere delle 24 h di trattamento (24 h) e dopo ulteriori 24 h nelle quali le cellule vengono mantenute in terreno completo fresco privo degli agenti di trattamento (24 + 24 h). Il trattamento combinato è stato realizzato co-administrando i due farmaci oppure mediante somministrazioni sequenziali in cui mTHPC è stato aggiunto al mezzo di incubazione delle cellule 4 h dopo il DTX.

4.6 PDT in vitro

Per l'esperimento di PDT in vitro le cellule vengono seminate e trattate per 24 h con mTHPC o mTHPC+DTX come descritto nel paragrafo 4.5. Allo scadere delle 24 h di trattamento, viene eliminato il terreno di trattamento da ciascun pozzetto e viene eseguito un lavaggio con 150 µl/pozzetto di PBS contenente Ca^{2+} e Mg^{2+} . Poiché non è possibile irradiare a secco, è necessario aggiungere altri 150 µl/pozzetto di PBS Ca^{2+} e Mg^{2+} . Le cellule sono quindi irradiate per 15 sec con luce rossa (600-800 nm) emessa da una lampada Waldmann PDT 1200, precedentemente tarata ad una fluenza di 14 mW/cm². La dose totale di luce somministrata alle cellule è di 0.24 J/cm². Al termine dell'irradiazione il PBS viene rimosso e le cellule vengono incubate con 150 µl di terreno completo fresco per ulteriori 24 h, trascorse le quali si effettua il saggio MTS.

4.7 Saggio MTS

Il saggio colorimetrico MTS consente di definire la quantità di cellule vive presenti in un campione. L'MTS o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-solfofenil)-2H-tetrazolio, è un sale di tetrazolio che viene internalizzato nelle cellule metabolicamente attive e successivamente ridotto nel composto colorato formazano, solubile nel mezzo di coltura. Le deidrogenasi mitocondriali, attive solo nelle cellule vive, determinano la conversione del NAD⁺ a NADH. Successivamente il NADH trasferisce elettroni al PES (un accoppiante di elettroni), che, a sua volta, reagisce con l'MTS dando origine al formazano, un composto di color porpora che assorbe la luce alla lunghezza d'onda di 492

nm. L'assorbanza misurata tramite spettrofotometro *Multiskan Go* (Thermo Scientific) è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali presenti nel campione analizzato. Per effettuare il test MTS viene per prima cosa rimosso il terreno contenuto nei pozzetti. In seguito, vengono aggiunti 100 µl/pozzetto di terreno DMEM privo di siero ai quali vengono aggiunti 20 µl di soluzione MTS. In ogni piastra vengono allestiti anche tre pozzetti privi di cellule denominati “bianchi”, impiegati per valutare l'assorbanza data dal solo terreno di coltura. Le cellule vengono dunque incubate a 37°C per circa 40 minuti e, successivamente, viene misurato il valore di assorbanza 492 nm. Per il calcolo della vitalità cellulare il valore medio di assorbanza dei bianchi viene sottratto al valore di assorbanza misurato in ciascun pozzetto. La vitalità cellulare nei campioni trattati è espressa come percentuale di assorbanza rispetto al valore medio di assorbanza dei controlli, posto come 100% di vitalità cellulare.

4.8 Analisi statistica

I valori relativi alla vitalità cellulare sono stati analizzati mediante il programma statistico Primer per discipline biomediche (McGraw-Hill), utilizzando il test *t* di Student che consente di confrontare il valore medio di due gruppi indipendenti.

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 Citotossicità docetaxel (DTX), mTHPC e loro combinazione in assenza di luce

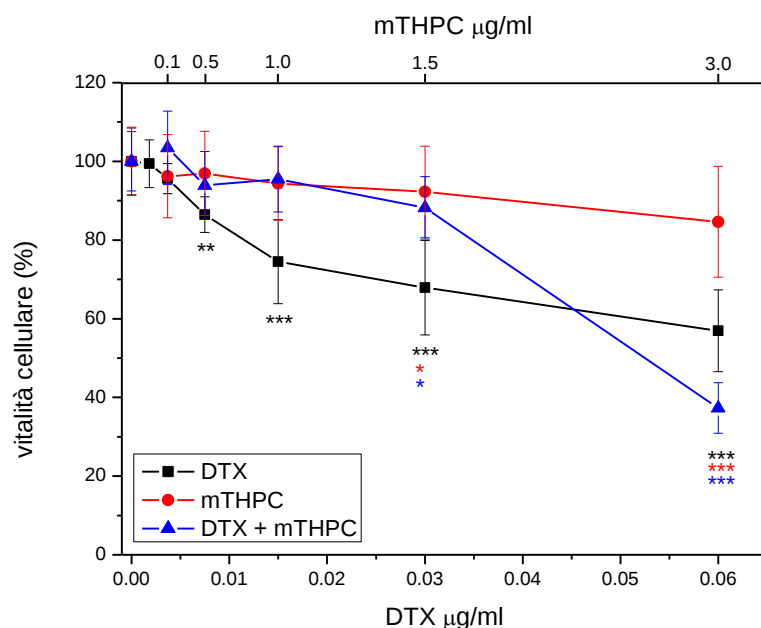


Figura 5.1: Vitalità di cellule HeLa incubate per 24 h a 37 °C con concentrazioni crescenti di DTX, mTHPC e la loro combinazione. I dati rappresentano le medie $\pm$ le deviazioni standard (n almeno pari a 6). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ *t*-test, rispetto alle cellule di controllo.

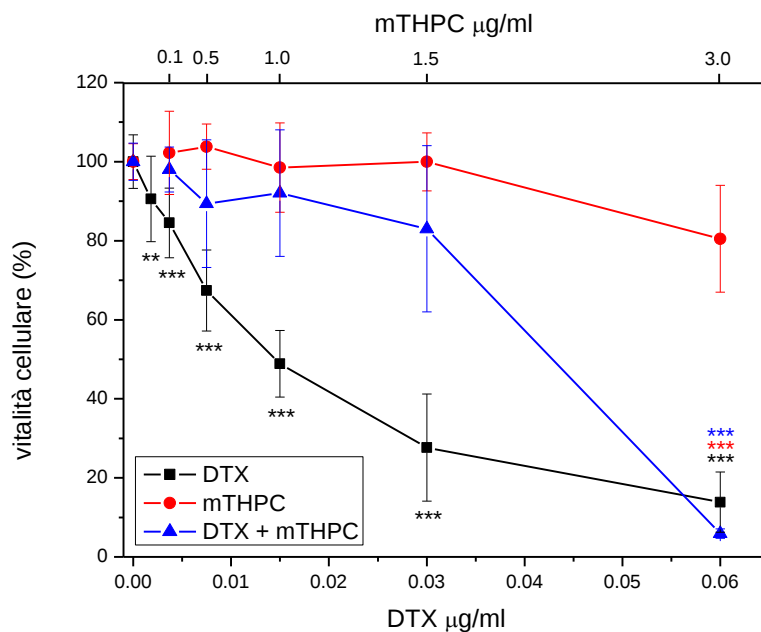


Figura 5.2: Vitalità di cellule HeLa incubate per 24 + 24 h a 37 °C con concentrazioni crescenti di DTX, mTHPC e la loro combinazione. I dati rappresentano le medie $\pm$ le deviazioni standard (n almeno pari a 6). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ *t*-test, rispetto alle cellule di controllo.

Per valutare la citotossicità di mTHPC, DTX e loro combinazione, le cellule sono state incubate con concentrazioni crescenti di farmaci per 24 h, al termine delle quali è stata misurata la vitalità cellulare tramite test MTS. Come si può osservare dal grafico in Figura 5.1, ad un aumento della concentrazione di DTX corrisponde una diminuzione progressiva della vitalità cellulare. Trattandosi di un farmaco altamente citotossico, i risultati ottenuti sono in linea con quanto atteso. Precedenti studi sulla citotossicità del docetaxel realizzati nel laboratorio dove ho condotto il tirocinio hanno evidenziato come anche in cellule della linea MDA-MB-231 di adenocarcinoma mammario si osserva una mortalità concentrazione dipendente in un range di concentrazioni di DTX differente (da 0.01 a 1.0 µg/ml) (Maiolino *et al.*, 2015). Il confronto di questi risultati suggerisce quindi una diversa sensibilità al DTX in cellule tumorali di diverso tipo.

Dall'andamento della curva relativa alla vitalità cellulare in seguito a trattamento con mTHPC si conferma, per le concentrazioni saggiate, una minima tossicità della clorina in assenza di luce. Precedenti studi *in vitro* sulla tossicità al buio dell'mTHPC in cellule HeLa hanno evidenziato un aumento progressivo della mortalità cellulare per concentrazioni superiori a 1.5 µM (Gaio *et al.*, 2016), confermando una vitalità cellulare intorno all'80% alla più alta concentrazione di mTHPC considerata nel mio lavoro di tesi. Studi precedenti effettuati su cellule di carcinoma esofageo KYSE-510 (Compagnin *et al.*, 2009) e su cellule delle linee cellulari A549 e CCD-34Lu, hanno individuato la presenza di tossicità per concentrazioni di mTHPC superiori a 1.75 µM, dimostrando che l'mTHPC può provocare morte cellulare anche in assenza di irradiazione oltre una certa concentrazione soglia che può variare in base alla linea cellulare utilizzata (Compagnin *et al.*, 2011).

Dal grafico in Figura 5.1 è possibile osservare come cellule incubate con DTX + mTHPC somministrati contemporaneamente non evidenzino una mortalità significativa fino alla concentrazione di 0.03 µg/ml DTX. I risultati mostrano che la presenza di mTHPC fino alla concentrazione di 1.5 µg/ml inibisce l'attività citotossica del DTX. Si potrebbe quindi ipotizzare una interazione negativa dei due farmaci che sembra essere concentrazione dipendente poiché alla concentrazione maggiore di DTX utilizzata l'effetto inibitorio di mTHPC non è rilevato.

La citotossicità di DTX, mTHPC e la loro combinazione è stata valutata anche 24 ore dopo il termine dell'incubazione (24 + 24 h). L'analisi dei risultati ottenuti (vedi Figura 5.2) conferma una bassa tossicità dell'mTHPC anche dopo 24 h dalla rimozione del PS dal mezzo di coltura, mentre si osserva un incremento della mortalità cellulare con il chemioterapico (DTX) che risulta essere aumentata rispetto a quella misurata a 24 h (Figura 5.1). Anche in questo caso, il trattamento combinato di DTX + mTHPC co-amministrati

provoca una mortalità cellulare nettamente inferiore rispetto a quella rilevata con solo DTX almeno per concentrazioni di DTX inferiori a 0.03 µg/ml.

5.2 Citotossicità di mTHPC e mTHPC + DTX in presenza di luce

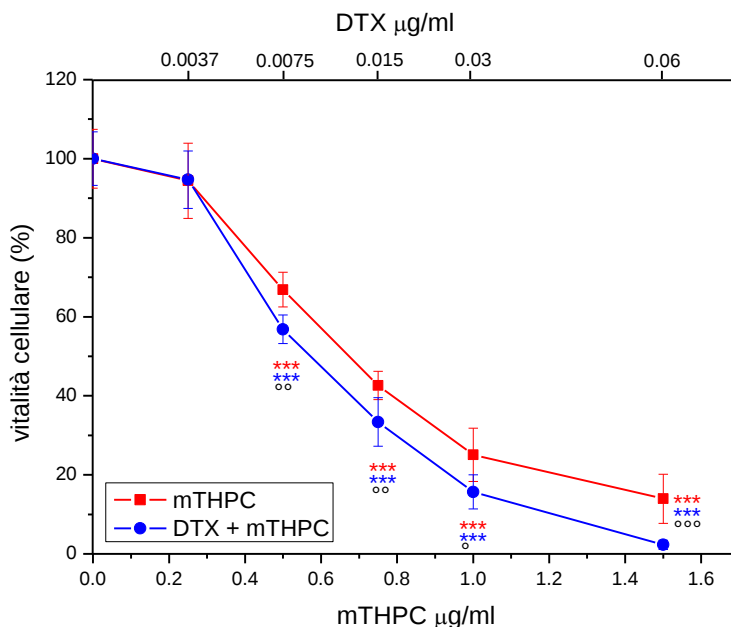


Figura 5.3: Vitalità di cellule HeLa incubate per 24 h a 37 °C con concentrazioni crescenti di mTHPC e mTHPC + DTX e successivamente irradiate con 0.24 J/cm² di luce rossa. Il test MTS è stato effettuato 24 h dopo l'irradiazione. I dati rappresentano le medie ± le deviazioni standard (n almeno pari a 6). *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001 t-test, rispetto alle cellule di controllo. °: p < 0.05, °°: p < 0.01, °°°: p < 0.001 t-test, tra mTHPC e mTHPC + DTX.

Per valutare la fototossicità dell'mTHPC e dell'mTHPC co-administrata con DTX, le cellule sono state incubate con concentrazioni crescenti di farmaci e successivamente irradiate con 24 J/cm² di luce rossa. La vitalità cellulare è stata quindi misurata mediante test MTS dopo 24 h dall'irradiazione. Dal grafico in Figura 5.3 si può notare come ad un aumento della concentrazione di mTHPC corrisponda una diminuzione graduale della vitalità cellulare. Confrontando gli andamenti delle due curve è possibile concludere che non vi sia una considerevole differenza tra la tossicità associata al solo mTHPC e quella derivante dalla combinazione di mTHPC + DTX. Dai risultati ottenuti risulta dunque evidente che la combinazione dei due farmaci non sembra portare ad un incremento sostanziale dell'effetto terapeutico generale.

5.3 Citotossicità di DTX + mTHPC somministrati in sequenza in assenza di luce

Per poter spiegare l'inattesa diminuzione di mortalità di cellule HeLa incubate con DTX + mTHPC rispetto a quelle incubate con solo DTX (vedi Figure 5.1 e 5.2), sono stati condotti ulteriori esperimenti volti a verificare se l'azione del DTX venga inibita in presenza di mTHPC ed in particolare si è voluto verificare se l'inibizione dipenda dal rapporto di concentrazione tra chemioterapico e fotosensibilizzante. Dai grafici di Figura 5.1 e di Figura 5.2, si nota che alla concentrazione di 0.03 µg/ml di DTX, la differenza tra l'effetto citotossico del chemioterapico in presenza e in assenza di mTHPC è particolarmente accentuata. Le cellule sono state dunque incubate con 0.03 µg/ml di DTX e concentrazioni di mTHPC comprese tra 1.0 e 0.01 µg/ml, per verificare se al diminuire della concentrazione del PS si riduca gradualmente l'effetto inibitorio sulla tossicità del DTX. Somministrando contemporaneamente i farmaci alle suddette concentrazioni, la mortalità cellulare non risulta tuttavia aumentare anche in presenza di concentrazioni minime di mTHPC ed è sempre inferiore alla mortalità misurata con solo DTX alla concentrazione di 0.03 µg/ml (vedi Figura 5.1). Sono stati dunque effettuati ulteriori esperimenti somministrando in sequenza i due farmaci. Alle cellule è stata somministrata sempre la stessa concentrazione di 0.03 µg/ml di DTX ma l'mTHPC, sempre in concentrazioni decrescenti, è stata somministrata a 4 h di distanza. Dai grafici in Figura 5.3 e in Figura 5.4 risulta chiaro che l'effetto citotossico del DTX è pari a quello osservato in assenza di mTHPC per la concentrazione di 0.03 µg/ml. In conclusione è possibile considerare l'ipotesi di un'interazione negativa tra chemioterapico e PS in seguito a co-somministrazione, anche se gli esperimenti effettuati non sono sufficienti a chiarire le dinamiche di tale interazione.

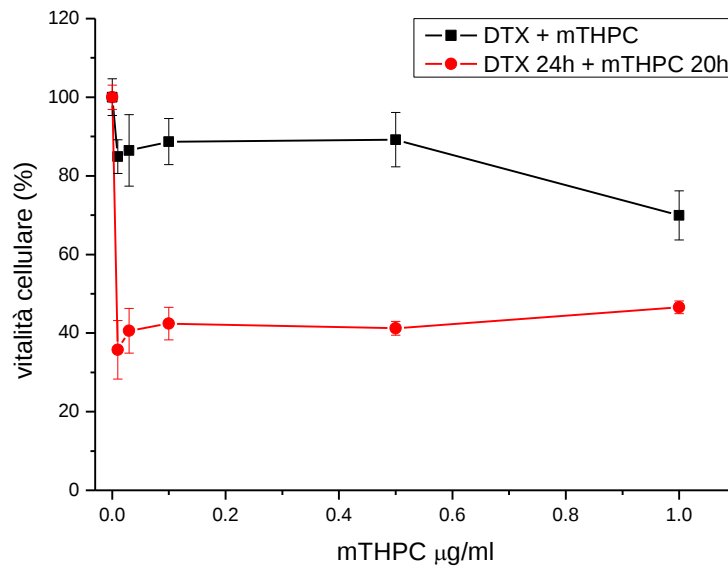


Figura 5.3: Vitalità di cellule HeLa incubate per 24 h a 37 °C con concentrazioni crescenti di mTHPC + 0.03 µg/ml DTX somministrati contemporaneamente e con somministrazioni sequenziali, in cui mTHPC viene aggiunto 4 h dopo il DTX. I dati rappresentano le medie $\pm$ le deviazioni standard (n almeno pari a 6).

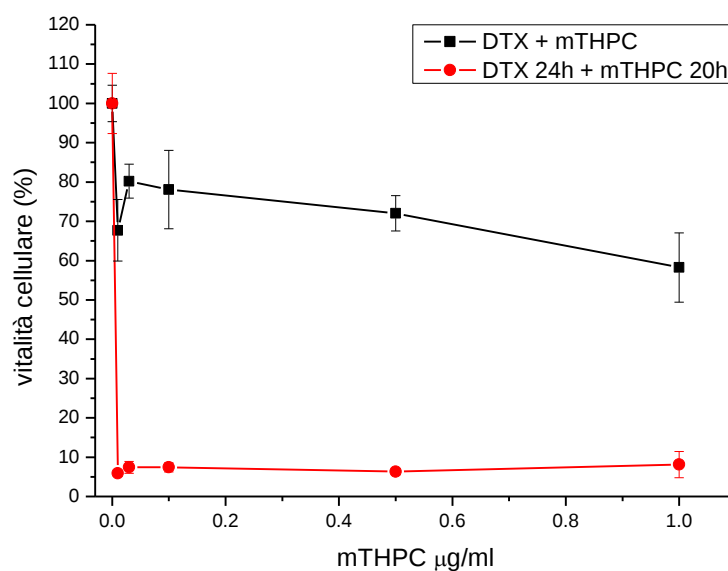


Figura 5.3: Vitalità di cellule HeLa incubate per 24 + 24 h a 37 °C con concentrazioni crescenti di mTHPC + 0.03 µg/ml DTX somministrati contemporaneamente e con somministrazioni sequenziali, in cui mTHPC viene aggiunto 4 h dopo il DTX. I dati rappresentano le medie $\pm$ le deviazioni standard (n almeno pari a 6).

6. CONCLUSIONI

Con questo lavoro si è voluto verificare se l'utilizzo combinato di un chemioterapico, il docetaxel (DTX), e della PDT con il fotosensibilizzante meta-tetra(idrossifenil)clorina (mTHPC), nel trattamento di cellule tumorali HeLa, comporti un aumento dell'effetto terapeutico generalmente osservato in seguito alle rispettive monoterapie. Dall'analisi dei risultati ottenuti è emerso, tuttavia, che la somministrazione contemporanea dei due farmaci non sembra determinare un aumento considerevole della mortalità cellulare anche se significativo in base all'analisi statistica. La somministrazione contemporanea del fotosensibilizzante, infatti, anche in assenza di luce, provoca un'inibizione dell'attività del chemioterapico, quando questo è presente in concentrazioni inferiori a 0.03 µg/ml. In seguito ad ulteriori esperimenti è stato dimostrato, tuttavia, che la somministrazione dell'mTHPC a 4 ore di distanza dal DTX non provoca inibizione dell'effetto citotossico del chemioterapico e la mortalità cellulare torna simile a quella osservata in assenza di fotosensibilizzante. I risultati ottenuti con gli ultimi esperimenti tendono a confermare l'ipotesi di un'interazione negativa tra i due farmaci somministrati contemporaneamente anche se risultano necessari ulteriori studi per giustificare le ragioni di tale inibizione. Pertanto, la combinazione di chemioterapia con DTX e terapia fotodinamica con mTHPC, potrebbe portare a vantaggi terapeutici solo in seguito ad accurata valutazione delle tempistiche di somministrazione dei rispettivi farmaci.

BIBLIOGRAFIA

- Agostinis P., Berg K., Cengel K.A. *et al.* (2011) "Photodynamic therapy of cancer: an update" *CA Cancer Journal for Clinicians* **61**, 250-281.
- Allison R.R., Sibata C.H. (2010) "Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review" *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **7**, 61-65.
- Allison R.R. (2014) "Photodynamic therapy: oncologic horizons" *Future Oncology* **10**, 123-142.
- Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. (2004) "Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization" *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **1**, 279-293.
- Colin M., Guenard D., Gueritte-Voegelein F. *et al.* (1989) "Process for the preparation of taxol and 10-deacetyltaxol" *Rhone-Poulenc Sante, US Patent* 4857653.
- Compagnin C., Baù L., Mognato M. *et al.* (2009) "The cellular uptake of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin entrapped in organically modified silica nanoparticles is mediated by serum proteins" *Nanotechnology* **20**, 345101.
- Compagnin C., Moret F., Celotti L. *et al.* (2011) "Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-loaded liposomes sterically stabilised with poly(ethylene glycol) of different length and density: characterisation, *in vitro* cellular uptake and phototoxicity" *Photochemical and Photobiological Sciences* **10**, 1751-1759.
- Corrie P.G. (2008) "Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects" *Medicine* **36**, 24-28.
- Cortes J.E., Pazdur R. (1995) "Docetaxel" *Journal of Clinical Oncology* **13**, 2643-2655.
- Cramers P., Ruevekamp M., Oppelaar H. *et al.* (2003) "Foscan uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy" *British Journal of Cancer* **88**, 283-290.
- Dolmans D.E., Fukumura D., Jain R.K. (2003) "Photodynamic therapy for cancer" *Nature Reviews Cancer* **3**, 380-387.
- Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W. *et al.* (1998) "Photodynamic therapy" *Journal of the National Cancer Institute* **90**, 889-905.
- Dustin P. (1980) "Microtubules" *Scientific American* **243**, 66-76.

- Gaio E., Scheglmann D., Reddi E. *et al.* (2016) "Uptake and photo-toxicity of Foscan®, Foslip® and Fospeg® in multicellular tumor spheroids" *Journal of Photochemistry and Photobiology B* **161**, 244-252.
- Gueritte-Voegelein F., Guenard D., Lavelle F. *et al.* (1991) "Relationships between the structure of taxol analogues and their antimitotic activity" *Journal of Medicinal Chemistry* **34**, 992-998.
- Ho M.Y., Mackey J.R. (2014) "Presentation and management of docetaxel-related adverse effects in patients with breast cancer" *Cancer Management and Research* **6**, 253-259.
- Hong M.J., Cheon Y.K., Lee E.J. *et al.* (2014) "Long-term outcome of photodynamic therapy with systemic chemotherapy compared to photodynamic therapy alone in patients with advanced hilar cholangiocarcinoma" *Gut Liver* **8**, 318-323.
- Jin M.L., Yang B.Q., Zhang W. *et al.* (1992) "Combined treatment with photodynamic therapy and chemotherapy for advanced cardiac cancers" *Journal of Photochemistry and Photobiology B* **12**, 101-106.
- Korbelik M. (2009) "Induction of tumor immunity by photodynamic therapy" *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery* **14**, 329-334.
- Krammer B. (2001) "Vascular effects of photodynamic therapy" *Anticancer Research* **21**, 4271-4277.
- Li L., Xie J., Zhang X. *et al.* (2010) "Retrospective study of photodynamic therapy vs photodynamic therapy combined with chemotherapy and chemotherapy alone on advanced esophageal cancer" *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **7**, 139-143.
- Luo D., Carter K.A., Miranda D. *et al.* (2017) "Chemophototherapy: an emerging treatment option for solid tumors" *Advanced Science* **4**, 1600106.
- Maiolino S., Moret F., Conte C. *et al.* (2015) "Hyaluronan-decorated polymer nanoparticles targeting the CD44 receptor for the combined photo/chemo-therapy of cancer" *Nanoscale* **7**, 5643-5653.
- Master A., Livingston M., Sen Gupta A. (2013) "Photodynamic nanomedicine in the treatment of solid tumors: perspectives and challenges" *Journal of Controlled Release* **168**, 88-102.
- Oniszczuk A., Wojtunik-Kulesza K.A., Oniszczuk T. *et al.* (2016) "The potential of photodynamic therapy (PDT)-Experimental investigations and clinical use" *Biomedicine & Pharmacotherapy* **83**, 912-929.
- Park D.H., Lee S.S., Park S.E. *et al.* (2014) "Randomised phase II trial of photodynamic therapy plus oral fluoropyrimidine, S-1, versus photodynamic

therapy alone for unresectable hilar cholangiocarcinoma” *European Journal of Cancer* **50**, 1259-1268.

- Petri A., Yova D., Alexandratou E. *et al.* (2012) “Comparative characterization of the cellular uptake and photodynamic efficiency of Foscan® and Fospeg in a human prostate cancer cell line” *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **9**, 344-354.
- Postiglione I., Chiaviello A., Palumbo G. (2011) “Enhancing photodynamic therapy efficacy by combination therapy: dated, current and oncoming strategies” *Cancers* **3**, 2597-2629.
- Ringel I., Horwitz S.B. (1991) “Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol” *Journal of the National Cancer Institute* **83**, 288-291.
- Rosa L.P., da Silva F.C. (2005) “Antimicrobial photodynamic therapy: a new therapeutic option to combat infections” *Journal of Medical Microbiology and Diagnosis* **3**, 158.
- Senge M.O. (2011) “mTHPC-A drug on its way from second to third generation photosensitizer?” *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **9**, 170-179.
- Sharman W.M., Allen C.M., van Lier J.E. (1999) “Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications” *Drug Discovery Today* **4**, 507-517.
- Sibata C.H., Colussi V.C., Oleinick N.L. *et al.* (2001) “Photodynamic therapy in oncology” *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **2**, 917-927.
- Triesscheijn M., Ruevekamp M., Aalders M. *et al.* (2005) “Outcome of mTHPC mediated photodynamic therapy is primarily determined by the vascular response” *Photochemistry and Photobiology* **81**, 1161-1167.
- Wani M.C., Taylor H.L., Wall M.E. *et al.* (1971) “Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*” *Journal of the American Chemical Society* **93**, 2325-2327.