
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

LUIGI MUSAJO, GIOVANNI RODIGHIERO

Sul meccanismo d'azione delle furocumarine fotosensibilizzatrici

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 38 (1965), n.5, p. 591–599.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_38_5_591_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

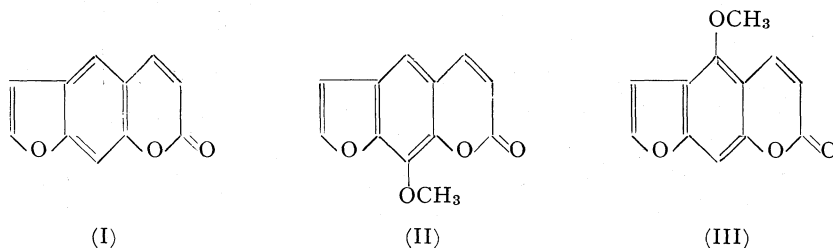
<http://www.bdim.eu/>

Chimica Farmaceutica. — *Sul meccanismo d'azione delle furocumarine fotosensibilizzatrici* (*). Nota di LUIGI MUSAJO e GIOVANNI RODIGHIERO, presentata (**) dal Corrisp. L. MUSAJO.

Da molti anni le furocumarine sono oggetto di studio in questo Istituto per le proprietà fotosensibilizzatrici che alcune di esse posseggono [1-6].

Infatti, come è noto, quando vengono applicate sulla cute dell'uomo o della cavia, per successiva esposizione alla luce del sole od ultravioletta, danno origine, dopo alcune ore di latenza, ad un eritema, talvolta accompagnato da bolle, che lascia il posto dopo alcuni giorni ad una pigmentazione scura. Le radiazioni più efficaci nel provocare questo effetto sono risultate quelle con $\lambda = 3.655 \text{ \AA}$ [7].

Le nostre prime ricerche in questo campo hanno chiarito i rapporti tra costituzione delle furocumarine e loro attività fotosensibilizzatrice, che risulta legata a strutture molto specifiche. Fra le sostanze naturali più attive di questo gruppo ricordiamo la furocumarina non sostituita, o psoralene (I), ed i suoi monometossiderivati, xantotossina (II) e bergaptene (III).



Anche alcuni metilderivati del psoralene possiedono una fortissima attività. Questi risultati sono stati in seguito confermati da analoghe ricerche di Autori americani [8, 9, 10].

Oscuro invece è rimasto per molto tempo il meccanismo di azione di queste sostanze, nonostante le ricerche nostre e quelle del gruppo americano [11, 12, 13].

Un primo passo importante in questo campo è stato compiuto quando, in seguito ad un ampio confronto, sulla base di alcuni tests, con altre note sostanze fotodinamiche (ematoporfirina, bleu di metilene, coloranti fluoresceinici, ipericina, ecc.) abbiamo potuto stabilire che le furocumarine mancano completamente di quelle proprietà fotoossidanti, mediante le quali viene interpretato il meccanismo d'azione dei predetti composti [14-18]. È così risultato che

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Chimica Farmaceutica dell'Università di Padova - Centro Nazionale di Chimica del Farmaco e dei Prodotti biologicamente attivi del C.N.R., Sezione di Padova.

(**) Nella seduta dell'8 maggio 1965.

esse costituiscono un gruppo di sostanze fotosensibilizzatrici, con proprietà particolari e con un loro proprio meccanismo d'azione.

Il passo successivo è stato la ricerca della possibilità di una fotoreazione tra le furocumarine fotosensibilizzatrici e substrati biologicamente importanti.

Risultati, in un primo tempo molto suggestivi, sono stati ottenuti dallo studio delle fotoreazioni tra furocumarine e flavin-mono-nucleotide (FMN) [6, 19–22]: infatti è risultato che solo le furocumarine attive sulla cute formano composti nuovi in seguito ad irradiazione a $3,655 \text{ \AA}$ in presenza di FMN, mentre le sostanze inattive sulla cute non fotoreagiscono. Inoltre alcuni di questi nuovi prodotti formati, che contengono una parte flavinica combinata ad una parte cumarinica, e che abbiamo chiamato flavin-foto-composti, hanno dimostrato di essere privi delle proprietà coenzimatiche proprie dell'FMN [23]. Si poteva quindi pensare ad una inattivazione biologica di questo ultimo come conseguenza dell'irradiazione della cute in presenza di furocumarine. Ma vari altri risultati di ordine sperimentale ci hanno indotto a pensare che queste fotoreazioni con l'FMN non fossero la causa prima dell'effetto fotosensibilizzante delle furocumarine sulla cute.

Interazione delle furocumarine con gli acidi nucleici.

Già in passato noi avevamo condotto delle ricerche sulla possibilità di una interazione tra furocumarine ed acido desossiribonucleico (DNA) mettendo in evidenza, per mezzo della dialisi ad equilibrio, la capacità delle furocumarine di « legarsi » al DNA [27]. Però, dopo irradiazione u.v. delle soluzioni acquose di DNA contenenti furocumarine, non era stato possibile ottenere sicure indicazioni di una avvenuta fotoreazione né in base a misure di viscosità o di potere rotatorio, né dall'esame degli spettri ultravioletti.

In questi ultimi tempi questa possibilità è stata nuovamente indicata da alcuni risultati emersi nel corso di esperienze biologiche, come la formazione di cellule giganti, osservata da Colombo [24] studiando, in collaborazione col nostro gruppo di ricerca, gli effetti dell'irradiazione u.v. ($3,655 \text{ \AA}$), in presenza di psoralene, di cellule animali coltivate *in vitro*. Contemporaneamente negli U.S.A., anche Mathews [25], avendo ottenuto lo sviluppo di ceppi mutati in una cultura di *Sarcina lutea* in seguito all'irradiazione u.v. ($3,655 \text{ \AA}$) in presenza di xantotossina, ha prospettato la possibilità di un danno al DNA.

L'ipotesi è stata subito dopo avvalorata da alcune esperienze eseguite su virus [26]: in seguito ad irradiazione u.v. ($3,655 \text{ \AA}$) in presenza di psoralene, tre virus a DNA sono stati completamente inattivati, mentre su altri tre virus ad acido ribonucleico (RNA) gli effetti sono stati molto meno evidenti.

Volendo quindi riesaminare la questione, in primo luogo abbiamo approfondito ed ampliato i primitivi dati sul « legame » delle furocumarine al DNA, applicando il procedimento usato da Boyland e Green [28] e da Liquori e coll. [29] per studiare l'interazione degli idrocarburi aromatici policiclici col DNA, determinando cioè la solubilizzazione di queste sostanze nelle soluzioni acquose di DNA e, per confronto, anche in quelle di RNA. I risultati otte-

nuti, in accordo con quelli da noi raccolti precedentemente, hanno indicato una netta capacità delle furocumarine di legarsi al DNA, mentre all'RNA tale legame si compie in misura molto più ridotta [26].

Questo fatto però, che avviene al di fuori di ogni irradiazione, non appare essere in diretta relazione con le proprietà fotosensibilizzatrici delle furocumarine; infatti il « legame » (indubbiamente debole) viene contratto dalle sostanze di questo gruppo sia attive che inattive sulla cute.

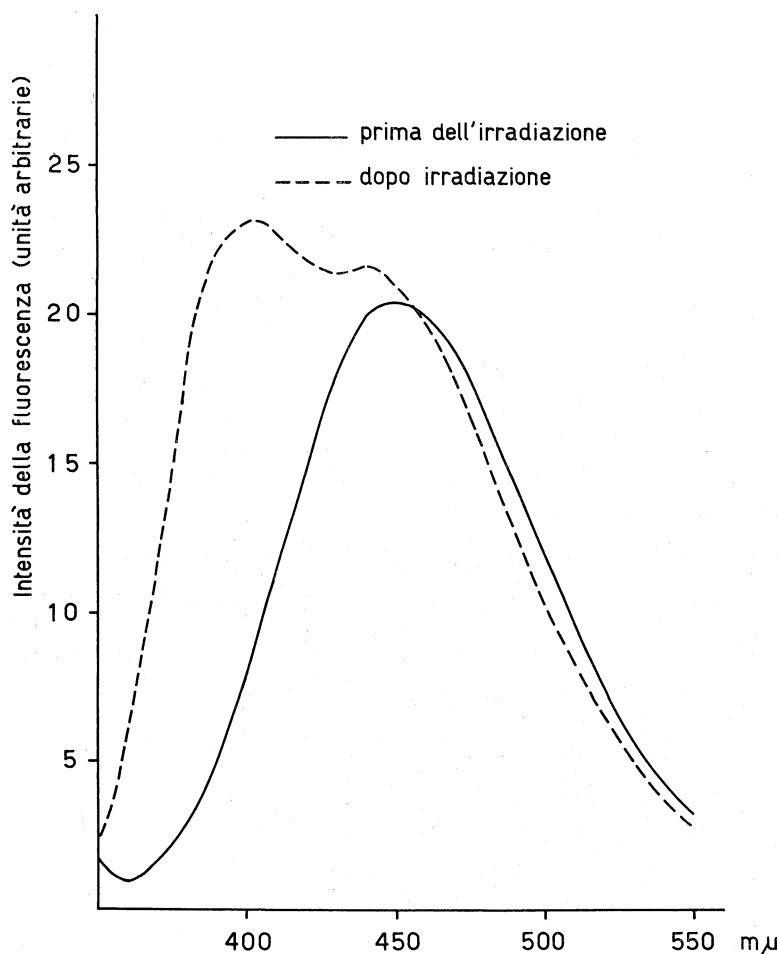


Fig. 1. — Spettri di fluorescenza (prima e dopo irradiazione) di una soluzione acquosa 0,2% di DNA contenente 16 $\mu\text{g/ml}$ di psoralene.

Irradiazione: 90' a 3.655 Å (lampada Philips HPW 125 alla distanza di 25 cm). λ eccitante: 330 mμ.

Fotoreazione delle furocumarine fotosensibilizzatrici con DNA.

Una prima sicura indicazione di una avvenuta fotoreazione, dopo irradiazione a 3.655 Å delle soluzioni contenenti le furocumarine « legate » al DNA, è stata ottenuta dall'esame degli spettri di fluorescenza delle stesse solu-

zioni: in presenza di furocumarine attive si è notato un evidente spostamento del massimo di fluorescenza verso minori lunghezze d'onda, mentre nelle soluzioni contenenti DNA e furocumarine inattive non si notava alcuna modificazione. Riportiamo come esempio nella figura 1 gli spettri di fluorescenza di una soluzione acquosa di DNA contenente psoralene prima e dopo irradiazione: si nota uno spostamento del massimo da 450 a 400 m μ [30].

Modificazioni analoghe a quelle ottenute con DNA sono state anche notate negli spettri di fluorescenza di soluzioni di basi, nucleosidi e nucleotidi pirimidinici, contenenti furocumarine attive, irradiate a 3.655 Å (vedi come esempio Tabella I, in cui sono riportati i dati relativi al psoralene).

TABELLA I.

Spostamenti (m μ) delle λ max di fluorescenza di soluzioni acquose di basi, nucleosidi e nucleotidi (0,1 %) addizionati di psoralene (16 μ g/ml) ed irradiati (90 minuti) a 3.655 Å.

BASI (*)		NUCLEOSIDI		NUCLEOTIDI	
Timina	— 50	Timidina	— 50	Ac. timidilico	— 50
Citosina	— 50	Citidina	— 50	Ac. citidilico	— 50
		Desossicitidina	— 50	Ac. desossicitidilico	— 50
Uracile	— 50	Uridina	— 50	Ac. uridilico	— 50
Adenina	0	Adenosina	0	Ac. adenilico	0
		Desossiadenosina	0	Ac. desossiadenilico	0
Guanina	0	Guanosina	0	Ac. guanilico	0
		Desossiguanosina	0	Ac. desossiguanilico	0

(*) Le soluzioni delle basi pirimidiniche, cioè timina, citosina e uracile, addizionate di psoralene, mostrano variazioni negli spettri di fluorescenza solo se vengono irradiate allo stato ghiacciato. I corrispondenti nucleosidi e nucleotidi invece fotoreagiscono anche in soluzione non congelata.

Gli altri composti indicati nella tabella non fotoreagiscono in nessun caso.

In questi casi la formazione di nuovi composti ha potuto essere confermata con la cromatografia su carta. Difatti dopo irradiazione nei cromatogrammi apparivano evidenti nuove macchie fluorescenti in luce u.v., che non erano presenti nei cromatogrammi delle sostanze irradiate singolarmente (vedi nella Tabella II i dati relativi sempre al psoralene). È attualmente in corso l'isolamento di questi nuovi fotocomposti e l'identificazione della loro costituzione.

Le basi puriniche invece ed i loro corrispondenti nucleosidi e nucleotidi non hanno mai mostrato indizi di fotoreazione.

TABELLA II.

R_F dei nuovi composti che si formano nelle fotoreazioni tra psoralene e basi, nucleosidi e nucleotidi pirimidinici.

(Condizioni sperimentali uguali a quelle indicate nella Tabella I).

Derivati pirimidinici	R _F delle macchie (fluorescenza violetta)	
	Alcool butilico-acido acetico-acqua 4 : 1 : 5	Acqua
Basi (*) : timina	0,72	0,62
uracile	0,63	0,59
citosina	0,50	0,51
Nucleosidi : timidina	0,64	0,68
uridina	0,43	0,63
citidina	0,32	0,66
desossicitidina	0,52	0,65
Nucleotidi : ac. timidilico	0,33	0,82
ac. uridilico	0,26	0,75
ac. citidilico	0,19	0,72

(*) Le basi danno queste nuove macchie cromatografiche solo se le soluzioni vengono irradiate allo stato ghiacciato. Un analogo comportamento presentano anche nei riguardi della dimerizzazione, quando vengano irradiate a $2.537 \text{ \AA}$ [32].

Studio della fotoreazione con l'uso di bergaptene marcato.

Lo studio della fotoreazione tra furocumarine fotosensibilizzatrici e DNA è stato approfondito [31] con l'uso di una di queste furocumarine marcata e cioè il bergaptene - $O^{14}CH_3$ (formula III), appositamente preparato per metilazione del bergaptolo, o 5-idrossi-psoralene, con $I^{14}CH_3$.

La fotoreazione tra questa sostanza ed il DNA è stata seguita sia mediante misure di radioattività che di fluorescenza, facendo uso di quattro campioni di DNA di diversa provenienza e preparati con metodi diversi

Soluzioni acquose di DNA 0,1 % contenenti 20 $\mu\text{g/ml}$ di bergaptene marcato venivano irradiate a $3.655 \text{ \AA}$ (0,98 mW/cm²). Dopo aggiunta di cloruro sodico fino a concentrazione 1 M, il DNA veniva precipitato con 2 volumi di

alcool etilico, centrifugato, lavato con alcool di 70° e ridisciolto in un volume di acqua uguale a quello iniziale. Le soluzioni ottenute servivano per la determinazione della radioattività (contatore a scintillazione per scintillatori liquidi Selo) e della fluorescenza (spettrofotofluorimetro Aminco-Bowman).

Nelle prime quattro ore di irradiazione, in tutti i quattro campioni esaminati, si è avuto un graduale aumento sia della radioattività che della fluorescenza del DNA precipitato e ridisciolto. Senza irradiazione invece il DNA non presentava né radioattività né fluorescenza. Nella fig. 2 sono riportate

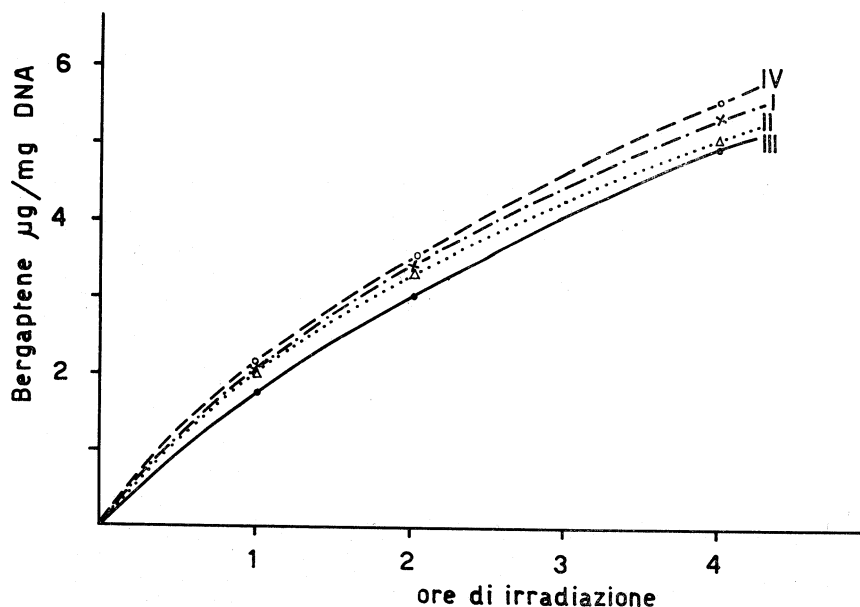


Fig. 2. - Fotoreazioni tra bergaptene —O¹⁴CH₃ e DNA.

Soluzioni acquose di DNA 0,1 % contenenti 20 µg/ml di bergaptene marcato, irradiate a 3.655 Å (0,98 mW/cm²). Le quantità di bergaptene sono quelle che dopo irradiazione risultano combinate ad 1 mg di DNA e sono state calcolate in base alla misura della radioattività dei campioni di DNA, precipitati e ridisciolti.

I) DNA da timo di vitello, estratto con soluzione M di cloruro sodico e deproteinizzato con soluzione satura di cloruro sodico [34].

II) DNA da timo di vitello, estratto con l'uso di laurilsolfato sodico [35].

III) DNA da timo di vitello, altamente polimerizzato (Mann Research Laboratories, New York).

IV) DNA da sperma di salmone, altamente polimerizzato (Mann Research Laboratories, New York).

le quantità di bergaptene (dedotte dalle misure di radioattività) che risultano combinate al DNA in funzione del tempo di irradiazione.

Con tempi di irradiazione molto lunghi la fotoreazione appare complessa (mentre la radioattività assunta dal DNA aumenta continuamente, la fluorescenza aumenta fino ad un massimo e poi decresce) intervenendo con ogni probabilità una decomposizione della primitiva combinazione formatasi.

Risulta chiaro da ciò che quando si irradia una soluzione di DNA contenente bergaptene avviene una fotoreazione (anche se con resa quantica bassa: $5,2 \cdot 10^{-3}$), che porta ad una vera e propria combinazione della furocumarina con la macromolecola.

Quali siano i nucleotidi interessati in questa fotoreazione, per ora non è possibile dire con assoluta certezza; però, poiché abbiamo chiarito che le furocumarine fotoreagiscono solo con i derivati pirimidinici e non con quelli purinici, si può dedurre che anche nel DNA siano i nucleotidi pirimidinici ad essere interessati nella fotoreazione.

Dai risultati delle esperienze su indicate risulta che, nelle concentrazioni da noi sperimentate, il rapporto fra molecole di bergaptene combinate al DNA e nucleotidi presenti nello stesso DNA, dopo 2 ore di irradiazione è 1 : 154.

Comportamento delle furocumarine con RNA.

Accanto a queste ricerche con il DNA, abbiamo condotto analoghe esperienze anche con l'RNA, estratto dal lievito [33].

L'RNA che, come è stato detto, ha una capacità di « legare » le furocumarine molto inferiore a quella del DNA, appare anche fotoreagire molto meno

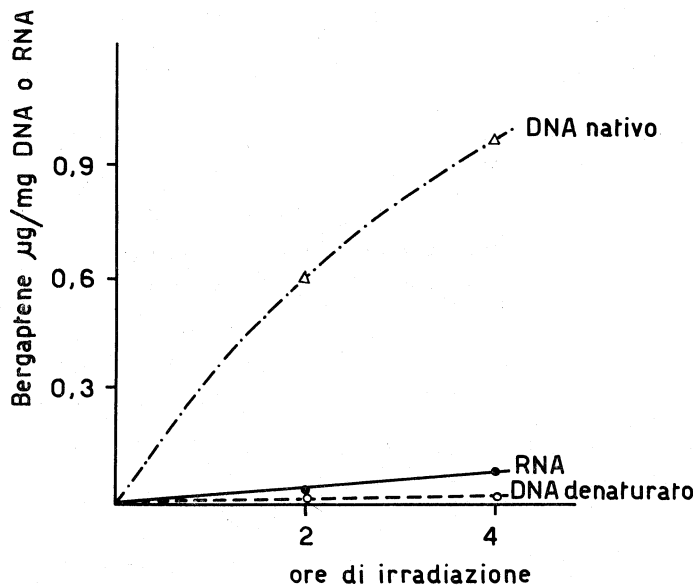


Fig. 3. - Fotoreazioni tra bergaptene $\text{—O}^{14}\text{CH}_3$ e DNA (nativo o denaturato) od RNA.

Soluzioni acquose 0,1 % di DNA da timo di vitello (II; vedi fig. 2) o di RNA dal lievito, contenenti 5 µg/ml di bergaptene $\text{—O}^{14}\text{CH}_3$ irradiate a $3.655 \text{ \AA}$ ($0,98 \text{ mW/cm}^2$). La denaturazione del DNA è stata compiuta mediante riscaldamento della soluzione acquosa a 98° per 60'.

facilmente. Infatti, dopo irradiazione (sempre a $3.655 \text{ \AA}$) di soluzioni acquose di RNA e furocumarine, sono state notate lievi modificazioni negli spettri di fluorescenza solo con qualche metilderivato del psoralene (4' metil-psoralene, 5', 4, 8-trimetil-psoralene); con lo stesso psoralene, la xantotossina, il bergaptene e tutte le altre furocumarine saggiate, attive o inattive sulla cute, non si è potuto cogliere alcuna modificazione,

Esperienze con bergaptene — O^{14}CH_3 , condotte come è stato indicato per il DNA, hanno confermato questa scarsissima capacità di fotoreagire dell'RNA (vedi fig. 3).

La capacità delle furocumarine di fotoreagire col DNA, sembra essere legata alla particolare struttura di quest'ultimo; infatti abbiamo constatato che anche il DNA, che allo stato nativo si comporta come più sopra descritto, quando venga denaturato mediante riscaldamento della sua soluzione acquosa a 98° per $60'$, perde quasi completamente la capacità di solubilizzare le furocumarine ed anche di fotoreagire per irradiazione a $3.655 \text{ \AA}$ (vedi fig. 3).

Noi pensiamo che questa fotoreazione tra furocumarine fotosensibilizzatrici e DNA debba essere considerata la causa degli effetti prodotti dalle furocumarine stesse in seguito ad irradiazione a $3.655 \text{ \AA}$, sui virus [26], sui microorganismi [25] e sulle cellule animali coltivate *in vitro* [24], e possa essere anche alla base degli effetti che esse producono nelle stesse condizioni sulla cute.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] L. MUSAJO, G. RODIGHIERO e G. CAPORALE, « La Chimica e l'Industria », 35, 13 (1953); « Bull. Soc. Chim. Biol. », 36, 1213 (1954).
- [2] L. MUSAJO, « Il Farmaco, Ed. Sci. », 10, 539 (1955).
- [3] G. RODIGHIERO e G. CAPORALE, « Il Farmaco, Ed. Sci. », 10, 760 (1955).
- [4] L. MUSAJO, G. RODIGHIERO, G. CAPORALE e C. ANTONELLO, « Il Farmaco, Ed. Sci. », 13, 355 (1958).
- [5] L. MUSAJO e G. RODIGHIERO, « Experientia », 18, 153 (1962).
- [6] L. MUSAJO, « Pure and Applied Chemistry », 6, 369 (1963).
- [7] H. W. BUCK, I. A. MAGNUS e A. D. PORTER, « Brit. J. Dermatol. », 72, 249 (1960).
- [8] M. A. PATHAK e T. B. FITZPATRICK, « J. Investig. Dermatol. », 32, 255, 509 (1959).
- [9] M. A. PATHAK, J. H. FELMAN e K. D. KAUFMAN, « J. Investig. Dermatol. », 35, 165 (1960).
- [10] Vedi Symposium *Psoralens and Radiant Energy*, Kalamazoo (Michigan, U.S.A., 1958); « J. Investig. Dermatol. », 32, 132 (1959).
- [11] M. A. PATHAK e J. H. FELLMAN, « Nature », 185, 382 (1960).
- [12] M. A. PATHAK e J. H. FELLMAN, *Proceedings of the III International Congress of Photobiology, Copenhagen*, p. 552 (1960).
- [13] M. A. PATHAK, B. ALLEN, D. J. E. INGRAM e J. H. FELLMAN, « Biochim. et Biophys. Acta », 54, 506 (1961).
- [14] L. MUSAJO, G. RODIGHIERO e L. SANTAMARIA, « Atti Soc. Ital. Patol. », 5, 1 (1957).
- [15] G. RODIGHIERO e C. BERGAMASCO, « Il Farmaco, Ed. Sci. », 13, 368 (1958).
- [16] G. RODIGHIERO e G. CAPORALE, « Il Farmaco, Ed. Sci. », 13, 347 (1958).
- [17] E. FORNASARI e G. RODIGHIERO, « Il Farmaco, Ed. Sci. », 13, 379 (1958).
- [18] E. FORNASARI, G. RODIGHIERO e U. FORNASIERO, « Il Farmaco, Ed. Sci. », 14, 734 (1959).
- [19] L. MUSAJO e G. RODIGHIERO, « Nature », 190, 1109 (1961).
- [20] L. MUSAJO, G. RODIGHIERO, G. CAPORALE, U. FORNASIERO, G. MALESANI, F. DALL'ACQUA e C. GIACOMELLI, « Gazz. Chim. Ital. », 94, 1054 (1964).
- [21] G. RODIGHIERO, L. MUSAJO, F. DALL'ACQUA e G. CAPORALE, « Gazz. Chim. Ital. », 94, 1073 (1964).
- [22] G. RODIGHIERO, L. MUSAJO, U. FORNASIERO, G. CAPORALE, G. MALESANI e G. CHIARELOTTO, « Gazz. Chim. Ital. », 94, 1084 (1964).

- [23] G. F. AZZONE, G. RODIGHIERO, L. MUSAJO, F. DALL'ACQUA, U. FORNASIERO e G. MALESANI, « Gazz. Chim. Ital. », 94, 1101 (1964).
- [24] G. COLOMBO, G. A. LEVIS e V. TORLONE, « Progr. Biochem. Pharmacol. », 1 (1965) (in corso di stampa).
- [25] M. M. MATHEWS, « J. Bact. », 85, 322 (1963).
- [26] L. MUSAJO, G. RODIGHIERO, G. COLOMBO, V. TORLONE e F. DALL'ACQUA, « Experientia », 21, 22 (1965).
- [27] G. RODIGHIERO, G. CAPORALE e T. DOLCHER, « Atti Acc. Naz. Lincei », 30, 84 (1961).
- [28] F. BOYLAND e B. GREEN, « Brit. J. Cancer », 16, 347, 507 (1962).
- [29] A. M. LIQUORI, B. DE LERMA, F. ASCOLI, C. BOTRÈ e M. TRASCIATTI, « J. Mol. Biol. », 5, 521 (1962).
- [30] L. MUSAJO, G. RODIGHIERO e F. DALL'ACQUA, « Experientia », 21, 24 (1965).
- [31] L. MUSAJO, G. RODIGHIERO, A. BRECCIA, F. DALL'ACQUA e G. MALESANI, « Experientia », in corso di stampa.
- [32] R. BEUKERS e W. BERENDS, « Biochim. et Biophys. Acta », 41, 550 (1960).
- [33] A. M. CRESTFIELD, K. C. SMITH e F. W. ALLEN, « J. Biol. Chem. », 216, 185 (1955).
- [34] H. SCHWANDER e R. SIGHIER, « Helv. Chim. Acta », 33, 1521 (1950).
- [35] « Biochemical Preparations », 6, 8 (1958).

SUMMARY. — In connection with their researches on the mechanism of action of the skin-photosensitizing furocoumarins, the AA. have recently pointed out the possibility of a photoreaction « in vitro » between the same furocoumarins and DNA, after irradiation at 3.655 Å. Such a photoreaction is now confirmed and more extensively studied using a labeled furocoumarin, i.e. bergapten —O¹⁴CH₃. The formation has been ascertained of a chemical bond between the furocoumarin and DNA, after irradiation at 3.655 Å. Moreover it has been found that the furocoumarins photoreact also with the pyrimidine bases and their nucleosides and nucleotides but they do not with the corresponding purine derivatives. Therefore, the AA. postulate that the pyrimidine bases may be the reactive sites also in DNA.

With RNA and thermally denaturated DNA the furocoumarins photoreact in a much lesser extent.

Since this photoreaction is specific for the skin-photosensitizing furocoumarins, it appears likely that it could explain the mechanism of the till now observed biological photosensitizing effects of furocoumarins, as the skin-erythema, the DNA- viruses inactivation and the lethal and mutagenic action on bacteria and on mammalian cells adapted to *in vitro* growth.