

---

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA**  
**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOCHIMICHE E**  
**BIOMOLECOLARI**  
**XXIV CICLO**

---

*Dott.ssa Giuseppina Bracchitta*

**Reazioni fotoindotte da agenti xenobiotici in sistemi a  
crescente complessità molecolare**

*Tesi di Dottorato*

*Tutore: Chiar.mo Prof. Guido de Guidi*  
*Coordinatore: Chiar.mo Prof. Angelo Vanella*

---

2008-2011

# Indice

<b>1.</b>	<b>Introduzione</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Fotosensibilizzazione</b> .....	<b>9</b>
2.1	Meccanismi molecolari dei processi di fotosensibilizzazione.....	11
2.2	Fotoreazioni sensibilizzate via radicali (Reazioni di tipo I).....	13
2.3	Fotossidazioni sensibilizzate via ossigeno singoletto (Reazioni di tipo II).....	15
<b>3.</b>	<b>Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS)</b> .....	<b>17</b>
<b>4.</b>	<b>Fotosensibilizzatori</b> .....	<b>20</b>
4.1	I FANS (Farmaci Antiinfiammatori Non Steroidei).....	20
4.2	Il Naprossene.....	24
4.3.	Il blu di metilene come fotogeneratore ideale di ossigeno singoletto	25
<b>5.</b>	<b>Target biologici dei processi di fotosensibilizzazione</b> .....	<b>27</b>
5.1	Il triptofano.....	27
5.2	Metaboliti e fotoprodotto del triptofano.....	28
5.3	Le proteine .....	35
5.4	Fotossidazione delle proteine.....	36
5.5	L'Albumina Sierica Bovina purificata (BSA).....	40
5.6.	Il lievito <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	43
5.7.	Fibroblasti umani.....	45
<b>6.</b>	<b>Materiali e Metodi</b> .....	<b>48</b>
6.1	Reagenti.....	48
6.2	Condizioni d'irradiazione.....	48
6.3	Strumentazione.....	49

<b>7.</b>	<b>Esperimenti di fotosensibilizzazione.....</b>	<b>49</b>
7.1	Trp.....	49
7.2	BSA.....	49
7.2.1	Recupero del Trp dal BSA.....	50
7.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	50
7.3.1	Incubazione con i foto sensibilizzatori.....	51
7.3.2	Irradiazione.....	51
7.3.3	Sopravvivenza cellulare.....	51
7.3.4	Determinazione Trp.....	52
7.4	<b>Analisi HPLC</b> .....	<b>52</b>
7.4.1	Cromatografia HPLC: sistema I.....	52
7.4.2	Cromatografia HPLC: sistema II.....	52
7.4.3	Cromatografia HPLC: sistema III.....	53
7.4.4	Cromatografia HPLC: sistema IV.....	53
7.5	<b>Sintesi della N-formilchinurenina</b> .....	<b>54</b>
7.6	<b>Fotosensibilizzazione su Fibroblasti</b> .....	<b>54</b>
7.6.1	Linea cellulare.....	54
7.6.2	Fotocitotossicità.....	54
7.6.3	Determinazione dei ROS intracellulari.....	55
7.6.4	Determinazione modificazioni proteiche.....	56
7.6.5	Analisi della progressione del ciclo cellulare.....	56
7.6.6	Degradazione del Trp nei fibroblasti MRC5Vi.....	56
<b>8.</b>	<b>Proprietà fotochimiche del target e dei foto sensibilizzatori.....</b>	<b>58</b>
8.1.	<b>Il blu di metilene</b> .....	<b>58</b>
8.1.2	Cenni sulla fotochimica del BM.....	59
8.2.	<b>Il Naprossene</b> .....	<b>61</b>
8.2.1	Cenni sulla fotochimica e sulla fotosensibilizzazione del NAP.....	62
8.3.	<b>Il Triptofano</b> .....	<b>65</b>

8.3.1	Cenni sulla fotochimica del Trp.....	67
<b>9.</b>	<b>Fotosensibilizzazione indotta sul Triptofano libero.....</b>	<b>70</b>
9.1	Interazione sensibilizzatore-target.....	70
9.2	Fotosensibilizzazione del Trp.....	72
9.3	Identificazione dei prodotti di fotossidazione del Trp.....	74
9.4	Degradazione dei fotosensibilizzatori e del Trp e formazione dei fotoprodotti.....	80
9.4.1	Cinetiche di fotodegradazione e formazione di fotoprodotti: BM.....	80
9.4.2	Cinetiche di fotodegradazione e formazione di fotoprodotti: NAP.....	85
9.5	Confronto tra il modello BM-Trp e il modello NAP-Trp.....	88
<b>10.</b>	<b>Fotosensibilizzazione indotta sulla BSA.....</b>	<b>91</b>
10.1	Interazione BSA-fotosensibilizzatori.....	91
10.1.1	Interazione BSA-NAP.....	91
10.1.2	Interazione BSA-BM.....	93
10.2	Fotosensibilizzazione dei residui di Trp della BSA.....	95
10.3	Ottimizzazione del protocollo sperimentale nel recupero del Trp dal BS.....	97
10.4	Fotodegradazione e formazione dei prodotti: BSA.....	100
10.4.1	Cinetiche di fotodegradazione e formazione dei prodotti: NAP.....	100
10.4.2	Cinetiche di fotodegradazione e formazione dei prodotti:NAP.....	105
10.5	Confronto tra i sistemi BM-BSA e NAP-BSA.....	107
<b>11.</b>	<b>Ruolo dell'ossigeno singoletto: misure risolte nel tempo.</b>	<b>110</b>
<b>12.</b>	<b>Fotosensibilizzazione indotta su Saccharomyces cerevisiae.....</b>	<b>112</b>
12.1	Concentrazione intracellulare dei foto sensibilizzatori.....	112
12.2	Fotoossidazione del Trp nei lieviti.....	113
12.3	Fototossicità.....	117

<b>13.</b>	<b>Fotosensibilizzazione indotta dal Naprossene nei fibroblasti umani: un'indagine dei pathway coinvolti nella fototossicità cellulare.....</b>	<b>120</b>
13.1.	Fotocitotossicità.....	120
13.2.	Produzione dei ROS.....	122
13.3.	Modificazioni proteiche.....	125
13.4.	Ciclo cellulare.....	129
13.5.	Degradazione del Trp.....	130
<b>14.</b>	<b>Conclusioni.....</b>	<b>132</b>
<b>15</b>	<b>Collaborazioni.....</b>	<b>135</b>
<b>16.</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>136</b>

## 1. INTRODUZIONE

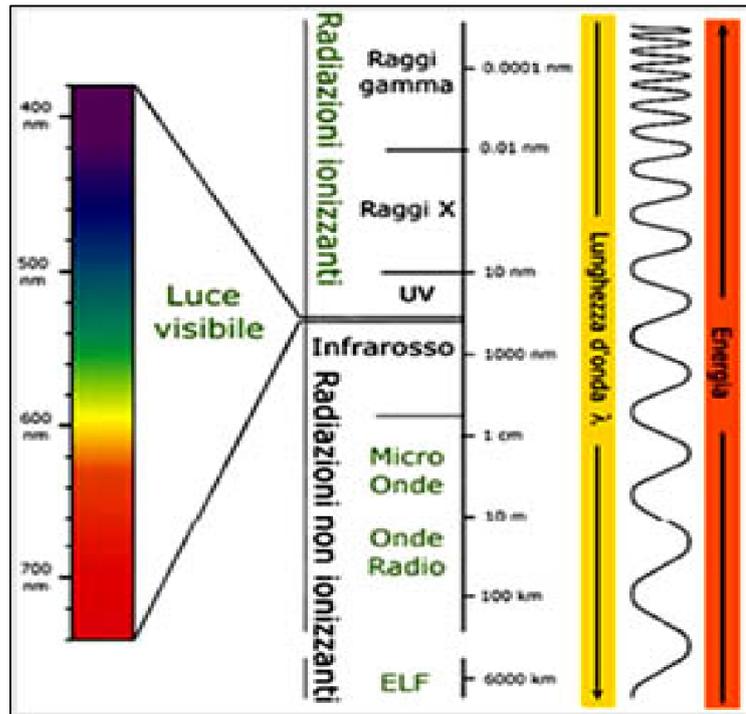
Molte sostanze esogene (farmaci, coloranti, additivi alimentari), definiti comunemente *xenobiotici*, ossia molecole di origine naturale o di sintesi, estranee all'organismo possono indurre, in seguito di una loro assunzione, reazioni fototossiche dopo esposizione alla luce solare.

Negli ultimi anni la ricerca scientifica sta affrontando il problema dei danni provocati alla salute dell'uomo dall'azione della luce solare su un agente xenobiotico, come un farmaco dopo la sua assunzione [1, 2], infatti, l'uso di farmaci fotosensibilizzanti e l'esposizione al sole può essere un'associazione pericolosa. Tali studi sono stati anche motivati da un incremento statistico dell'incidenza dei danni a livello cutaneo strettamente correlabile con l'aumento dell'esposizione alla radiazione solare.

Infatti, la luce ha la capacità di penetrare nello strato cutaneo e raggiungere il flusso ematico dove può colpire non solo le molecole endogene, ma anche gli xenobiotici che possono assorbire l'energia e disattivarla innescando reazioni fotochimiche e fotofisiche dannose per l'organismo.

La fotobiologia si occupa dello studio di queste modificazioni biologiche conseguenti all'esposizione a radiazioni elettromagnetiche non ionizzanti, sia di biomolecole sia di agenti xenobiotici che si trovano nei biosistemi.

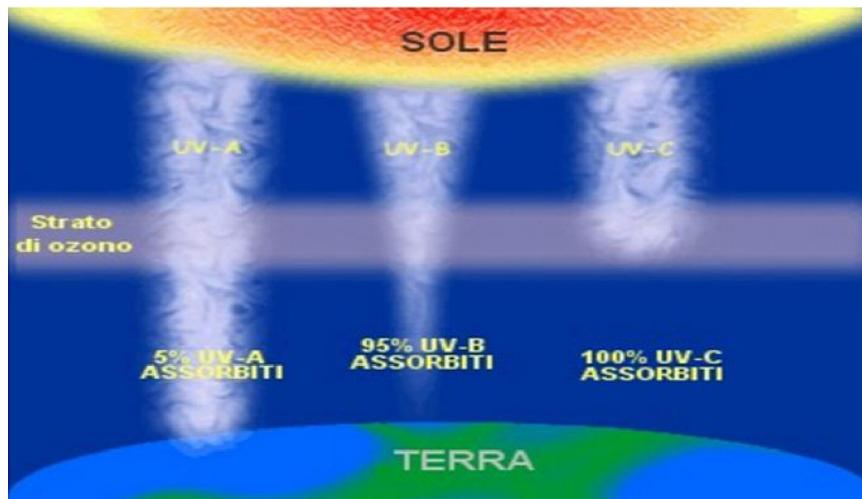
L'insieme delle radiazioni elettromagnetiche, classificate in base alla loro frequenza, costituisce lo spettro elettromagnetico (Fig. 1.1).



**Fig. 1.1. Spettro elettromagnetico**

Il tipo di radiazione interessante dal punto di vista fotobiologico copre il campo dell'ultravioletto e del visibile. I raggi UV comprendono solo il 3% della radiazione solare che raggiunge la superficie terrestre.

Lo spettro UV è compreso tra le lunghezze d'onda 200 e 400 nm ed è suddiviso in tre porzioni: UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320 nm) e UV-C (meno di 280 nm). Le radiazioni UV-C e in parte le UV-B non raggiungono la superficie terrestre a causa dell'azione filtrante dell'ozono atmosferico, anche se le radiazioni UV-B, riescono sempre di più ad attraversare tale barriera a causa delle profonde alterazioni dell'ozonosfera dovute ad un sempre maggiore inquinamento atmosferico (Fig.1.2).



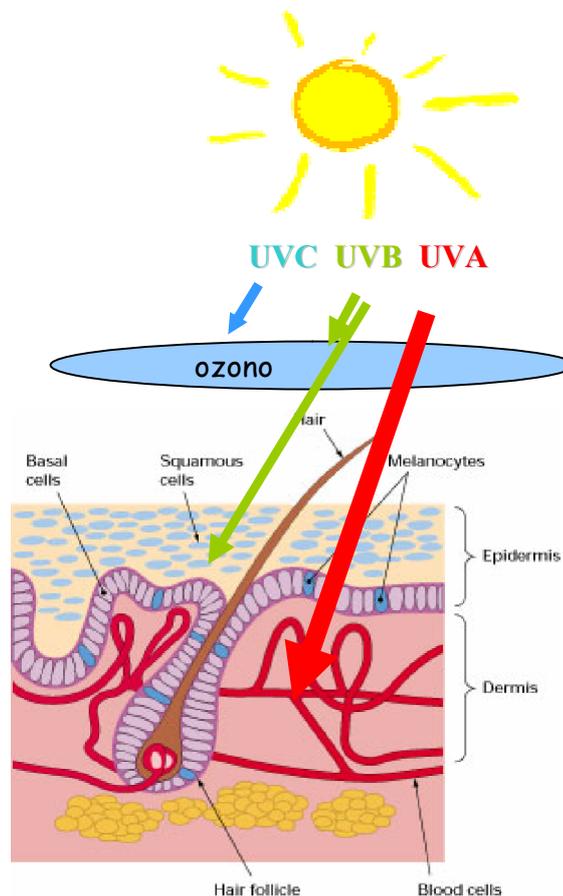
**Fig. 1.2: Assorbimento delle radiazioni UV nello strato di ozono**

Il picco di assorbimento di molte molecole biologiche rientra nel range dell'UVC; i singoli nucleosidi, il colesterolo e i fosfolipidi assorbono intorno a 260nm e le proteine a 280 nm.

Nell'uomo esistono due sistemi di auto-protezione:

- Alcune molecole biologicamente importanti non assorbono nel visibile.
- Presenza di pigmenti che assorbono la luce solare nella zona dell'UVA e si disattivano, dopo l'assorbimento, non attraverso trasferimenti di energia, bensì per perdita di calore. Quest'ultima, infatti, è la prerogativa dei filtri solari.

A livello della cute la capacità di penetrazione di una radiazione elettromagnetica è funzione della sua lunghezza d'onda. Radiazioni di 300 nm (UV-B) penetrano fino a 6  $\mu\text{m}$  all'interno della cute, venendo assorbite per il 95 % dall'epidermide. Radiazioni di 350 nm (UV-A) invece penetrano fino a 60  $\mu\text{m}$  raggiungendo quindi ad alte dosi il derma. Le radiazioni UV (in maggior quantità le UV-A) possono penetrare nello strato cutaneo fino a raggiungere il flusso ematico (Fig.1.3).



**Fig.1.3 La radiazione UVA può raggiungere gli strati profondi dell'epidermide dei vasi sanguigni dove, se sono presenti agenti xenobiotici, può indurre reazioni di fotosensibilizzazione.**

Quindi, gli agenti xenobiotici, sia quelli che entrano in contatto con l'organismo per via topica sia quelli che vengono assorbiti per via sistemica, potrebbero rappresentare fattori di rischio per un danno ossidativo alle strutture cellulari, in particolare i lipidi di membrana, le proteine e gli acidi nucleici. Questo evento è legato alla capacità dell'agente xenobiotico di assorbire la radiazione incidente, ossia di comportarsi da "cromoforo fotosensibilizzatore".

In questo modo l'assorbimento della radiazione da parte di un agente xenobiotico o di un suo metabolita può indurre reazioni di fotosensibilizzazione che sono in grado di provocare effetti biologici dannosi come fototossicità, fotoallergia, fotomutagenesi, fotocarcinogenesi, ecc. [3-7].

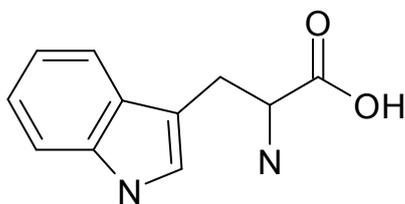
Le reazioni fotosensibilizzate, causate per la maggior parte da esposizione alla luce solare, conducono a disordini foto-aggravati che possono includere eruzioni poliformi e maculopapillari, eruzioni giovanili, eczema, orticaria e dermatite cronica. È da tenere inoltre in considerazione l'invecchiamento della cute; esso è un fenomeno biologico complesso, che può essere notevolmente accelerato dai raggi solari. Con il termine "fotoinvecchiamento" (o photoaging) si indicano, infatti, le modificazioni cutanee indotte dall'esposizione solare, sommate alle modificazioni fisiologiche dovute all'età. Molti segni che in realtà sono causati dall'esposizione al sole, sono erroneamente attribuiti all'invecchiamento biologico.

Gli effetti cumulativi dei raggi solari sono particolarmente evidenti sulla pelle d'individui che, per motivi professionali, sono continuamente esposti al sole (contadini, marinai, pescatori, muratori, velisti).

L'interesse riguardo questa problematica è notevolmente aumentato e, particolarmente le ditte farmaceutiche, sono interessate all'eliminazione di questi possibili effetti collaterali ed alla progettazione di nuovi sistemi di fotoprotezione.

In questa tesi è stata presa in considerazione la fotoreattività di agenti xenobiotici e i loro effetti fotosensibilizzanti su biosubstrati, al fine di identificare le possibili specie, stabili o transienti, coinvolte nel processo fotoindotto. In particolare, questa indagine si propone di analizzare l'effetto fotosensibilizzante di un agente xenobiotico in sistemi biologici a crescente complessità molecolare esaminando la fotoossidazione del triptofano (Trp) (Fig. 1.3) in:

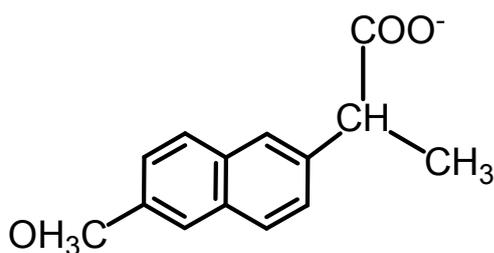
- a) Trp libero
- b) Albumina Sierica Bovina (BSA)
- c) Proteine cellulari di lievito *Saccharomyces cerevisiae*



**Fig. 1.3: Struttura molecolare del Trp.**

L'agente xenobiotico utilizzato è il Naprossene (NAP). Il NAP, (Fig. 1.3), è un farmaco appartenente alla categoria degli antinfiammatori non-steroidi (FANS). Questi farmaci sono tra i principali agenti terapeutici utilizzati nel trattamento del dolore e delle infiammazioni, tra le quali le affezioni reumatiche [8].

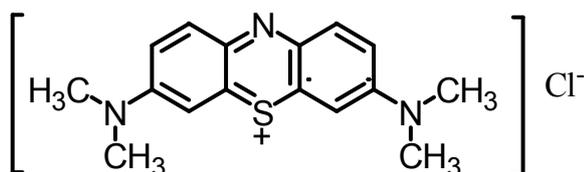
E' anche usato in veterinaria [9] e in animali da allevamento per i suoi effetti farmacologici secondari che migliorano la qualità della carne. Si ha quindi una potenziale assunzione di NAP come residuo nel cibo e questo può essere un rischio per la salute dato che può determinare allergie, lesioni gastrointestinali, nefrotossicità e cambiamenti nelle funzioni renali [10-11].



**Fig. 1.3: Struttura molecolare del NAP**

Molti FANS sono capaci di agire come fotosensibilizzatori e inducono dunque reazioni allergiche cutanee [12-13].

Per esaminare il meccanismo di fotosensibilizzazione del NAP è stato svolto uno studio parallelo su un altro fotosensibilizzatore, il Blu di Metilene (BM) (Fig.1.4) utilizzato come agente fotoossidante per gli amminoacidi aromatici, in particolare per il Trp grazie alla sua capacità fotoossidante caratterizzata da reazioni che coinvolgono l'ossigeno singoletto ( $^1O_2$ ) [14].



**Fig.1.4: Struttura molecolare del Blu di Metilene**

Il BM è molto utilizzato in campo biologico come colorante e indicatore di pH. È stato a lungo utilizzato come uno strumento per lo studio del metabolismo redox intracellulare [15-17] così come per la diagnosi di patologie e in particolare di carcinomi [18,19].

Trova impiego in ambito medico per le sue caratteristiche anti-metaemoglobiniche e di antidoto per le intossicazioni da cianuro; in ambito veterinario come antisettico e disinfettante.

Inoltre, diversi ricercatori hanno segnalato che il BM è potenzialmente efficace per il trattamento della malaria causata da *Plasmodium falciparum* e sembra poter essere utilizzato nella terapia fotodinamica per il trattamento dei tumori [20].

In combinazione alla luce visibile questo farmaco è utilizzato per la foto-inattivazione di molti virus (HIV, HBV, ecc.) [21,22].

Un'attenta valutazione dei risultati della fotosensibilizzazione indotta dal BM e da altri farmaci sullo stesso target biologico ha l'obiettivo di portare a una delucidazione del meccanismo e quindi dei pathway di reazione implicati nel danneggiamento delle proteine.

Infatti, nel plasma si può distinguere Trp libero e legato a proteine come l'albumina: da ciò è nata la necessità di svolgere un'indagine a crescente complessità molecolare. Infatti, è stato condotto uno studio progressivo della fotosensibilizzazione del Trp libero [23], nelle proteine [24] e nelle cellule [24] al fine di correlare fotoreattività e tossicità rendendo evidenti aspetti molto importanti in campo fotobiologico.

*L'obiettivo di questo progetto di ricerca è quello di studiare il meccanismo di foto ossidazione e quindi il pathway di reazioni indotte dal NAP, coinvolte nelle fotoossidazioni dei residui del Trp presenti nel BSA mettendo a confronto i meccanismi di fotosensibilizzazione dei due agenti xenobiotici, BM e NAP. L'utilizzazione di un noto sensibilizzatore di tipo II come il BM ha permesso un confronto diretto fra la fotoossidazione del Trp indotta da entrambi i fotosensibilizzatori al fine di valutare il ruolo dell'antinfiammatorio nella foto ossidazione dell'aminoacido in modelli a crescente complessità molecolare.*

Inoltre, durante l'esperienza presso l'Institut Curie di Parigi ho condotto uno studio dei processi fotoindotti dal NAP in fibroblasti umani al fine di esaminare come agisce in un sistema così complesso, i meccanismi molecolari e i pathway coinvolti nella fototossicità cellulare fotoindotta dal NAP.

Infine, ma non per questo meno importante, ho collaborato alla stesura di un invited review su "Photosensitization reactions of fluoroquinolones and their biological consequences" nella quale è riportata una overview delle reazioni fotoindotte da questa classe di farmaci antibatterici che sono implicati in molti effetti avversi come fotoallergie, fototossicità, mutagenesi e carcinogenesi.

## 2. FOTOSENSIBILIZZAZIONE

L'importanza dei processi di fotosensibilizzazione può essere facilmente compresa tenendo in considerazione il crescente numero di lavori che trattano degli effetti fototossici indotti da nuovi farmaci. Infatti, come detto precedentemente, i raggi UVA penetrano molto efficientemente nello strato basale dell'epidermide e nel derma raggiungendo i vasi sanguigni dove potenziali fotosensibilizzatori di origine esogena o endogena possono assorbire la luce e, di conseguenza, le specie fotogenerate possono essere trasportate in altri compartimenti. In questo modo, la presenza di xenobiotici nel flusso ematico può indurre le cosiddette reazioni di fotosensibilizzazione. Per fotosensibilizzazione si intende l'insieme di quei processi che permettono di modificare mediante la luce una molecola che di per se non assorbe, mediante un'altra molecola che funge da tramite e che viene definita fotosensibilizzatore. Tali processi prevedono il trasferimento di elettroni o energia dal fotosensibilizzatore alla molecola target.

Le reazioni iniziano con l'assorbimento delle radiazioni da parte del fotosensibilizzatore che passa allo stato eccitato; tale stato viene detto di singoletto eccitato e il suo tempo di vita è in genere molto breve ( $10^{-12}/10^{-9}$  s). La disattivazione di questo stato può avvenire attraverso processi radiativi (fluorescenza) e non radiativi (conversione interna o intersystem crossing). L'intersystem crossing determina il passaggio della molecola allo stato di tripletto eccitato che ha un tempo di vita più lungo ( $10^{-6}/10^{-3}$  s). Molte reazioni di fotosensibilizzazione avvengono attraverso lo stato di tripletto eccitato.

I fotosensibilizzatori allo stato eccitato possono determinare effetti fototossici sui substrati biologici seguendo due principali pathway:

1) **trasferimento di energia** dallo stato di tripletto eccitato all'ossigeno formando ossigeno singoletto che può indurre danno ossidativo alle biomolecole

2) **trasferimento di elettroni o di ioni idrogeno** che può portare alla formazione di specie radicaliche che possono attaccare direttamente le biomolecole oppure, in presenza di ossigeno, possono sviluppare radicali liberi come il radicale perossidico o il radicale idrossilico, un noto intermedio nel danno ossidativo del DNA e delle altre biomolecole.

In genere, le reazioni mediate dai radicali sono chiamate reazione di Tipo I mentre quelle mediate dall'ossigeno singoletto sono dette di Tipo II.

## 2.1 Meccanismi molecolari dei processi di fotosensibilizzazione

Esistono molti meccanismi molecolari coinvolti nella sensibilizzazione e possono essere suddivisi in due grandi classi:

- *fotoazioni sensibilizzate via radicali: TIPO I.*
- *fotoazioni sensibilizzate via ossigeno singoletto: TIPO II.*

L'energia fornita dalla luce comporta l'eccitazione della molecola. Essa viene pertanto attivata e in seguito potrà seguire diversi cammini di disattivazione. Il diagramma di Jablonski (Fig. 2.1) mostra i possibili cammini di disattivazione che possono prevedere la formazione di radicali o il trasferimento di energia dallo stato di tripletto. Se l'accettore di energia è l'O<sub>2</sub> nel suo stato fondamentale di tripletto si forma una specie altamente reattiva: l'ossigeno singoletto.

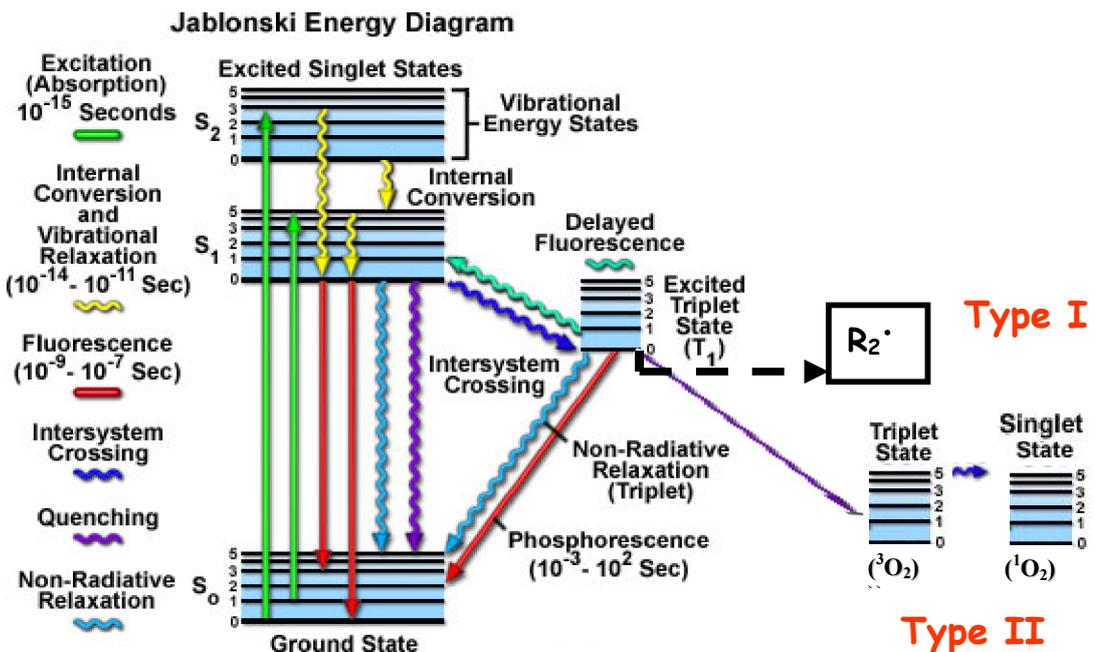


Fig.2.1: Diagramma di Jablonski per una molecola organica nel suo stato di singoletto S<sub>0</sub>.

Prima però di passare ad esaminare le due classi di fotoreazioni è opportuno richiamare alcuni concetti riguardanti la configurazione elettronica dell'ossigeno molecolare.

**Configurazione elettronica dell'ossigeno.** Le reazioni risultanti dalle interazioni tra il sensibilizzatore o il substrato eccitato e l'ossigeno presente nel solvente sono note come effetti fotodinamici. Le azioni dell'ossigeno si possono comprendere facilmente considerando la sua struttura elettronica (Fig.2.2).

ground state triplet $T_0$	singlet state (0.98 eV)	singlet state (1.6 eV)	excited state triplet $T_1$
$^3O_2$ ( $^3\Sigma_g^-$ )	$^1O_2$ ( $^1\Delta_g$ )	$^1O_2$ ( $^1\Sigma_g^+$ )	$^3O_2^*$ ( $^3\Sigma_u^+$ )

Fig.2.2: Struttura elettronica dell'ossigeno molecolare

Queste configurazioni meritano alcune considerazioni:

- 1) nel suo stato fondamentale l'ossigeno ha un carattere biradicalico (due elettroni spaiati), responsabile dell'ossidazione e della sua capacità di accettare elettroni;
- 2) gli stati di singoletto comportano entrambi un'inversione di spin ma  $^1\Delta_g$ , il singoletto con gli elettroni sullo stesso orbitale, ha un'energia di attivazione più bassa (0.98 eV). Questo nuovo stato non ha carattere radicalico;
- 3) lo stato di singoletto ( $^1\Sigma_g$ ) ad energia più alta (1.6 eV) ha un tempo di vita di gran lunga più basso; per questo motivo la sua implicazione in effetti

fotodinamici è trascurabile;

4) questi due stati di singoletto risultano dall'inversione di spin e non dalla transizione elettronica in un orbitale vuoto;

5) il primo stato eccitato che risulta da una transizione elettronica in un orbitale vuoto è lo stato di tripletto  $3\Sigma_u$ ; anche per questa configurazione una diretta generazione ottica è poco probabile in quanto la transizione  $T_0 \rightarrow T_1$  è proibita dalle regole di simmetria.

## 2.2 Fotoreazioni sensibilizzate via radicali (Reazioni di tipo I)

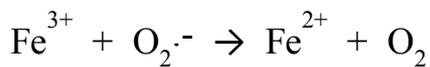
Si possono dividere in reazioni che coinvolgono o che non coinvolgono l'ossigeno. Quelle coinvolgenti l'ossigeno, sono almeno quattro di cui una iniziata dall'interazione sensibilizzatore-ossigeno e tre iniziate dall'interazione sensibilizzatore-substrato:

- Il sensibilizzatore in uno stato di tripletto può formare un complesso di trasferimento di carica con l'ossigeno dando luogo, in seguito alla dissociazione, alla specie  $O_2^{\bullet-}$  (ione superossido).
- L'interazione sensibilizzatore eccitato-substrato può dar luogo a un trasferimento elettronico e l'anione formatosi, interagendo con l'ossigeno, può formare lo ione superossido;
- Il sensibilizzatore eccitato può estrarre idrogeno al substrato che diventando così un radicale viene generalmente ossidato dall'ossigeno;
- Il sensibilizzatore eccitato può esso stesso scindersi in radicali i quali, ossidati o non ossidati, estrarranno idrogeno al substrato il quale sarà a sua volta ossidato dall'ossigeno.

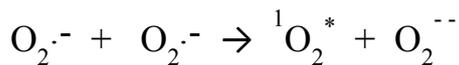
Quando si forma lo ione superossido  $O_2^{\bullet -}$  questo può promuovere l'ossidazione in quattro modi [15]:

1) estraendo idrogeno e formando l'idroperossido  $HO_2^{\bullet}$  altamente reattivo  
2) acquistando un secondo elettrone (comportamento da particella ossidante), formando la specie  $O_2^{2-}$  e quindi  $H_2O_2$

3) perdendo il suo elettrone in una reazione di riduzione:



4) dismutandosi per dar luogo alla formazione di ossigeno singoletto e  $H_2O_2$ :



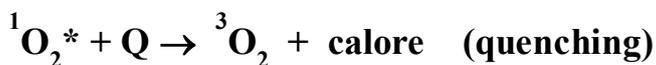
Le reazioni in assenza di ossigeno possono essere:

- reazioni di trasferimento di carica fra sensibilizzatore eccitato e substrato;
- reazioni di estrazione di idrogeno da parte del sensibilizzatore eccitato sul substrato che diventa estremamente reattivo;
- espulsione di un elettrone probabilmente dallo stato di singoletto  $S_1$  della molecola eccitata in solvente acquoso;
- infine l'interazione fra sensibilizzatore eccitato e substrato può avvenire mediante fotoaddizione.

## 2.3 Fotossidazioni sensibilizzate via ossigeno singoletto (Reazioni di tipo II)

Queste reazioni avvengono attraverso un trasferimento di energia dal sensibilizzatore fotoeccitato ad una molecola di ossigeno (spin permettendo) che si trova nel suo stato fondamentale di tripletto, si ha quindi la formazione della specie reattiva ossigeno singoletto.

Una volta formato, l'ossigeno singoletto può subire diversi processi di disattivazione, riassunti nel seguente schema:



**Q = Quencher**

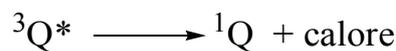
L'emissione dell'ossigeno, ( $\lambda = 1.27 \mu\text{m}$ ) ha una bassa resa quantica, tuttavia essa è facilmente misurabile ed è considerata come la migliore prova del coinvolgimento dell' ${}^1\text{O}_2$  in una reazione di fotosensibilizzazione. La disattivazione non radiativa è indotta principalmente dall'effetto del momento dipolare delle molecole del solvente sugli elettroni dell'ossigeno, inducendo ad un mescolamento degli stati  ${}^1\Delta_g$  e  ${}^3\Sigma_g$ . In acqua l'accoppiamento tra entrambi gli stati è forte, la disattivazione è quindi efficiente e il tempo di vita è breve (circa  $4 \mu\text{s}$ ). In  $\text{D}_2\text{O}$  e nei lipidi (membrane cellulari), l'accoppiamento è indebolito e il tempo di vita è più lungo ( $55$  e  $100 \mu\text{s}$  rispettivamente).

Lo spegnimento con specifici quenchers (**Q**) può avvenire attraverso due diversi processi:

a) attraverso la formazione di complessi di trasferimento di carica ( $\text{O}_2 \dots \text{Q}^+$ ) e

successiva disattivazione interna;

b) con trasferimento di energia su una molecola Q nella quale un efficiente intersystem crossing promuove il rilassamento vibrazionale prima che avvenga la disattivazione del  $^3Q^*$  con emissione di calore [16, 17]:



Queste reazioni sono di importanza biologica, poiché possono interessare membrane (addizioni su catene aciliche di fosfolipidi insaturi), proteine ed enzimi (ossidazione di aminoacidi quali Trp, istidina, metionina), e acidi nucleici (la guanosina è fotossidabile).

### *In sintesi*

❖ **Meccanismo di tipo I:** richiede l'estrazione di un elettrone o di un protone da parte del sensibilizzatore eccitato che si trova in uno stato di tripletto.

❖ **Meccanismo di tipo II:** avviene attraverso un trasferimento di energia dal sensibilizzatore fotoeccitato ad una molecola di ossigeno che si trova nel suo stato fondamentale di tripletto, si ha quindi la formazione della specie reattiva ossigeno singoletto.

Bisogna tener presente il fatto che i meccanismi molecolari che stanno alla base della fotosensibilizzazione sono diversi anche riguardo alle condizioni ambientali in cui avviene l'assorbimento della luce, poiché il meccanismo di tipo I (radicalico) dà origine a reazioni di natura diversa se si è in condizioni aerobiche o in condizioni anaerobiche. Il meccanismo di tipo II (ossigeno singoletto) invece ha due meccanismi d'azione: a) quenching (complessi di trasferimento di carica con spegnimento) b) fotoossidazione del substrato.

### 3. Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS)

I ROS sono molecole o ioni generati dalla riduzione delle molecole di ossigeno.

Il radicale superossido  $O_2^{\bullet-}$  è una specie molto tossica per la cellula, che si origina durante la respirazione cellulare la quale genera elettroni che possono essere catturati dall' $O_2$ . Il perossido  $H_2O_2$  deriva da reazioni secondarie durante la respirazione e dal superossido.

Il radicale ossidrile  $OH^{\bullet}$ , un'altra specie molto tossica per la cellula, si origina da radiazioni ionizzanti e dalla degradazione del perossido. Di solito anche l'ossigeno singoletto si trova nelle cellule e si genera da varie reazioni fotochimiche (fotosensibilizzazione "endogena") e biochimiche (ossidasi).

La generazione di ROS è una normale conseguenza del metabolismo aerobico e in condizioni fisiologiche è coinvolta anche nella regolazione di molte funzioni come l'apoptosi, la trasmissione del segnale nella proliferazione, differenziazione e motilità cellulare [25].

Il delicato equilibrio tra la produzione e l'eliminazione dei ROS è mantenuto da diversi meccanismi complessi. Un aumento della produzione di ROS o la riduzione degli scavenger dovuti a stimoli esogeni, come l'irradiazione UV, raggi X, raggi gamma o sostanze chimiche possono alterare questo equilibrio determinando un aumento del livello di ROS intracellulari e stress ossidativo. Lo stress ossidativo gioca un ruolo cruciale nella varietà di condizioni patologiche incluso il cancro, disfunzioni neurodegenerative e invecchiamento [26].

Per mantenere inalterato questo equilibrio tra la formazione e l'eliminazione dei ROS, le cellule possiedono vari meccanismi di protezione che agiscono per azione di enzimi e antiossidanti (carotenoidi, acido ascorbico, ecc.).

La maggior parte di antiossidanti enzimatici, che catalizza le dismutazione di  $O_2^{\bullet-}$  in  $H_2O_2$  è conosciuto come superossido dismutasi (SOD). Nei mammiferi

esistono diverse isoforme di SOD localizzate nei diversi compartimenti cellulari. SOD1 (CuZnSOD) è il principale scavenger dell'anione superossido localizzato nel citoplasma, nello spazio intermembrana dei mitocondri, nel nucleo e nei lisosomi mentre la SOD2 (MnSOD) e la SOD3 sono state trovate rispettivamente nei mitocondri e nella matrice extracellulare [27].

Inoltre la conversione di  $H_2O_2$  ad  $H_2O + O_2$  avviene per azione della catalasi, un enzima con gruppo eme che è normalmente localizzato nei perossisomi [28]. L'  $H_2O_2$  può essere convertita in  $O_2$  anche attraverso la conversione del glutatione ridotto (GSH) a glutatione ossidato (GSSG); tale reazione è catalizzata dalla glutatione perossidasi (GPX), un enzima selenio-dipendente.

Nell'uomo esistono cinque isoforme di GPX [28]. La GPX1 è ubiquitariamente espressa ed è il principale scavenger per la  $H_2O_2$  e per gli idroperossidi lipidici. La GPX2 è epitelio-specifica ed è altamente espressa nel tratto gastrointestinale, mentre la GPX3 è un enzima extracellulare glicosilato localizzato nel plasma. La GPX3 può usare la tioredoxina e la glutaredoxina in aggiunta al GSH come donatore di elettrone per ridurre gli idroperossidi. La GPX4 è presente nel citosol, nei mitocondri e nel nucleo ed è il principale enzima che previene l'ossidazione dei fosfolipidi di membrana [29]. Il GSH è il più abbondante peptide nelle cellule ed è uno scavenger dell' $OH^\bullet$  e dell'ossigeno singoletto e rigenera gli altri antiossidanti come la vitamina C ed E alle loro forme attive [30].

Il sistema della tioredoxina è un altro importante tiolo-antiossidante consistente in Tioredoxina (Trx) e tioredoxina reduttasi. La Trx è una selenio-proteina contenente due cisteine nel sito attivo (Cys-Gly-Pro-Cys) [31]. Comunque, anche se molti ROS sono eliminati dal GSH attraverso reazioni con il suo gruppo tiolico, altre proteine contenenti gruppi tiolici possono essere ossidate dai ROS [32]. Quindi, per mantenere inalterata la funzione di queste proteine, per le cellule è essenziale ridurre le proteine ossidate. Il sistema della tioredoxina, in collaborazione con il GSH, gioca un ruolo

importante nella riduzione di proteine contenenti gruppi tiolici. Similarmente, il sistema della glutaredoxina (Grx) riduce i ponti disolfuro. Grx1, Grx2 e Grx3 ottengono le loro proprietà riducenti dal sistema GSH/glutathione redattasi, che è mantenuto dal NADPH [30].

Nonostante la presenza di sistemi antiossidanti per contrastare il danno ossidativo da ROS, esso si accumula durante il ciclo vitale sia per ragioni patologiche che non patologiche. Il danno alle biomolecole dovuto ai ROS sembra che giochi un ruolo importante nello sviluppo di malattia come la arteriosclerosi, artrite, disordini neurodegenerativi e cancro [33].

## 4. FOTSENSIBILIZZATORI

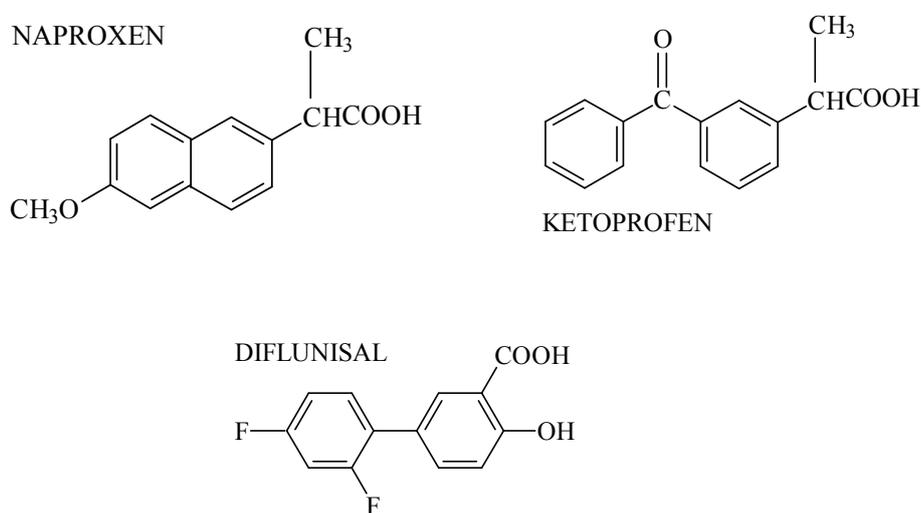
### 4.1 I FANS (Farmaci Antiinfiammatori Non Steroidei).

Tra i vari farmaci che potrebbero indurre effetti fototossici sono ben noti gli antiinfiammatori non steroidei.

Largamente usati per il trattamento del dolore, dell'inflammatione, delle artriti e di numerose malattie, possono causare un incremento della fotosensibilità cutanea scatenando reazioni allergiche [34].

Molti di questi farmaci sono stati studiati in vitro per le loro proprietà fotosensibilizzanti in presenza di un substrato biologico come il DNA [34], proteine [13], eritrociti e componenti di membrana [35]. Tra i farmaci più tossici, molti sono derivati dell'acido propionico con un sostituente arilico in posizione 2. Su alcuni di questi, tra cui il NAP, il Suprofen, il Carprofene e il Chetoprofen, sono stati condotti studi di fotosensibilizzazione [34].

Sono stati studiati i processi fotoemolitici indotti dal Chetoprofen, il NAP e il Diflunisal (Fig.4.1) in eritrociti di mammiferi con differente composizione dei fosfolipidi di membrana. Essi sono tutti acidi carbossilici. Il Diflunisal fa parte invece degli acidi salicilici.

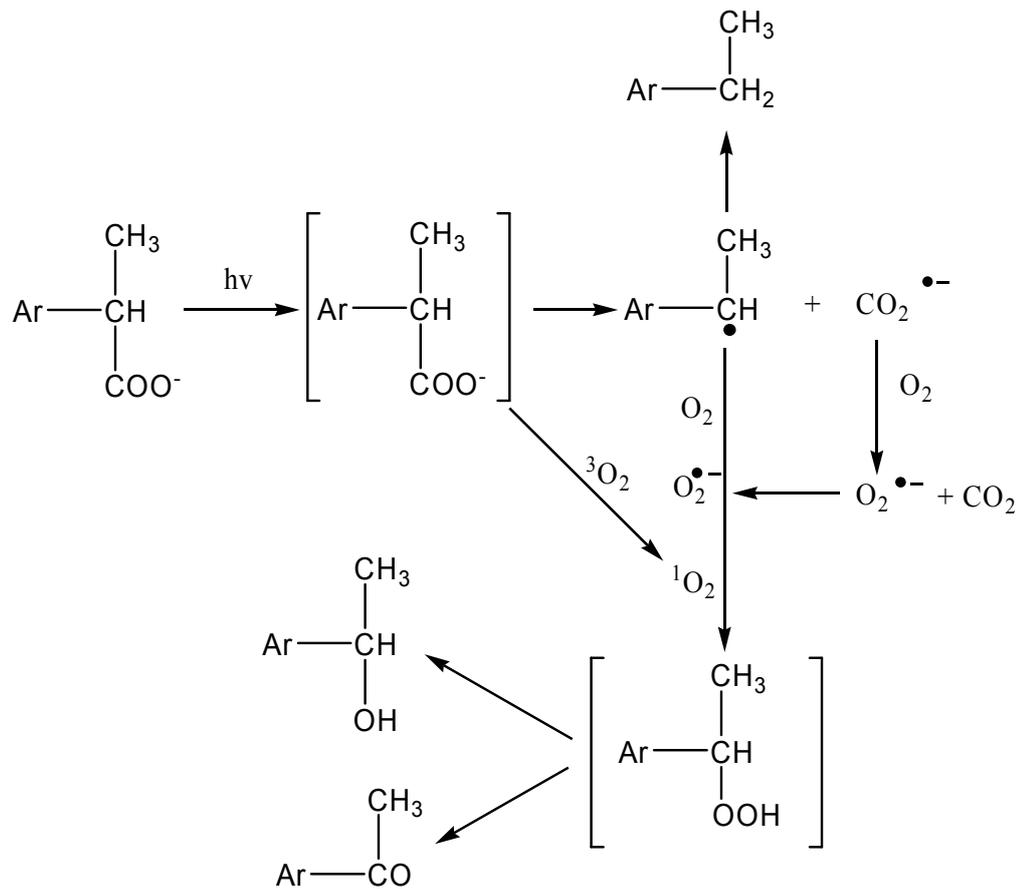


**Fig.4.1 FANS ad attività fotosensibilizzante**

Le membrane di eritrociti umani e bovini sono state selettivamente arricchite con fosfatidilcolina o sfingomieline per vedere se influiscono sulla fotoemolisi di queste cellule indotta dai FANS citati. Questo studio ha messo in evidenza che la sfingomielina, per la sua disposizione asimmetrica nella superficie esterna delle membrane e per la presenza di doppi legami fotoossidabili nella regione idrofobica, diminuisce la fluidità del doppio strato lipidico e favorisce la resistenza della membrana a danni fototossici. D'altra parte una maggiore presenza di fosfatidilcolina diminuisce la resistenza della membrana che può essere ossidata dai ROS indotti dai farmaci in esame [35]. Precedenti studi hanno chiarito il meccanismo molecolare di fotosensibilizzazione su membrane di eritrociti indotto da Chetoprofene, NAP e Diflunisal. Questo processo coinvolge la partecipazione di prodotti di fotodegradazione, radicali liberi e ROS [35].

Altri studi sono stati eseguiti per dimostrare che molti FANS, come il Benoxaprofene, il NAP, il Suprofen, il Carprofene, il Chetoprofene e l'Acido Tioprofenico che sono derivati dell'acido propionico, sono molto fototossici e che la fotossidazione indotta da FANS determina anche danno al DNA.

In particolare è stato dimostrato che fotoinducono la formazione di single strand breaks (SSB), principalmente attraverso un processo radicalico.  $^1\text{O}_2$ , generato dall'irradiazione di questi composti, sembra non essere coinvolto significativamente nella formazione dei SSB. La rottura del DNA può essere favorita da un'interazione non covalente farmaco-DNA come è stato suggerito per Suprofen e per il NAP [34]. Durante la fotosensibilizzazione del DNA indotta da FANS si formano dimeri di pirimidine che possono determinare lo sviluppo di tumori cutanei [34]. Uno schema generale sulla fotochimica dei FANS della categoria degli arilpropionici è riportato in Schema 4.1.



**Schema 4.1: Schema generale per la fotochimica dei FANS della categoria degli arilpropionici.**

Nella Fig.4.2 invece si riporta uno schema generale sui meccanismi di fotosensibilizzazione indotta da tali agenti in presenza di eritrociti umani.

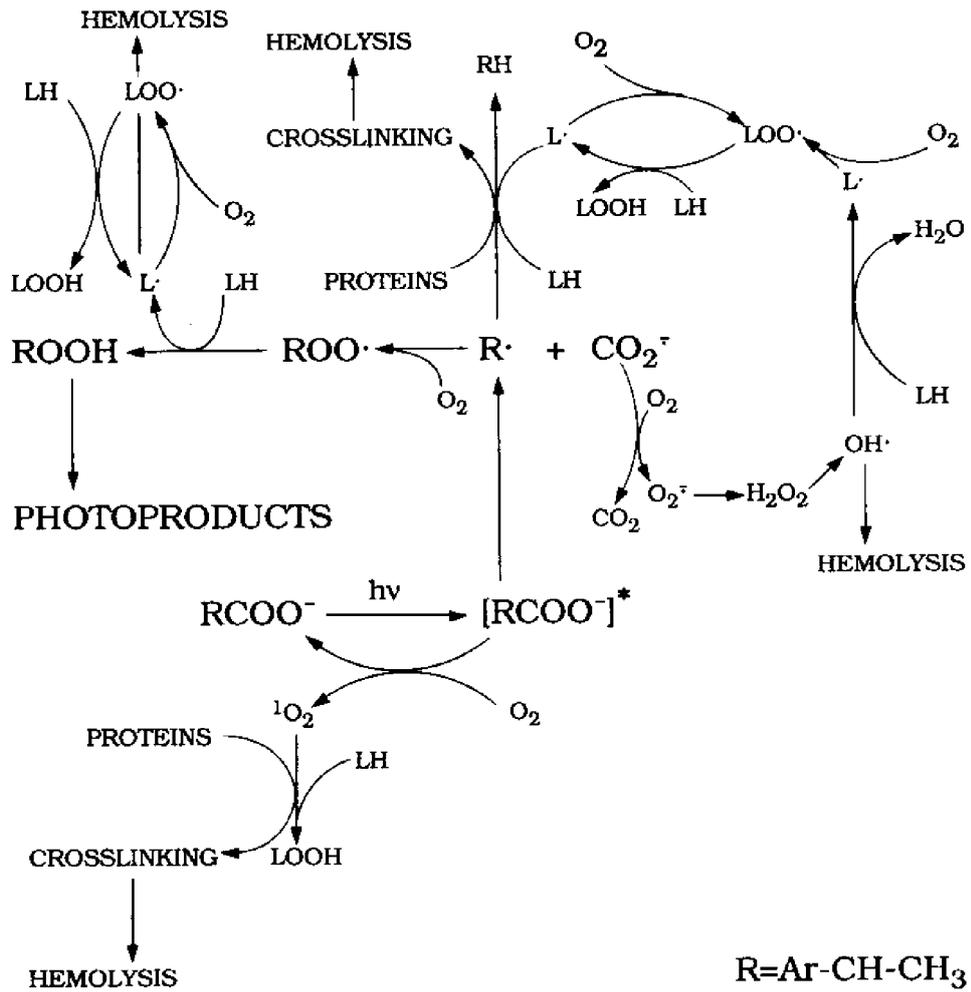


Fig.4.2 Schema generale per i meccanismi di fotosensibilizzazione dei FANS appartenenti alla categoria degli arilpropionici.

## 4.2 Il Naprossene

Il NAP (acido 6-metossi- $\alpha$ -metil-2-naftalene acetico) è un potente fotosensibilizzatore a una struttura aril-propionica, ben conosciuto, infatti, per la sua capacità di indurre fotosensibilità cutanea [12,13].

Studi di Laser flash photolysis hanno mostrato che nella fotodegradazione del NAP sono coinvolti sia processi di fotoionizzazione (con produzione di elettroni solvatati) che di produzione dello stato tripletto generati approssimativamente con la stessa resa quantica. L'ossigeno singoletto è prodotto dall'irradiazione del NAP e la sua presenza è stata confermata da misure di uptake dell'ossigeno.

Inoltre la fotolisi del NAP coinvolge la decarbossilazione con produzione di radicali liberi; è stato proposto un pathway di fotodegradazione che coinvolge uno ione carbenico, formatosi dopo fotoionizzazione [2].

Sono stati effettuati vari studi riguardo la fotosensibilizzazione di questi farmaci su differenti target biologici [2, 4, 6].

In particolare, l'attività fotosensibilizzante può essere evidenziata dall'abilità ad indurre lisi di eritrociti umani [36], perossidazione lipidica [2], cross-linking delle proteine [13] e fotolisi del DNA [12].

I risultati ottenuti concordano con un meccanismo che coinvolge i radicali liberi e, perlopiù,  $^1\text{O}_2$  che è prodotto dal NAP ad alte rese attraverso un trasferimento di energia da  $^3\text{NAP}$ .

Le proprietà fotosensibilizzanti del NAP [8, 37] sono state confrontate con altri FANS come il Chetoprofene [38, 39] e il Diflunisal [2, 34, 40]. Considerando il coinvolgimento dei ROS e degli intermedi radicalici nel danno fotoindotto su membrane, per chiarire il meccanismo di questo processo, sono stati condotti degli esperimenti per valutare l'attività fotosensibilizzante di questi farmaci in cellule opportunamente modificate. Si è visto che, rispetto ai controlli di cellule non modificate, le cellule (eritrociti)

con membrane ricche in sfingomieline sono più resistenti alla fotoemolisi indotta da questi farmaci [34].

### **4.3. Il blu di metilene come fotogeneratore ideale di ossigeno singoletto**

Il BM, anche conosciuto come metiltionina cloridrato oppure 3,7-Bis(dimetilamino)fenotiazina-5-ium cloruro è stato il primo vero composto di sintesi ad essere usato come farmaco.

Paul Guttman descrisse il composto come un agente antimalarico [41]. A discapito di questa attività benefica il composto non venne più usato per la presenza di farmaci più efficaci contro la malaria come la cloroquina. Inoltre sono stati riscontrati effetti collaterali tra i soldati che ne facevano uso come l'escrezione di urine blu o grigie e la presenza di sclere blu. Ultimamente è rivalutato un suo possibile impiego in relazione ad altri farmaci antimalarici soprattutto per il suo basso costo. Il BM è agente xenobiotico usato in diverse discipline, soprattutto in biologia come colorante e in fotochimica come modello di fotosensibilizzatore [14]. E', infatti, considerato un buon modello di fotosensibilizzatore di tipo II [14]. In fotochimica, la sua relativa stabilità alla luce lo rende un importante generatore di ossigeno singoletto,  $E_T=142,1$  kJ/mol con  $\Phi_{\Delta}=0,60$  in acqua [42]. Infatti, questo colorante viene sfruttato in molte reazioni chimiche dove serve la forma reattiva dell'ossigeno. In letteratura si citano molti esempi sull'azione fotoindotta dal BM, in questi lavori si riporta la fotoossidazione di diversi target come membrane [15], proteine [43] e DNA [44]; sulla base di questi studi il BM è fototossico in vitro e potenzialmente fototossico in vivo [45]. Studi di flash photolysis hanno mostrato che la fotolisi del BM avviene mediante fotoprocessi multifotonici che conducono alla formazione di elettroni solvatati e alla formazione di  $^3\text{BM}$  con conseguente trasferimento energetico all'ossigeno molecolare e formazione di ossigeno singoletto [46]. Queste riflessioni giustificano ulteriormente lo scopo di questa tesi, cioè, come anticipato

nell'introduzione, l'utilizzo di un noto sensibilizzatore di tipo II come il BM per un confronto diretto fra la fotoossidazione del Trp indotta da quest'ultimo sensibilizzatore ( $\Phi_{\Delta} = 0,6$  [47]) e dal NAP ( $\Phi_{\Delta} = 0,3$  [42]), al fine di valutare la capacità dell'antinfiammatorio di degradare l'amminoacido anche attraverso  $^1\text{O}_2$ .

## 5. TARGET BIOLOGICI DEI PROCESSI DI FOTOSENSIBILIZZAZIONE.

### 5.1 Il triptofano.

Nell'uomo il Trp è un amminoacido essenziale e serve anche per la biosintesi della serotonina. Il deficit di questa molecola nella dieta umana causa una malattia nota come la pellagra. Il Trp è uno degli amminoacidi più studiati in campo fotochimico, assorbe nella regione UV-C, UV-B ed è uno dei tre residui amminoacidici aromatici, insieme alla tirosina e alla fenilalanina, responsabili dell'assorbimento delle proteine nella zona ultravioletta. La sua struttura aromatica lo rende particolarmente suscettibile a diverse modificazioni chimiche e in particolare alle fotoossidazioni [48], dalle quali si formano diversi prodotti. Alcuni di essi, a loro volta, hanno la capacità di agire da fotosensibilizzatori e quindi di generare delle specie nocive come l'anione superossido, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  [49] e l' $^1\text{O}_2$  [50, 51]. La reazione del Trp con l' $^1\text{O}_2$  risulta avere una costante cinetica  $k = 3.2 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (pH = 7, in acqua) [52], invece quella con l'elettrone solvatato  $k = 3.2 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (T = 298 K, in acqua), quindi in base a queste costanti le reazioni di tipo I risultano di un fattore di 10 più veloci. Sono state studiate anche le reazioni dell'amminoacido con i radicali. Da letteratura sappiamo che l'anione superossido, che si forma dalla reazione dell'elettrone solvatato con l'ossigeno molecolare, reagisce con una costante  $k = <24 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (pH = 10.6, in acqua), l'idrogeno reattivo  $\text{H}^\bullet$  con  $k = 2 \times 10^9 \text{ (L mol}^{-1} \text{ s}^{-1})$ , (pH ~ 6, in acqua) ed infine il radicale idrossile  $\text{OH}^\bullet$  derivato da  $\text{O}_2^{\bullet-}$  reagisce con il Trp con  $k = 1.3 \times 10^{10} \text{ (L mol}^{-1} \text{ s}^{-1})$  (pH ~ 7, in acqua). Tutti questi dati indicano che le reazioni mediate dai ROS, che coinvolgono la fotosensibilizzazione dell'amminoacido, possono avvenire con eguale probabilità e lo studio di questi meccanismi in una proteina è piuttosto complesso. Le modificazioni

rilevanti dal punto di vista biologico avvengono mediamente attraverso un meccanismo di tipo II, mentre la via mediata direttamente dagli elettroni sembra essere la meno efficiente anche perché il potenziale di riduzione dell'amminoacido (1080 mV) è abbastanza alto [53].

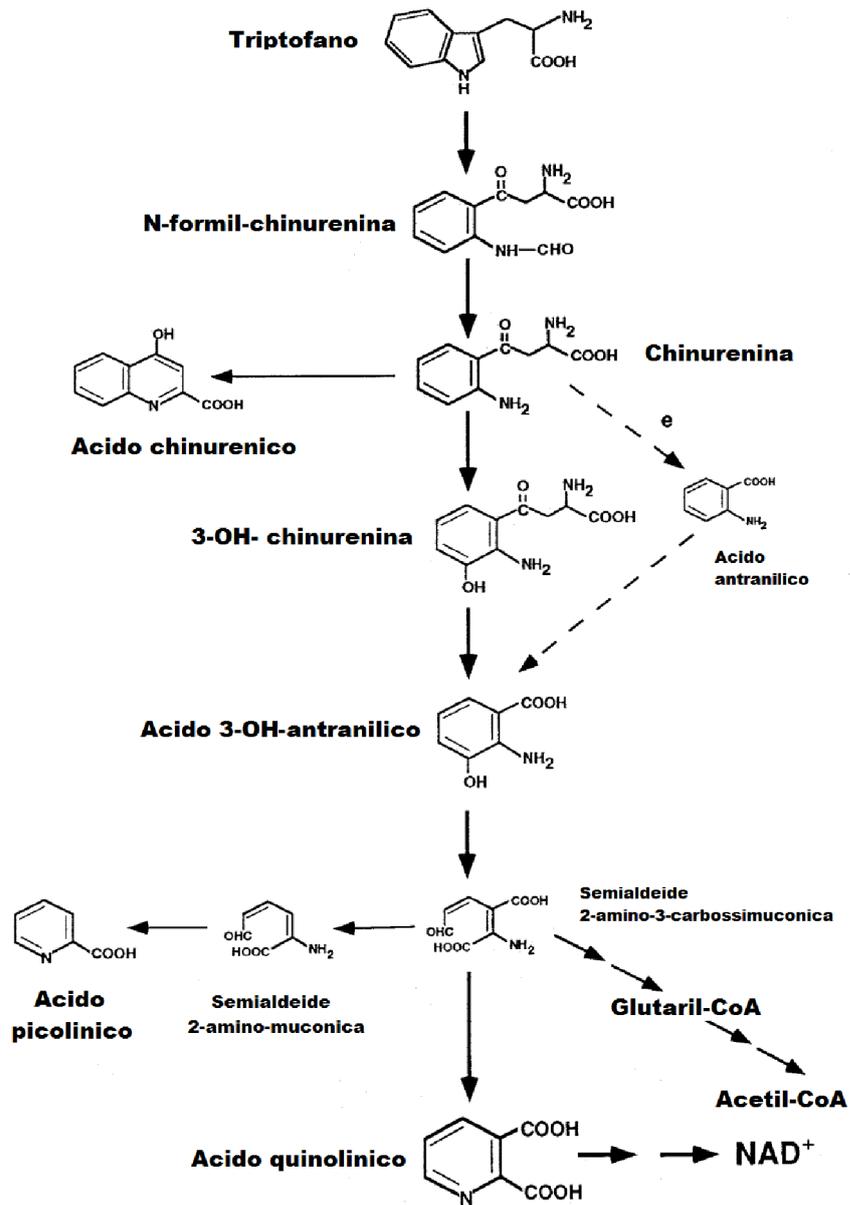
Se queste ossidazioni avvengono sui residui peptidici di importanti proteine come enzimi e fattori di regolazione del DNA, esse si rivelano citotossiche [54]. Queste caratteristiche fanno del Trp un efficace fotosensibilizzatore endogeno oltre che essere esso stesso uno dei target principali della fotosensibilizzazione sulle proteine indotta da vari agenti xenobiotici [55].

Addotti Trp-sensibilizzatore, crosslinking nelle proteine, N-formilchinurenina (massimo di assorbimento a 321 nm) e chinurenina (massimo di assorbimento a 358 nm) [48] sono tra i prodotti principali rinvenuti in vari processi dannosi sull'amminoacido. La N-formilchinurenina e la chinurenina sono anche noti metaboliti (si possono considerare dei biomarker per il danno ossidativo sul Trp) e si accumulano nel plasma in conseguenza a vari disordini metabolici e altre malattie. Quindi, la doppia natura di metabolita e di fotoprodotto accresce ulteriormente l'interesse per queste molecole.

## **5.2 Metaboliti e fotoprodotti del triptofano**

La fotochimica del Trp è stato oggetto di ricerca non solo perché è un aminoacido aromatico responsabile dell'assorbimento UVA di alcune proteine ma anche perché alcuni dei suoi fotoprodotti e derivati metabolici sono coinvolti in molte attività biologiche [56].

Il Trp viene metabolizzato principalmente in N-formilchinurenina e chinurenina (Schema 5.1) che sono anche fotoprodotti che si possono formare dopo fotosensibilizzazione indotta da agenti xenobiotici principalmente tramite fotossidazione (reazioni di tipo II).

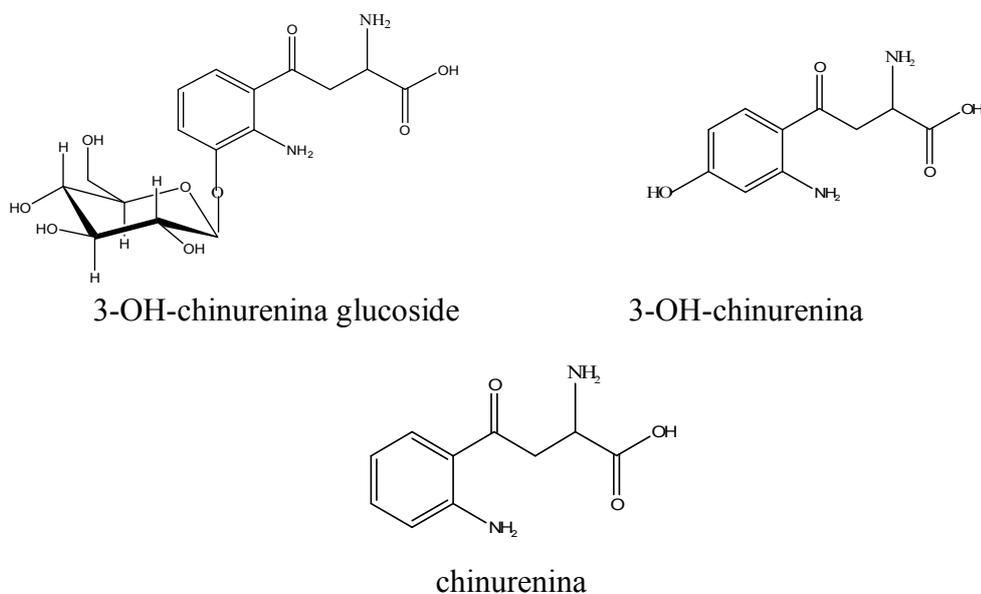


Schema 5.1: Metabolismo del Trp

Questi metaboliti si trovano in grandi quantità particolarmente dopo un'estensiva degradazione del Trp dovuta all'attivazione immunitaria cellulare concomitante ad eventi nocivi tipo infezioni, malattie autoimmuni, tumori, ecc. Quindi, specialmente in stati di attivazione immunitaria persistente, un aumento del catabolismo del Trp porta ad una diminuzione dei livelli del Trp libero nel plasma e ad un accumulo di chinurenina nel plasma; i

derivati della chinurenina sono neurotossici e possono portare a malattie neurodegenerative.

Questi metaboliti, insieme alla 3-OH-chinurenina possono essere usati come farmaci nella terapia di alcune malattie che richiedono un trattamento immunodepressivo come l'inibizione della risposta delle cellule T [57]. Inoltre mostrano una forte assorbanza tra 300 e 400 nm, proteggendo il cristallino e la retina dal danno indotto da UV. Fra questi "filtri UV" i più abbondanti sono la 3-OH-chinurenina glucoside, la chinurenina e la 3-OH-chinurenina Fig.5.1.



**Fig.5.1: Metaboliti del Trp agenti come filtro UV nell'occhio.**

Questi composti sono anche dei deboli fotosensibilizzatori; è stato dimostrato che a pH fisiologico deaminano spontaneamente le proteine del cristallino e le legano covalentemente [56] rendendole suscettibili alla fotossidazione da esposizione a luce con lunghezze d'onda che penetrano la cornea.

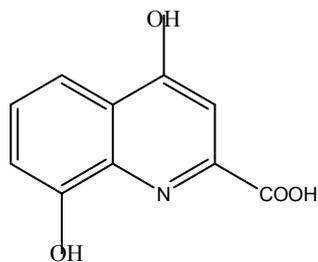
L'invecchiamento determina una ridotta sintesi del filtro naturale UVA, 3-OH-chinurenina glicoside, [58] e quindi una certa quota di radiazioni UVA può penetrare le fibre della lente.

La N-formilchinurenina è un sensibilizzatore fotodinamico che provoca l'inattivazione dell'anidrasi carbonica bovina [59] Questo metabolita inoltre può fotogenerare ROS ed è considerata un'importante specie fotosensibilizzante coinvolta nell'induzione fotochimica della cataratta [60].

La N-formilchinurenina si forma da una doppia ossidazione del Trp ed è stata accertata in proteine dopo un danno ossidativo. Si può formare dopo un attacco in posizione C-3 del Trp da parte dell'ossigeno reattivo, inoltre questo derivato può fungere a sua volta da fotosensibilizzatore o promuovere danni al target attraverso trasferimento di energia [61].

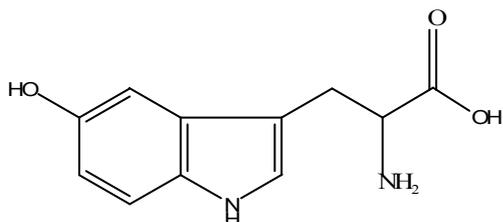
La chinurenina, un diretto precursore di 3-OH-chinurenina, è un prodotto di ossidazione secondaria del Trp che si forma dalla riduzione del gruppo formilico della N-formilchinurenina. Come la maggior parte dei derivati già discussi, la chinurenina è anche un metabolita ossidato; questo composto è anche capace di formare crosslinking con altri residui delle proteine ed è coinvolto in processi di invecchiamento. Alcuni studi hanno dimostrato che la 3-OH-chinurenina è una molecola instabile e in condizioni fisiologiche viene ossidata producendo  $H_2O_2$  [62]. La 3-OH-chinurenina è un prodotto di ossidazione della chinurenina. L'idrossilazione avviene in posizione C-3. In natura la 3-OH-chinurenina e la chinurenina sono precursori nella sintesi di pigmenti come l'ommatina e la xantommatina. La 3-OH-chinurenina è presente come filtro UV nell'occhio, dove può causare crosslinking nei residui delle proteine.

Recentemente un metabolita del Trp, l'acido xanturenico (Fig.5.2), è stato isolato dal cristallino umano con cataratta. Da tali studi è emerso che l'acido xanturenico può promuovere la fotossidazione delle proteine del cristallino attraverso la fotoproduzione di ossigeno singoletto e anione superossido [60]. L'acido xanturenico si può creare dalla 3-OH-chinurenina, inoltre, può fungere esso stesso da fotosensibilizzatore (tipo II) [51].



**Fig. 5.2 Struttura molecolare dell'acido xanturenico**

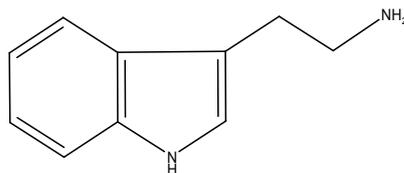
Il 5-OH-triptofano Fig. 5.3, insieme alle dioxinlolilalanina, oxindolilalanina, chinurenina, N-formilchinurenina, è un prodotto che si forma dall'ossidazione del Trp con  $H_2O_2$  per attacco all'anello indolico [61].



**Fig. 5.3 Struttura molecolare del 5-OH triptofano**

Il 5-OH-triptofano rappresenta il precursore della serotonina [63] ed è uno dei fotoprodotti del Trp coinvolti nel fotoingiallimento della lana [64]. A tale processo prendono parte anche altri fotoprodotti quali la triptamina, la oxindolilalanina, la chinurenina, la N-formilchinurenina e la 3-OH-chinurenina [65].

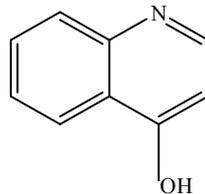
La triptamina Fig. 5.4 è un metabolita [66] che si può formare dalla decarbossilazione del Trp, ma è anche un fotoprodotto di tale aminoacido esposto a luce UVA-VIS.



**Fig.5.4 Struttura molecolare della triptamina**

Si ritiene che la triptamina abbia un ruolo di neuromodulatore e neurotrasmettitore nel sistema nervoso centrale dei mammiferi [67].

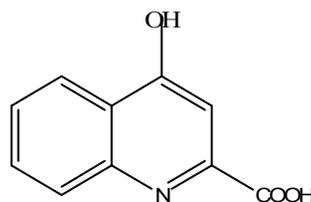
I prodotti 4-OH-chinolina Fig.5.5 e triptamina sono responsabili per il danno da radicali sul Trp. Infatti, è stato dimostrato che la 4-OH-chinolina si produce dalla chinurenina a causa dell'anione superossido attraverso reazioni che comprendono deamminazione e decarbossilazione [68].



**Fig. 5.5 Struttura molecolare della 4-OH-chinolina**

L'acido chinurenico Fig. 5.6 è un metabolita del Trp [69] sintetizzato e rilasciato dagli astrociti e agisce come antagonista endogeno dei recettori NMDA (N-metil-diaspartato) e  $\alpha$ -7 nicotinic. Un aumento del livello di acido chinurenico nel liquido cerebrospinale è stato riscontrato in caso di neurodegenerazione e di schizofrenia e sembra che sia coinvolto nel deficit di memorizzazione e dei processi cognitivi [70].

L'acido chinurenico si origina dalla via metabolica della degradazione della chinurenina [71] ed è stato identificato in seguito alla reazione dell'anione superossido con il Trp e si forma possibilmente attraverso una reazione di ciclizzazione.

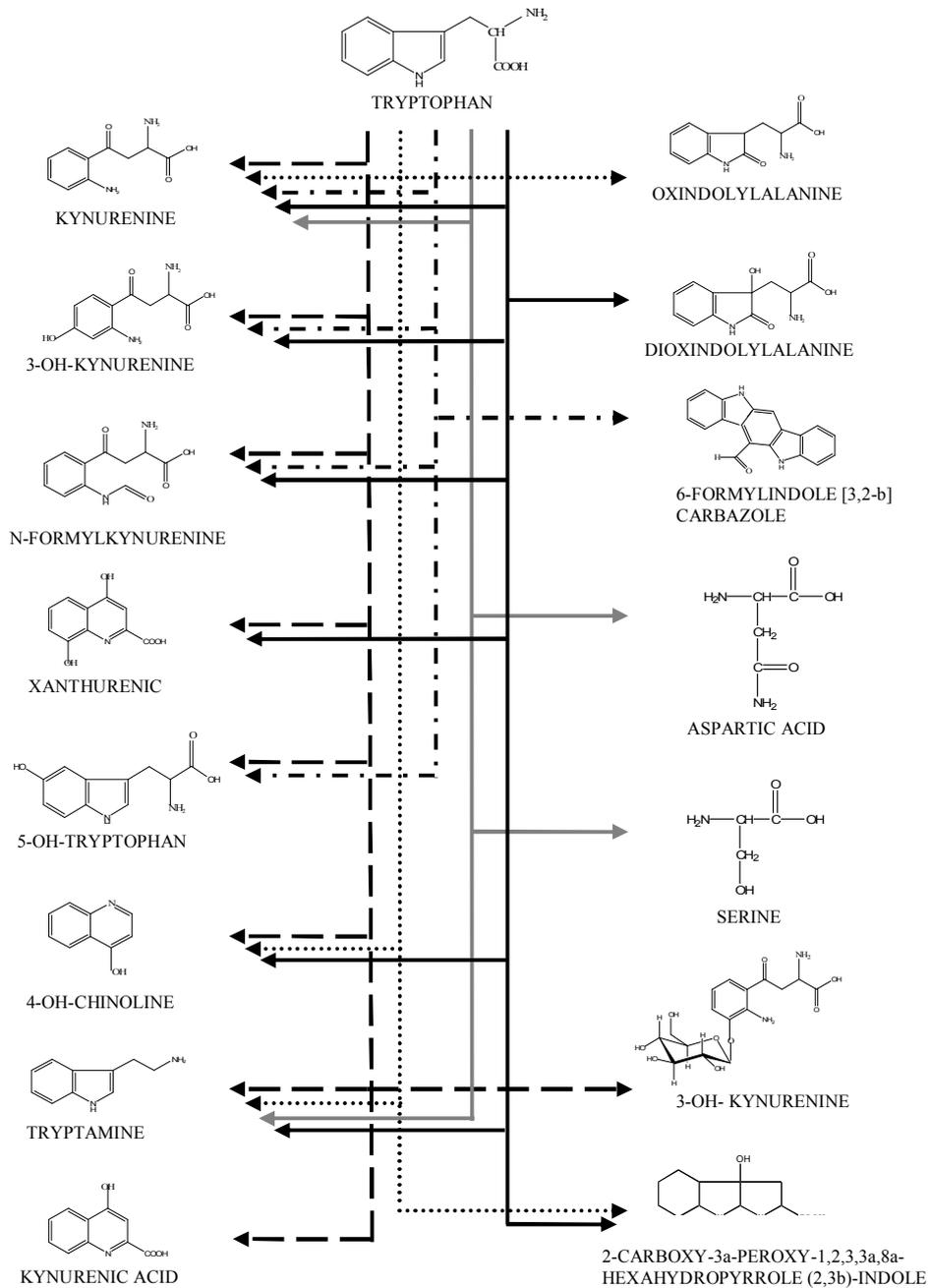


**Fig. 5.6 Struttura molecolare dell'acido chinurenico**

I bassi livelli di chinurenina che si formano nei campioni, probabilmente sono anche responsabili dell'inefficace generazione di questo acido. Inoltre si è

visto che irradiando il Trp con una lampada a mercurio (UVC) per 20 ore si formano serina, acido aspartico, alanina, e NH<sub>3</sub> [72].

Nello Schema 5.2 sono rappresentati alcuni metaboliti del Trp ed alcuni suoi fotoprodotti ottenuti per irradiazione diretta con UVA/VIS, UVB ed UVC. E' da notare che la maggior parte dei metaboliti del Trp coincide con i suoi fotoprodotti.



**Schema 5.2. Metaboliti (---) e fotoprodotti del Trp [irradiazione diretta UVA/VIS (.....), UVC (—), luce solare (— - —) e fotosensibilizzazione UVA/VIS (— — —)]**

### 5.3 Le proteine

Le biomolecole (ad esempio, proteine, acidi nucleici, lipidi insaturi e altri costituenti cellulari) possono subire vari cambiamenti in seguito ad irradiazione in presenza di fotosensibilizzatori. Nel caso delle proteine, le loro modificazioni fotoindotte possono portare ad alterazione della funzione biologica (es. inattivazione di enzimi, ormoni, ecc.) [73]. Alcuni farmaci possono comportarsi come fotosensibilizzatori causando modificazioni delle proteine che si pensa siano associati al verificarsi di fotoallergia e altri effetti indesiderati indotti dalla luce [74]. Altre proteine, come le porfirine, le flavine e alcune vitamine agiscono come cromofori endogeni e quindi, come fotosensibilizzatori nella pelle causando danno cutaneo [75]. Ovviamente, una dettagliata conoscenza dei siti attivi e dei meccanismi di reazione coinvolti potrebbe sicuramente contribuire a comprendere le potenzialità fotosensibilizzanti di nuovi farmaci. Purtroppo, le reazioni di fotosensibilizzazione delle proteine sono molto complesse, e ciò rende difficoltoso stabilire il loro corso [74].

Il BM agisce come un fotosensibilizzatore verso diversi target: nelle proteine induce danno via fotoossidazione [76].

È stato dimostrato come il BM è in grado di agire principalmente sui residui di Trp di una proteina. Questo avviene per trasferimento di energia dal BM tripletto all'ossigeno molecolare per produrre ossigeno singoletto [77]. Per questo motivo, la reattività dell'ossigeno singoletto è stata oggetto di molti studi per quanto riguarda le proteine [52] e aminoacidi [78].

In letteratura inoltre sono riportati diversi studi su diverse relazioni tra la degradazione fotoindotta del Trp e l'invecchiamento, le malattie della pelle, [75] danni delle proteine del cristallino [79] e ingiallimento della lana [75]. Questi eventi sono mediati da una serie di perossidi (idroperossidi ed

endoperossidi). Questi ultimi possono poi reagire con radicali liberi fotogenerati [80].

#### **5.4 Fotossidazione delle proteine**

I ROS possono reagire con tutte le molecole biologiche, inclusi acidi nucleici, lipidi e proteine. Comunque, proprio per la loro abbondanza nei sistemi biologici, le proteine sono il principale target di ossidazione [81]. La fotoossidazione delle proteine indotta dalla luce UV è coinvolta in diversi processi degenerativi come danno ai capelli, invecchiamento, cancerogenesi, perdita di attività enzimatiche, opacizzazione del cristallino [82].

Le proteine sono altamente suscettibili alle ossidazioni di conseguenza esse vengono danneggiate dai ROS. Questo è dovuto, in parte, alla loro abbondanza nelle cellule ma anche al fatto che loro includono cromofori come aminoacidi aromatici che assorbono nella regione 250-320 nm.

Infatti, la maggior parte delle molecole presenti nel tessuto animale non assorbe efficacemente la luce solare, questo perché esse assorbono nella regione dell'UV che rappresenta una bassa percentuale della luce solare [83] ed ha un basso potere di penetrazione [84]. La maggior parte dei 20 aminoacidi che compongono le proteine dei vari organismi non assorbono UVA o VIS, solo il Trp, la tirosina e un po' meno la fenilalanina assorbono luce UVB. Questi, infatti, sono i responsabili del caratteristico assorbimento delle proteine nella regione intorno ai 270-280 nm. Durante l'esposizione all'UV o alla luce visibile possono avvenire due principali tipi di processi. Il primo di questi processi coinvolge la fotoossidazione diretta dovuta all'assorbimento dell'UV da parte della proteina o gruppi cromofori ad essa legati, generando lo stato eccitato o radicali per fotoionizzazione. Il secondo processo comprende l'ossidazione indiretta della proteina attraverso la formazione e la conseguente reazione dell'ossigeno singoletto generato

attraverso il trasferimento di energia all'ossigeno molecolare da cromofori [85]. Il principale ROS prodotto nella cellula attraverso l'UVA è l'ossigeno singoletto. Di conseguenza, i maggiori danni fotoindotti alle proteine sono mediate dall'ossigeno singoletto [86].

L'istidina, la metionina, la cisteina, la tirosina e il Trp reagiscono con l'ossigeno singoletto a pH fisiologico [85]. La reazione dell'ossigeno singoletto con le proteine può determinare molteplici effetti che includono le ossidazioni delle catene laterali, la frammentazione, la dimerizzazione/agggregazione, cambiamenti conformazionali e inattivazione enzimatica. Questi danni sembrano giocare un ruolo chiave nello sviluppo di cataratte, eritemi e di alcuni tumori alla pelle [87, 88].

Tirosina e Trp sono i due aminoacidi più suscettibili alla fotoossidazione sensibilizzata dall' $^1\text{O}_2$ . Essi rappresentano siti importanti del danno fotoossidativo delle proteine [72, 89]. L'ossidazione fotosensibilizzata di proteine e dipeptidi è stata molto studiata [72,89,90]. In alcuni casi si è riscontrato che la fotoossidazione di questi aminoacidi e dipeptidi si svolgeva attraverso una combinazione dei due tipi di meccanismi (tipo I e II) [91].

I residui di cisteine nelle proteine sono tra i principali target di ossidazione e possono andare incontro ad alterazioni redox reversibili e irreversibili in risposta ai ROS. Sono stati descritti diversi stati di ossidazione della cisteina. Il gruppo sulfidrilico (-SH) delle cisteine può essere ossidato reversibilmente ad acido sulfenico (-SOH) o formando ponti disolfuro (-S-S-) intra- e intercatena polipeptidica, ma può anche essere ossidato irreversibilmente ad acido sulfinico (-SO<sub>2</sub>H) e sulfonico (-SO<sub>3</sub>H) [92].

La formazione di ponti disolfuro tra i gruppi sulfidrilici e l'abbondante tripeptide glutatione (GSH), una modificazione proteica detta S-glutationilazione (proteina-SSG), ha ricevuto particolare attenzione negli ultimi anni come potenziale meccanismo per la regolazione post-traslazionale di una varietà di proteine regolatorie, strutturali e metaboliche, sia in processi

normali che patologici [93-96], e per la protezione delle proteine contenenti tioli dall'ossidazione irreversibile [97]. Per proteggere le cellule da questi tipi di ossidazione, la cellula possiede due sistemi, la tioredoxina (Trx) e la glutaredoxina (Glrx or Grx) [98,99]. Le cellule di Mammifero contengono due Trx localizzate nel citoplasma/nucleo (Trx1) e nel mitocondrio (Trx2), e tre Grx localizzate nel citoplasma (Grx1), nel mitocondrio/nucleo (Grx2) e nei mitocondri (Grx5) [99]. Tutti i membri delle famiglie Trx e Grx, ad eccezione di Grx5, catalizzano la riduzione reversibile dei ponti disolfuro [99]. Inoltre i Trx sono le principali ossidoriduttasi che catalizzano la riduzione del ponte disolfuro nelle proteine, le Grx promuovono in maniera efficiente e specifica la deglutationilazione dei sistemi proteina-SSG [100,101].

L'ossidazione di proteine contribuisce al pool di enzimi danneggiati che tende ad aumentare durante l'invecchiamento e i vari stadi patologici.

L'incremento delle proteine ossidate dipende dall'età e può determinare l'accumulo di DNA non riparato che, in un modo casuale, influisce nelle concentrazioni o attività di numerosi fattori che regolano la velocità di ossidazione delle proteine e la degradazione delle proteine ossidate [102].

Un esempio è rappresentato dai danni ossidativi causati dal perossinitrito, che può indurre la nitratura delle tirosine: la misura dei livelli di nitrotirosine è utilizzata come indice di tali danni (ROS).

Inoltre molte proteine legano gruppi prostetici come le flavine e il gruppo eme che assorbono nel range dell'UVA-Vis. Per esempio, la catalasi, un importante enzima antiossidante, contiene un gruppo eme ed è molto suscettibile all'UVA [103]. La catalasi e l'HRP perossidasi, sono enzimi che presentano il caratteristico assorbimento delle proteine eme, non mostrano nessun cambiamento nella loro attività enzimatica dopo essere state irradiate in soluzioni di tampone fosfato a pH=7 [104]. Lo stesso vale anche per il lisozima [104]. Questo significa che per indurre modificazioni indirette su queste molecole con la luce VIS sono necessari particolari

fotosensibilizzatori. Un fotosensibilizzatore endogeno è la riboflavina (RF), un componente del complesso vitaminico B2 essenziale in tutti gli organismi viventi (FMN, FAD) nelle cellule aerobiche. Lo studio delle biomolecole fotomodificate da RF ha molta importanza perché queste reazioni possono avvenire in differenti sistemi esposti alla luce VIS come nelle colture di cellule, negli alimenti, e in vivo nei tessuti come la pelle e la lente oculare [105,106]. L'irradiazione a 452 nm dell'enzima catalasi in presenza di RF produce una lieve riduzione dell'attività dell'enzima, ma più pronunciata rispetto a quella in presenza di BM [107]. Questi effetti però aumentano se l'esperimento viene effettuato in D<sub>2</sub>O poiché aumenta in tempo di vita dell'<sup>1</sup>O<sub>2</sub>. In molti esperimenti si è visto che il BM dà fotosensibilizzazione di tipo II [84]; in D<sub>2</sub>O inoltre l'effetto è notevolmente amplificato. Da altri studi si è visto che il lisozima irradiato in presenza di RF subisce danni sul Trp, tirosina e istidina. Ed è per questo che la luce visibile induce fotoossidazione negli aminoacidi e nelle vitamine presenti negli infusi per la nutrizione parenterale [108,109]. L'ascorbato presente in una miscela multivitaminica esercita un effetto protettivo sugli aminoacidi per un tempo limitato cioè fino a quando tutto l'ascorbato presente in soluzione non viene consumato, dopo di che gli aminoacidi vengono fotoossidati [110]. Dati riportati in letteratura dimostrano che questi aminoacidi modificati (fotoprodotti) in vitro possono indurre apoptosi [111].

Le reazioni tra le molecole proteiche e i ROS spesso determinano modificazioni di alcuni aminoacidi formando derivati carbonilici. La carbonilazione delle proteine spesso è stata utilizzata per la quantificazione dell'ossidazione delle proteine. Oltre la carbonilazione, altri tipi di danno ossidativo possono essere investigati. Queste modificazioni possono dare origine a cross-linking, frammentazione e conversione di un aminoacido in un altro. Altre modificazioni possono alterare la struttura secondaria e terziaria della proteina e questo cambiamento di conformazione può esporre particolari

regioni all'ossidazione o altri tipi di modificazione come la deaminazione [112].

### **5.5 L'Albumina Sierica Bovina purificata (BSA)**

L'Albumina è una delle proteine maggiormente studiate ed è la più abbondante proteina plasmatica. Nei mammiferi l'albumina è sintetizzata inizialmente come prealbumina. In seguito alla rimozione del peptide segnale si ha la proalbumina che è ulteriormente processata con rimozione del sesto residuo dalla nuova terminazione amminica. Rilasciata nel circolo sanguigno ha una vita media di 19 giorni [113].

La sua massiccia presenza all'interno del circolo sanguigno la rende il principale target delle fotossidazioni.

Per quanto riguarda la sua struttura tridimensionale basandosi su esperimenti idrodinamici [114-116] e diffusione di raggi X a piccoli angoli [117], è stato ipotizzato che l'albumina avesse forma di elissoide schiacciata con dimensioni di  $140 \times 40$  armstrong. Ulteriori esperimenti hanno supportato queste dimensioni [118, 119].

Brown and Shockley [120] sono arrivati alla costruzione di un modello di albumina avente forma di sigaro. Studi con  $^1\text{H}$  NMR hanno però indicato che una struttura elissoide schiacciata è improbabile; perciò fu proposto un modello con struttura a forma di cuore [121].

Questo modello era in accordo con i dati raccolti dagli esperimenti mediante cristallografia a raggi X. Precedenti studi indicavano che la struttura secondaria contenesse circa 68-50% di alfa elica e il 16-18% di foglietto beta laminare [122-124]. Gli studi effettuati con cristallografia a raggi X negavano la presenza di foglietto beta nella struttura dell'albumina nativa. Riley and Arndt [125,126] suggerirono che l'albumina bovina termicamente denaturata

ha probabilmente lo stesso fondamentale tipo di ripiegamento della catena polipeptidica nativa, nella quale il 55% è  $\alpha$ -elica e il 45% assume con formazione casuale negli studi con diffrazione ai raggi X.

L'Albumina Sierica Bovina (BSA) (BSA 66,4 kDal) è caratterizzata dalla presenza, nella sua struttura primaria, di due residui di Trp [127], responsabili, insieme alla Tirosina e la Fenilalanina, delle proprietà fluorescenti della proteina.

La capacità della BSA di legare i composti aromatici e eterociclici è dovuta alla presenza di due principali regioni di legame, chiamate siti Sudlow I e II, che sono localizzate rispettivamente all'interno di cavità specializzate nei subdomini IIA e IIIA. I due residui di Trp, Trp-134 e Trp-212 sono topograficamente distinti in quello localizzato sulla superficie nel più esposto loop 3 (subdominio IA) e uno nella parte interna dentro una tasca idrofobica nel loop4 (subdominio IIA) [127, 128]. Quest'ultima è una cavità di legame ben caratterizzata per il caricamento di piccole molecole aromatiche [129] e fa sì che la BSA aumenti la solubilità dei farmaci idrofobici nel plasma e controlli la loro distribuzione alle cellule [130].

**In questa tesi è stata presa in esame come modello l'Albumina Sierica Bovina purificata per la fotosensibilizzazione indotta su proteine isolate. La scelta è stata motivata dall'importanza biologica di questa proteina, per il suo basso costo, la facile reperibilità, le buone proprietà di legame. Inoltre numerosi studi sono concordi con il fatto che l'Albumina umana (Fig.5.6) e bovina siano proteine omologhe [111].**

La sua funzione fisiologica principale è quella di trasportare gli acidi grassi, sebbene essa leghi una grande varietà di composti, sia endogeni (acidi, bilirubina, Trp, steroidi) che esogeni (anestetici, farmaci).

Le albumine sieriche spesso provocano un aumento della solubilità dei farmaci idrofobici nel plasma e modulano il loro rilascio nelle cellule sia in vitro sia in vivo; esse giocano un ruolo dominante nell'efficacia del farmaco

stesso [131]; contribuisce all'80% della pressione osmotica colloidale sanguigna [132] ed è inoltre responsabile del mantenimento del pH sanguigno [133].

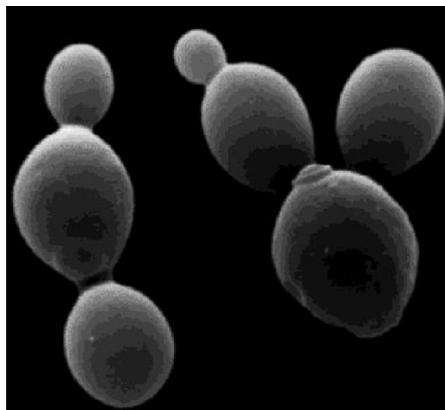


**Fig. 5.6:** Struttura cristallografica ai raggi X dell'albumina sierica umana (HSA).

## 5.6. Il lievito *Saccharomyces cerevisiae*

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, comunemente utilizzato per la produzione della birra e del pane, è uno dei microrganismi eucariotici ideali per gli studi biologici (Fig.5.7); infatti, cresce facilmente in laboratorio ed è un organismo estremamente utile per lo studio dei fenomeni genetici.

Le cellule di lievito esibiscono una grande diversità nella dimensione, forma e colore. In genere hanno una forma ellissoidale. Il volume medio di una cellula è di 29 o 55  $\mu\text{m}^3$  rispettivamente per le cellule aploidi e diploidi. La cellula di lievito è rivestita da una capsula costituita da 3 strati: membrana plasmatica, spazio periplasmatico e la parete cellulare. Questo involucro ha la funzione di controllare le proprietà osmotiche e permeabilità della cellula. Se la cellula di lievito è trattata con enzimi litici, la parete viene rimossa e si forma lo sferoblasto che al microscopio appare con una struttura globulare. La formazione degli sferoblasti è spesso usata per facilitare l'isolamento dei componenti subcellulari.



**Fig.5.7:** Il lievito *Saccharomyces cerevisiae*

Si tratta di un microrganismo unicellulare il cui genoma si divide in 16 cromosomi. Il ciclo cellulare si alterna in fasi aploidi e diploidi.

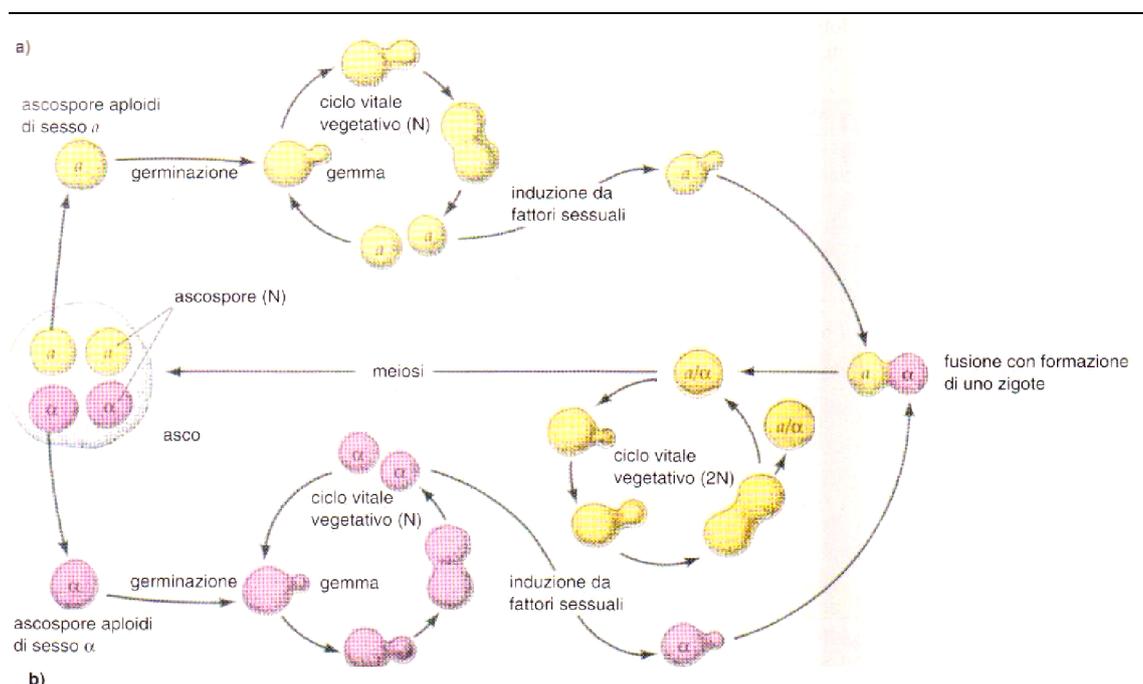
Nel lievito esistono due tipi sessuali,  $\alpha$  ed  $a$ , determinati geneticamente e che possono essere considerati l'analogo della cellula maschio e femmina. Tuttavia, i due tipi sessuali sono simili in struttura e possono essere differenziati solo attraverso l'accoppiamento.

La cellula vegetativa aploide di questo organismo si riproduce per mitosi e la nuova cellula deriva dalla cellula madre per gemmazione. La fusione di una cellula  $a$  con una cellula  $\alpha$  (e solo questo è l'accoppiamento possibile) produce una cellula diploide, stabile e che si riproduce anch'essa per gemmazione (ciclo vitale vegetativo  $2N$ ) (Fig.5.8).

In condizioni di carenza di azoto le cellule  $a/\alpha$  sporificano, cioè vanno incontro a meiosi. I quattro prodotti meiotici aploidi di una cellula diploide, le ascospore, sono contenuti in un asco approssimativamente sferico. Due di queste ascospore sono di tipo sessuale  $a$  e due sono di tipo sessuale  $\alpha$ .

Quando l'asco è maturo le ascospore vengono rilasciate e germinano producendo cellule vegetative aploidi (ciclo vitale vegetativo  $N$ ).

Su terreno solido ogni ascospora da luogo ad una colonia visibile.



**Fig.5.8: Ciclo vitale *Saccharomyces cerevisiae***

Il lievito è un organismo che cresce velocemente e la sua manipolazione è relativamente facile. Il *Saccharomyces cerevisiae* esibisce molte similitudini con gli eucarioti superiori nei meccanismi molecolari dei processi cellulari più importanti come trascrizione, traslazione, replicazione e riparazione del DNA. Questo organismo semplice possiede omologhi o analoghi funzionali delle sostanze coinvolte in questi processi, praticamente si avvicina di molto alle cellule umane [134]. Ma a differenza di queste il lievito è un sistema modello molto studiato, il cui genoma è stato da tempo sequenziato. Per queste ragioni, esso è divenuto uno strumento potente per studiare le cellule eucariotiche e per valutare il potenziale mutagenico di molte sostanze chimiche [135, 136]. Riguardo la fotosensibilizzazione, il lievito è risultato un valido modello [137].

### **5.7. Fibroblasti umani**

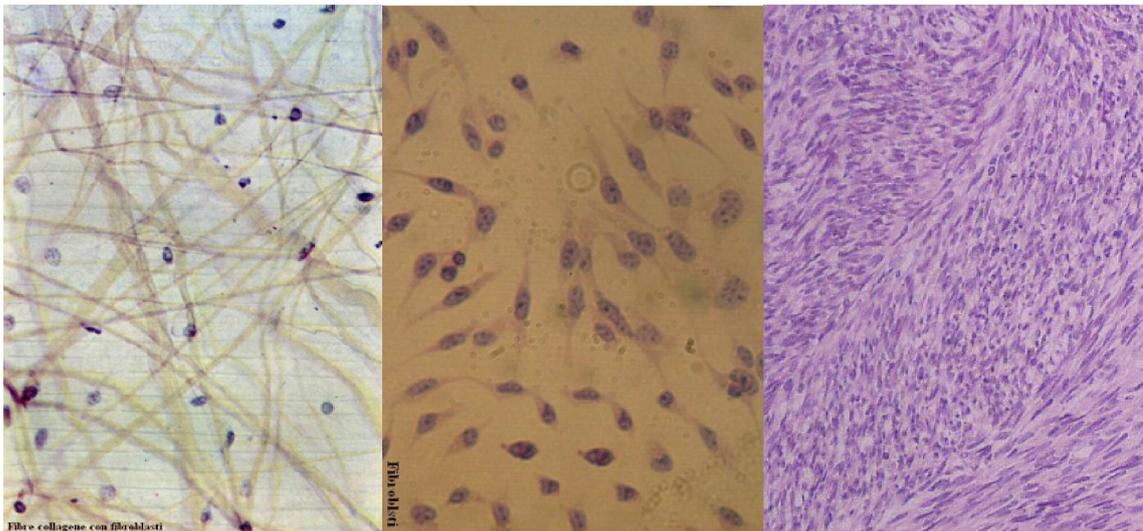
I fibroblasti sono cellule tipiche e più numerose del tessuto connettivo, in grado di produrre le componenti della matrice extracellulare. Hanno un citoplasma vacuolizzato che circonda un nucleo ellittico con uno o due nucleoli. I fibroblasti attivi si riconoscono dall'abbondante reticolo endoplasmatico. I fibroblasti inattivi, chiamati anche fibrociti, sono più piccoli ed allungati, inoltre hanno un reticolo endoplasmatico ridotto.

La funzione principale dei fibroblasti è quello di mantenere l'integrità strutturale del tessuto; sono deputati ad elaborare gli elementi costitutivi delle fibre collagene ed elastiche nonché i proteoglicani e le glicoproteine della sostanza fondamentale amorfa. Durante la crescita i fibroblasti si dividono e sintetizzano le sostanze di base. Un danno ai tessuti stimola i fibroblasti e ne induce la mitosi.

I fibroblasti possono dare origine ad altre cellule come le cellule ossee, gli adipociti e cellule muscolari, tutte di origine mesodermica. Si trovano anche

nel tessuto cicatriziale, possiedono; infatti una modesta capacità migrante e possono intervenire nella cicatrizzazione.

I fibroblasti non hanno una forma caratteristica ed è difficile distinguerli dagli altri tipi cellulari. Sono spesso disposti lungo i fasci di fibre collagene ed appaiono come elementi fusati con nucleo allungato; in altre sedi presentano forma stellata con numerosi prolungamenti (Fig.5.9).



**Fig.5.9. esempi di fibroblasti morfologicamente diversi.**

I fibroblasti sono cellule fisse ma in talune circostanze possono presentare modeste proprietà migranti.

A differenza delle cellule epiteliali che rivestono le strutture del corpo, i fibroblasti non formano monostrati piatti e non sono limitati da un attacco polarizzante di una lamina basale su un lato.

# **PARTE SPERIMENTALE**

## 6. MATERIALI E METODI

### 6.1 Reagenti

Il NAP, il BM, il Trp, la BSA, chinurenina, 3-OH-chinurenina, 5-OH-triptofano, triptamina, 4-OH-chinolina, acido xanturenico, acido chinurenico, acqua deuterata (D<sub>2</sub>O), Proteasi E tipo XIV da *Streptomyces griseus*, Carbossipeptidasi A da pancreas bovino, il terreno di coltura YPD sono stati acquistati dalla Sigma Chemical Company. Tutti i solventi per HPLC sono di grado analitico. I tamponi PB e PBS sono stati regolati a pH 7,4 con NaOH concentrato.

### 6.2 Condizioni d'irradiazione.

L'irradiazione di tutti i campioni, a eccezione di quella dei fibroblasti, è stata eseguita con un reattore fotochimico Rayonet equipaggiato con 8 lampade al fosforo "black light" aventi il seguente range d'emissione: UVA (310-390 nm) con un massimo a 350 nm. Per la fotosensibilizzazione del Trp e della BSA è stato utilizzato un apparato di irradiazione del tipo *merry go round* per assicurare che tutti i campioni ricevessero contemporaneamente uguale radiazione. Le reazioni sono state condotte in cuvette spettrofotometriche di quarzo con percorso ottico di 10 mm. Le cellule di lievito, invece sono state irradiate in un vessel di 200 ml di quarzo. Il flusso fotonico incidente su una soluzione di 3 ml contenuta in una cuvetta è circa  $3 \times 10^{16}$  fotoni s<sup>-1</sup>, in ogni caso, dello stesso ordine di quello della radiazione solare incidente sulla pelle e con tale radiazione sono stati eseguiti tutti gli esperimenti di fotosensibilizzazione. L'intensità della luce (radiazione policromatica) è stata misurata per mezzo di un attinometro all'ossalato ferrico o un radiometro digitale Spectroline Mod. DRC-100X, equipaggiato con dei sensori adatti per le diverse regioni spettrali.

I fibroblasti, invece, sono stati irradiati con una dose di  $0.1 \text{ kJ/m}^2/\text{sec}$  usando una lampada UVA 5000W Mutzhas SUPERSUN (Munich, Germany).

### **6.3 Strumentazione**

Le analisi cromatografiche HPLC sono state fatte con un HP (Hewlett-Packard) 1100 equipaggiato con uno spettrometro di massa (MSD) modello G 1946A VL (Agilent) dotato di interfaccia API-ES, un rivelatore a serie di diodi (DAD) modello G1315A e un detector fluorescente SFM (FLD, Kontron). Gli spettri UV/VIS sono stati registrati: con uno spettrofotometro a diodi Hewlett-Packard modello 8452 A. La fluorescenza allo stato stazionario è stata ottenuta utilizzando uno Spex Fluorolog-2 (modello F-111).

La concentrazione intracellulare dei ROS nei fibroblasti e la progressione del ciclo cellulare sono state determinate usando un citofluorimetro FACSCalibur (Becton Dickinson).

## **7. Esperimenti di fotosensibilizzazione**

### **7.1 Trp.**

Il Trp si diluisce ad una concentrazione finale di  $50 \text{ M}$  con BM  $30 \text{ }\mu\text{M}$  o con NAP  $300 \text{ }\mu\text{M}$  in tampone PB pH 7,4. Si preparano vari campioni della soluzione sensibilizzatore-amminoacido di volume  $3 \text{ mL}$  in cuvette di quarzo e si irradiano a vari tempi e secondo le condizioni descritte precedentemente. Poi aliquote di questi si iniettano in HPLC.

### **7.2 BSA.**

La BSA si diluisce ad una concentrazione finale di  $100 \text{ }\mu\text{M}$  con NAP  $900 \text{ }\mu\text{M}$  o BM  $100 \text{ }\mu\text{M}$  in tampone PBS a pH = 7,4. I campioni di volume  $3 \text{ ml}$  in

cuvette di quarzo si irradiano con diverse dosi secondo le condizioni descritte precedentemente.

Una volta irradiati, i campioni saranno sottoposti a idrolisi.

**7.2.1 Recupero del Trp dal BSA.** Per la determinazione della fotodegradazione dei residui di Trp della BSA è stato necessario idrolizzare la proteina. Una molecola di BSA contiene 2 residui di Trp quindi da una soluzione 100  $\mu$ M di BSA si dovrebbe ottenere, considerando un recupero ottimale del 100%, una soluzione 200  $\mu$ M di Trp. Per isolare il Trp dalla proteina sono stati utilizzati due tipi di idrolisi: basica e enzimatica.

**Idrolisi basica.** Dopo irradiazione i campioni vengono trasferiti in vial e sono stati aggiunti 425  $\mu$ l di NaOH (16 M) per avere nel campione una concentrazione finale di 2 M NaOH.

I campioni vengono messi in stufa a 100°C fino a un massimo di 5 ore e successivamente portati a pH 7 utilizzando HCl. In seguito vengono centrifugati a 3500 rpm per 5 minuti per recuperare il surnatante. Dopo tale trattamento è possibile effettuare un'analisi cromatografica del campione.

**Idrolisi enzimatica.** Dopo irradiazione si può recuperare il Trp dalla BSA tramite idrolisi enzimatica. Gli enzimi usati sono Proteasi E, Carbossipeptidasi. Ad 1ml di campione sono stati aggiunte 6 U di proteasi e lasciate agire a 37 °C per 24 h. Successivamente sono state aggiunte 6 U di carbossipeptidasi e lasciate agire per 5 minuti a 25 °C.

### **7.3 *Saccharomyces cerevisiae.***

L'organismo si fa crescere in bioreattore da 300 ml sotto una cappa a flusso laminare (Bio, Faster). Il reattore riceve un costante flusso di aria sterile che provvede anche all'agitazione del medium. Per evitare la fotoattivazione del lievito, questo si coltiva sempre al buio. Il *Saccharomyces cerevisiae* si fa crescere (a circa 30°C) in terreno di coltura YPD liquido fino a raggiungere il

numero cellulare prefissato, ma in ogni caso non più di 5 giorni nello stesso terreno di coltura. Il numero di cellule si determina spettrofotometricamente, dato che la densità ottica della soluzione con  $OD_{600}=0,1$  equivale a  $3 \times 10^6$  cellule/ml (a  $OD_{600} < 1$ ).

**7.3.1 Incubazione con i fotosensibilizzatori.** Il contenuto del bioreattore viene trasferito in provettoni e centrifugato a 3000 g per 5 minuti. Il natante viene scartato e il pellet di cellule si concentra in un unico contenitore dove viene lavato per due volte con 80 ml PBS e centrifugato ottenendo un pellet bianco: le cellule si conservano in frigo.

In seguito, si prepara il campione che consiste di una sospensione cellulare in PBS con  $OD_{600}=0,635$  ( $1,9 \times 10^7$  cellule/ml) a cui si aggiunge il farmaco in modo da ottenere una concentrazione finale di 900  $\mu$ M di NAP o 100  $\mu$ M di BM. Ogni campione ha volume finale di 200 ml. I campioni vengono incubati per 1 ora a 37°C. Quindi questi si centrifugano e si rimuove il natante. Il pellet si lava due volte con 30 ml PBS e si centrifuga (rimozione farmaco extracellulare). Le cellule si sospendono in un vessel di quarzo con 200 ml PBS.

**7.3.2 Irradiazione.** I campioni si irradiano con 8 lampade ( $1000 \mu$ W/cm<sup>2</sup>) in un vessel di quarzo sotto agitazione (circa 300 giri/min.). Subito dopo si preleva dal vessel 1 ml, il quale servirà per i test di sopravvivenza cellulare e si conserva in freezer. La restante parte di cellule sarà utilizzata per la determinazione quantitativa del Trp e dei suoi fotoprodotti.

**7.3.3 Sopravvivenza cellulare.** 10  $\mu$ l di campione vengono portati ad 1 ml con PBS e 100  $\mu$ l di questa soluzione vengono utilizzati per il seeding su piastre di Petri (35 mm) contenenti YPD agar. Le piastre si incubano sotto cappa per alcuni giorni a circa 25 °C.

**7.3.4 Determinazione Trp.** I pellet ottenuti dopo l'irradiazione vengono trattati con 1000 unità di liticasi per 2 ore a temperatura ambiente e successivamente sottoposti a idrolisi enzimatica e/o basica come riportato per la BSA. Dopo centrifugazione, aliquote dei campioni vengono iniettati in HPLC.

## **7.4 Analisi HPLC**

La fotodegradazione del BM, del NAP e del Trp è stata seguita e quantificata attraverso cromatografia HPLC/DAD (Diod Array Detector)/ FLD (Fluorimeter Detector)/ MSD (Mass Detector), in modo analogo sono stati osservati i fotoprodotto di fotodegradazione.

**7.4.1 Cromatografia HPLC: sistema I** Il NAP e diversi fotoprodotto sono stati quantificati eluendo in gradiente (0-10 min.=55% MeOH; 10-30 min.=100% MeOH; 30-40min.=10% MeOH), dato che nelle condizioni analitiche descritte sotto non è possibile separare il NAP o i suoi fotoprodotto. Per queste misure è stata usata la colonna colonna Lichrosphere RP-18 a fase inversa (250x4.6; 5 µm; 100 Å), eluendo con tampone formiato d'ammonio (0,1 M, pH 3) ad un flusso di 1 mL/min. Lo spettrometro API-ES-MS è stato regolato, per misure quantitative con SIM positive ion mode (231+ per NAP; 205+ per Trp) e per misure qualitative con SCAN positive ion mode (100<sup>+</sup>-500<sup>+</sup> e frammentatore in gradiente); il gas del nebulizzatore e curtain gas 60 psig rispettivamente 13 l/min. di azoto a 350 °C, voltaggio del capillare 3,5 kV e frammentatore 100V. Il detector UV è stato posto a 292 nm, mentre la determinazione fluorimetrica è stata eseguita eccitando a 330 nm e seguendo l'emissione a 400 nm.

**7.4.2 Cromatografia HPLC: sistema II** Per i derivati del Trp come la 3-OH-chinurenina, si utilizza un sistema cromatografica diverso, capace di

identificare le sostanze dell'ordine di  $10^{-9}$  M. Quindi, aliquote di 20  $\mu$ l si iniettano in una colonna Hypersil ODS (5  $\mu$ m, 4 mm ID x 14 cm) protetta da una precolonna dello stesso tipo (20 x 4,6 mm). L'eluizione si esegue in isocratica con tampone SOS/MeOH (90/10). Il tampone SOS che si porta con acido fosforico a pH=3 è composto nel seguente modo: 50 mM citrato di sodio, 50 mM fosfato di sodio, 40 mg/l EDTA e 100 mg/l sale sodico dell'acido 1-octansulfonico. Il DAD registra le tracce a 280 nm, 300 nm, 320 nm, 360 nm e 380 nm. Il rivelatore elettrochimico si setta nel seguente modo: guard cell 800 mV, det.1 100 mV, det.2 700 mV, response time 0,1 s e gain  $10 \times 10$ .

**7.4.3 Cromatografia HPLC: sistema III** Per l'analisi cromatografica è stata usata una colonna Lichrosphere RP-18 RP-18 descritta sopra, eluendo in gradiente (0-1 min.=10% ACN; 1-13 min.=50% ACN; 13-28min.=10% ACN) con tampone acido pentansulfonico/acetato d'ammonio (5 mL acido acetico glaciale, 5 mL ammoniaca 14,8 M e una ampolla (15 ml) acido pentansulfonico 0,33 M aggiunti ad 1 L di acqua) e ACN, con un flusso di 1 mL/min. Il detector UV è stato posto a 668 nm per BM e 280 nm per Trp, mentre la determinazione fluorimetrica è stata eseguita eccitando a 278 e 660 nm e seguendo l'emissione a 356 e 680 nm rispettivamente per Trp e BM. Lo spettrometro di massa (MSD) si regola in positive SCAN mode (100-500) o in SIM mode ( $284^+$  per BM).

**7.4.4 Cromatografia HPLC: sistema IV** Il Trp e rispettivi fotoprodotti sono stati quantificati eluendo in isocratica. Per queste misure è stata usata la colonna RP-18 descritta sopra, eluendo in isocratica con  $H_2O/ACN$  (90/10) ad un flusso di 1 mL/min. Lo spettrometro API-ES-MS è stato regolato, per misure quantitative con SIM positive ion mode ( $321^+$  per un adotto del BM;  $205^+$  per Trp) e per misure qualitative con SCAN positive ion mode ( $100^+$ - $500^+$  e frammentatore in gradiente); il gas del nebulizzatore e curtain gas 60 psig rispettivamente 13 L/min. di azoto a 350 °C, voltaggio del

capillare 3,5 kV e frammentatore 100V. Il detector UV è stato posto a 280 nm per Trp, mentre la determinazione fluorimetrica di Trp è stata eseguita eccitando a 278 nm e seguendo l'emissione a 356 nm.

## **7.5 Sintesi della N-formilchinurenina**

La N-formilchinurenina è stata sintetizzata utilizzando una variazione di metodo pubblicato [179]. 0,75 g di chinurenina si dissolvono in 1,65 ml di acido formico 88% e 0,36 ml anidride acetica in acido formico. Dopo agitazione per 2 ore a temperatura ambiente la soluzione si mescola con 300 ml etere etilico e si lascia raffreddare 0 °C fin quanto non cessa la cristallizzazione della N-formilchinurenina. La sospensione si filtra e il prodotto si ricristallizza da etanolo. Si ottiene un prodotto cristallino biancastro (sale dell'acido formico) con resa della N-formilchinurenina del 30-70%. HPLC, ESI-MS ( $M+H^+$ ,  $m/z$ ) = 237.

## **7.6 Fotosensibilizzazione su Fibroblasti**

**7.6.1 Linea cellulare** Le cellule MRC5Vi sono dei fibroblasti umani trasformati. Le cellule sono state coltivate nel terreno MEM-Eagle con l'aggiunta di 12% siero fetale bovino, L-glutamina, penicillina, streptomicina, aminoacidi non-essenziali e piruvato di sodio. Le cellule sono incubate a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

**7.6.2 Fotocitotossicità** In ogni piastra di 40mm sono state coltivate  $5 \times 10^4$  cellule e sono state incubate overnight a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Successivamente sono state trattate usando tre diverse condizioni sperimentali:

A) le cellule sono state incubate per un'ora nel terreno di coltura contenente 1 o 10 mM di NAP. Dopo l'incubazione, le cellule sono state lavate e irradiate in PBS.

B) le cellule sono state irradiate direttamente in presenza di 1 o 10 mM di NAP in PBS senza preincubazione.

C) le cellule sono state incubate per un'ora nel terreno contenente 1 o 10 mM di NAP. Dopo l'incubazione, le cellule sono state lavate e irradiate in presenza di 1 o 10 mM di NAP in PBS.

In tutte le condizioni sono stati preparati i rispettivi controlli senza NAP. La citotossicità è stata valutata 72 ore dopo il trattamento attraverso l'MMT test.

**7.6.3 Determinazione dei ROS intracellulari.** In ogni piastra sono state coltivate  $5 \times 10^5$  cellule e, dopo 24 ore, sono state incubate per 30 minuti con una sonda fluorescente, la CMH2DCFDA (5  $\mu$ M) e, dove richiesto, con la  $\text{NaN}_3$  10 mM. Anche in questo caso sono state utilizzate tre condizioni sperimentali diverse che riprendono quelle usate per la citotossicità:

A) le cellule sono state incubate per un'ora con NAP 10 mM; dopo i primi 30 minuti di incubazione, è stata aggiunta la sonda al terreno di coltura. Dopo l'incubazione, le cellule sono state lavate con PBS e, dopo aver aggiunto 1 ml di PBS, sono state irradiate.

B) le cellule sono state incubate con la sonda nel terreno di coltura per 30 minuti. Successivamente, le cellule sono state lavate con PBS e, dopo l'aggiunta di 1 ml di NAP 10 mM in PBS, sono state irradiate.

C) le cellule sono state incubate per un'ora con il NAP 10mM e dopo 30 minuti di incubazione, è stat aggiunta la sonda. Le cellule sono state lavate con PBS e, dopo l'aggiunta di NAP 10 mM in PBS, sono state irradiate.

Subito dopo l'irradiazione, il PBS è stato rimosso, le cellule sono state lavate ed è stato aggiunto 1 ml di terreno di coltura contenente 5  $\mu$ M della sonda. Dopo 30 minuti di incubazione a 37 °C, le cellule sono state trattate con

tripsina, trasferite in una provetta da 15 ml, lavate una volta con PBS e una volta con TBS contenente 0.5% BSA. Le cellule sono state poi risospese in 300  $\mu$ l of TBS contenente 0.5% BSA e l'intensità di fluorescenza determinata attraverso un citofluorimetro, è stata usata come misura della produzione di ROS.

**7.6.4 Determinazione modificazioni proteiche** In ogni piastra sono state coltivate  $5 \times 10^5$  cellule e sono state incubate overnight a 37 C° e 5% CO<sub>2</sub>.

Le cellule sono state trattate come descritto sopra per la sopravvivenza cellulare; immediatamente dopo l'irradiazione, le proteine sono state quantificate mediante il metodo di Bradford e analizzate attraverso Western Blot come riportato in letteratura [178].

**7.6.5 Analisi della progressione del ciclo cellulare** In ogni piastra sono state coltivate  $5 \times 10^5$ . Dopo 24 ore, le cellule sono state incubate con la bromodeossiuridina (BrdU) 10  $\mu$ M per 30 minuti, poi lavate con PBS e successivamente irradiate (dose UVA, 40 kJ/m<sup>2</sup>) in presenza di NAP 10 mM in PBS; è stato preparato anche un controllo non irradiato. L'analisi della progressione del ciclo cellulare è stata eseguita subito dopo e 6 ore dopo l'irradiazione; tutti i campioni sono stati trattati come riportato in letteratura [178].

**7.6.6 Degradazione del Trp nei fibroblasti MRC5Vi** In ogni piastra sono state coltivate  $5 \times 10^5$  cellule. Dopo 24 ore, le cellule sono state trattate come descritto per gli esperimenti sulla citotossicità. Dopo il lavaggio con PBS, le cellule sono state irradiate (40 kJ m<sup>-2</sup>) in assenza e in presenza di 10 mM NAP. Sono stati preparati anche dei controlli non irradiati. Immediatamente dopo l'irradiazione, le proteine sono state estratte come

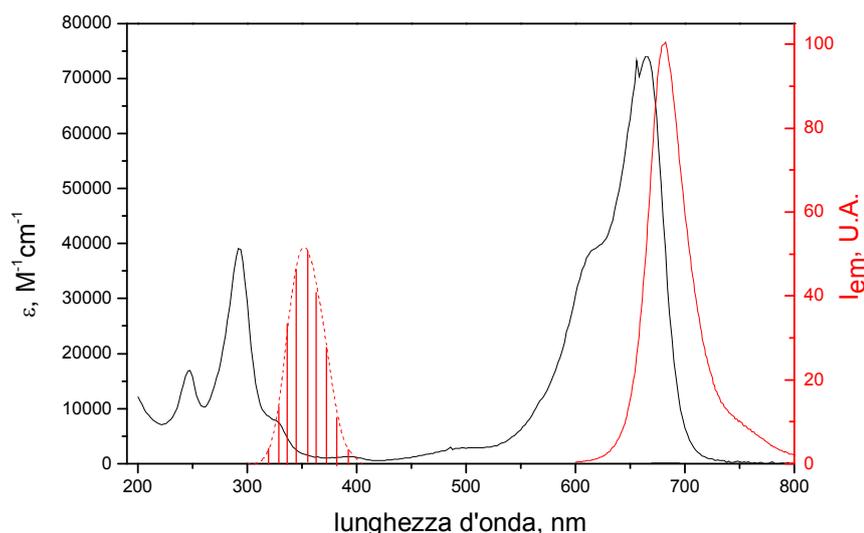
descritto sopra e i pellet sono stati risospesi in 80  $\mu$ l di NaOH 2M, idrolizzati a 100°C per 5 ore, e neutralizzati attraverso l'aggiunta di pochi  $\mu$ l di HCl concentrato. Dopo essere stati centrifugati, aliquote dei campioni sono state iniettate in HPLC utilizzando il sistema I precedentemente descritto.

## 8. PROPRIETA' FOTOCHIMICHE DEL TARGET E DEI FOTOSENSIBILIZZATORI

### 8.1. Il blu di metilene

Il BM è una molecola capace di assorbire sia nello spettro UV che in quello VIS della luce, queste caratteristiche lo rendono un efficace fotosensibilizzatore in un ampio range dello spettro elettromagnetico.

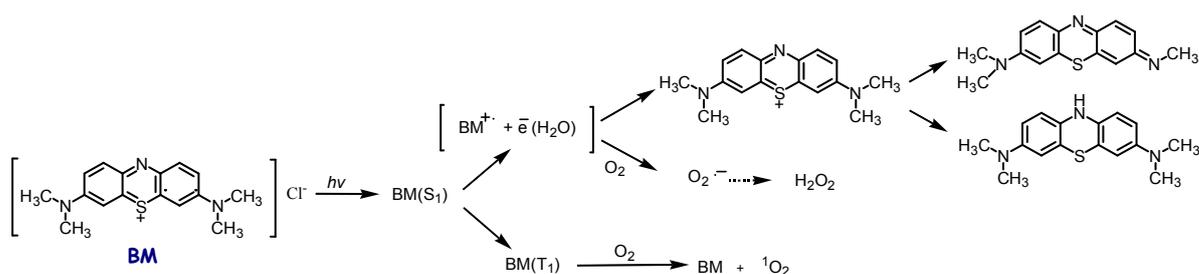
Lo spettro di assorbimento del BM registrato in PBS (pH 7.4) è caratterizzato da una banda centrata a  $\lambda = 292 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 39000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e a  $\lambda = 668 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 74000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), e una coda che si estende fino a circa  $\lambda = 750 \text{ nm}$ , vedi Fig.8.1. Se questa molecola viene eccitata nella regione del visibile, fluoresce. In condizioni fisiologiche il BM si presenta prevalentemente sotto forma cationica ( $m/z=284^+$ ).



**Fig.8.1:** Spettro di assorbimento (linea nera) e di emissione (linea rossa) del BM in relazione allo spettro di emissione della lampada del fotoreattore (linea rossa tratteggiata)

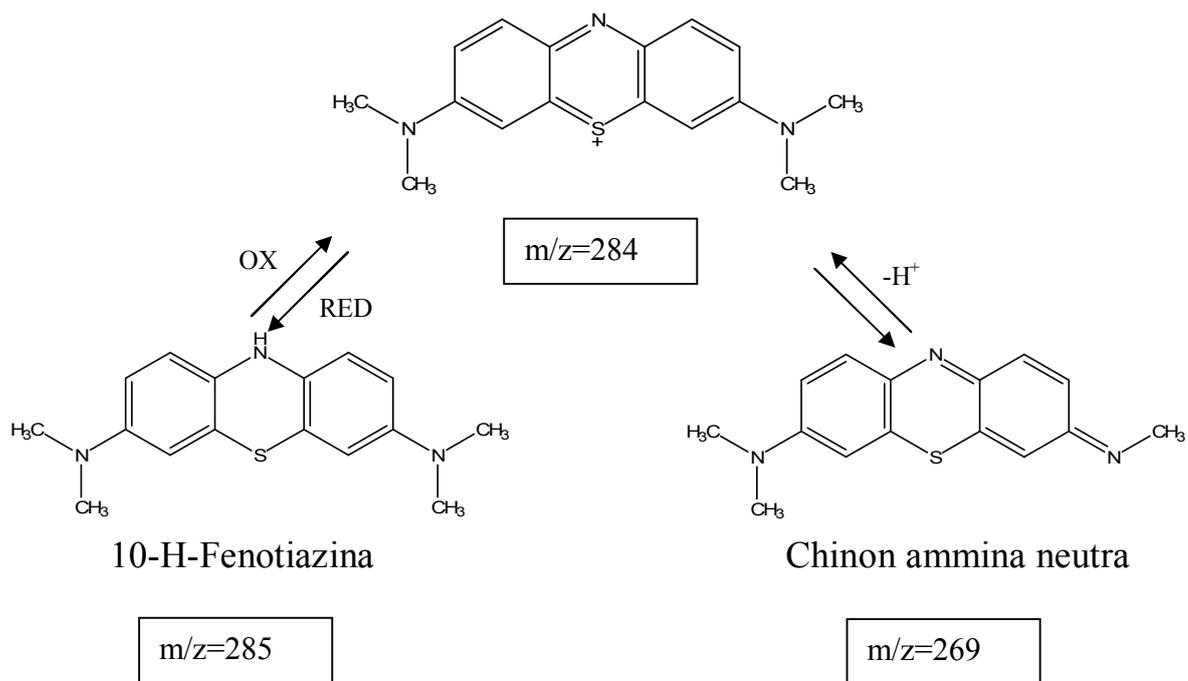
### 8.1.2 Cenni sulla fotochimica del BM

Come descritto precedentemente la fotolisi del BM avviene mediante due processi principali, la fotoionizzazione e il trasferimento di energia (Fig.8.2) [79-81]. In base a misure spettrofotometriche risolte nel tempo, in ambiente aerobico il processo di trasferimento di energia all'ossigeno molecolare è quello primario,  $E_T=142,1$  kJ/mol con  $\Phi_{\Delta}= 0,60$  in acqua [42]; la  $K_q$  dell'ossigeno molecolare in acetonitrile è  $1,7 \times 10^9$  L mol<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> [138].



**Fig.8.2: Meccanismo di fotodegradazione del BM**

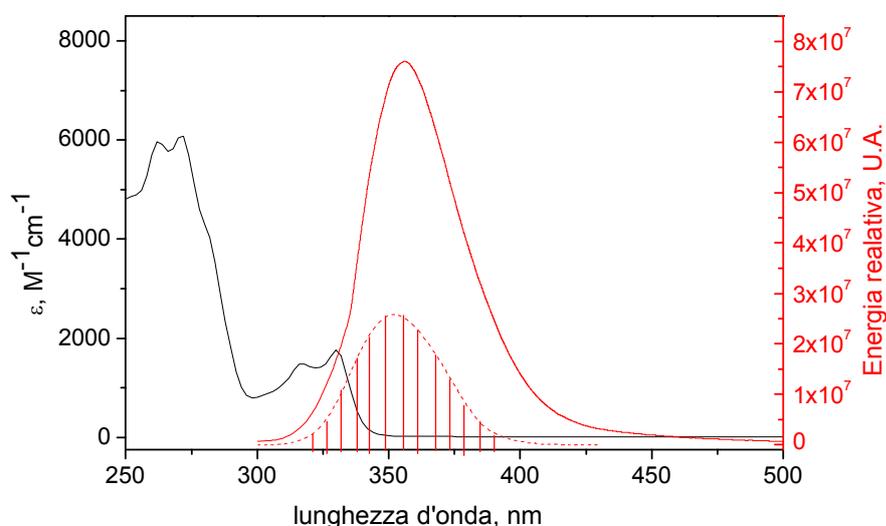
Dalla fotoionizzazione si può generare un'altra forma reattiva dell'ossigeno, l'anione superossido, anche se questo è il processo minore, in letteratura si riportano molti esempi di reazioni redox fotoindotti dal BM. In Fig.8.3 sono riportati due principali "fotoprodotto" del BM, la 10-H-fenotiazina e la Chinonammina neutra [139,140]. Il primo composto, la 10-H-fenotiazina, è stato separato, identificato e quantificato tramite misure HPLC [139,140].



**Fig.8.3: Fotoprodotti del BM derivanti da processi redox**

## 8.2. Il Naprossene

Il NAP è un farmaco appartenente alla classe dei FANS, derivato dell'acido propionico. Lo spettro d'assorbimento del NAP registrato in PBS (PH 7.4) è caratterizzato da una banda d'assorbimento centrata a  $\lambda = 262$  nm ( $\epsilon = 4500$   $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $\lambda = 273$  nm ( $\epsilon = 4450$   $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $\lambda = 313$  nm ( $\epsilon = 1000$   $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e  $\lambda = 333$  nm ( $\epsilon = 1480$   $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), e una coda che si estende fino a circa  $\lambda = 350$  nm (Fig.8.4).

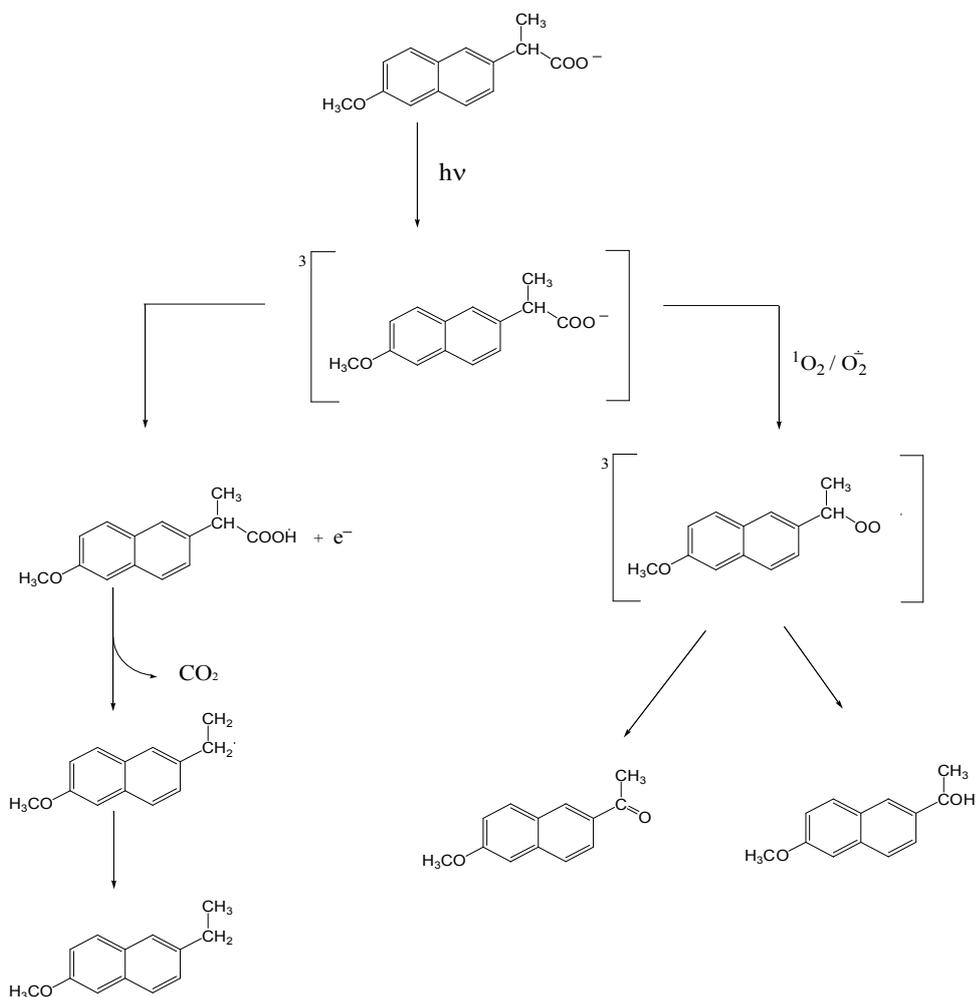


**Fig.8.4** Spettri d'assorbimento (linea nera) e di emissione (linea rossa) del NAP in PBS pH 7,4 in relazione allo spettro di emissione delle lampade del fotoreattore (linea rossa tratteggiata).

Queste caratteristiche spettrali indicano che il farmaco può agire come un fotosensibilizzatore UVA, sui vari target biologici. In base ai valori dei  $pK_a$ , a pH 7,4 (pH fisiologico) il NAP è presente sotto forma anionica.

### 8.2.1 Cenni sulla fotochimica e sulla fotosensibilizzazione del NAP

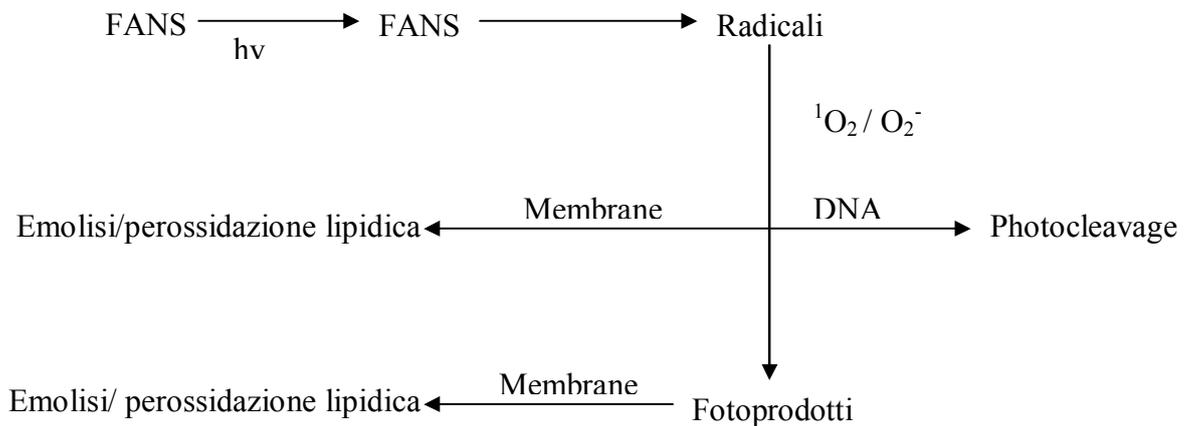
Come molti altri farmaci di questa classe il NAP è un fotosensibilizzatore che assorbendo quanti di radiazione elettromagnetica emessi nella regione dell'UV passa allo stato eccitato avviando dei processi di fotodegradazione (Fig.8.5) e di fotosensibilizzazione (Fig.8.6) quali la lisi fotoindotta di membrana [36].



**Fig.8.5:Schema generale del meccanismo molecolare di fotodegradazione del NAP**

Il NAP è relativamente instabile alla luce e facilmente degradabile quando è irradiato con raggi UVA (300-400 nm) anche a basse concentrazioni. Numerosi studi *in vivo* e *in vitro* hanno dimostrato che il NAP ed in

particolare il suo fotoprodotto principale 6-metossi acetonaftone (6MAN) sono fototossici.



**Fig.8.6 Esempio di fotosensibilizzazione di FANS su membrane**

Il meccanismo molecolare di fotosensibilizzazione mediata da NAP è stato studiato *in vitro* attraverso saggi di fotoemolisi [36], perossidazione lipidica e photocleavage del DNA [1].

Si è osservato che il NAP induce fotoemolisi sia in condizioni aerobiche che anaerobiche. Infatti, il danno alle membrane è dovuto sia a processi dipendenti che indipendenti dall'ossigeno [141]. In altri esperimenti condotti sulle proteine di membrana di eritrociti è stato osservata la formazione di cross-linking [142]. Inoltre, studi sui liposomi suggeriscono che la fotoperossidazione è provocata da radicali organici fotogenerati [143].

Il danno del DNA fotoindotto dal NAP consiste nella formazione di single strand breaks (SSB) principalmente per via radicalica [34,144,142] mentre, a differenza del Chetoprofene e dell'Acido tiaprofenico, non comporta una significativa formazione dei dimeri di pirimidina anche se questi aumentano dopo prolungate irradiazioni con UVA [34].

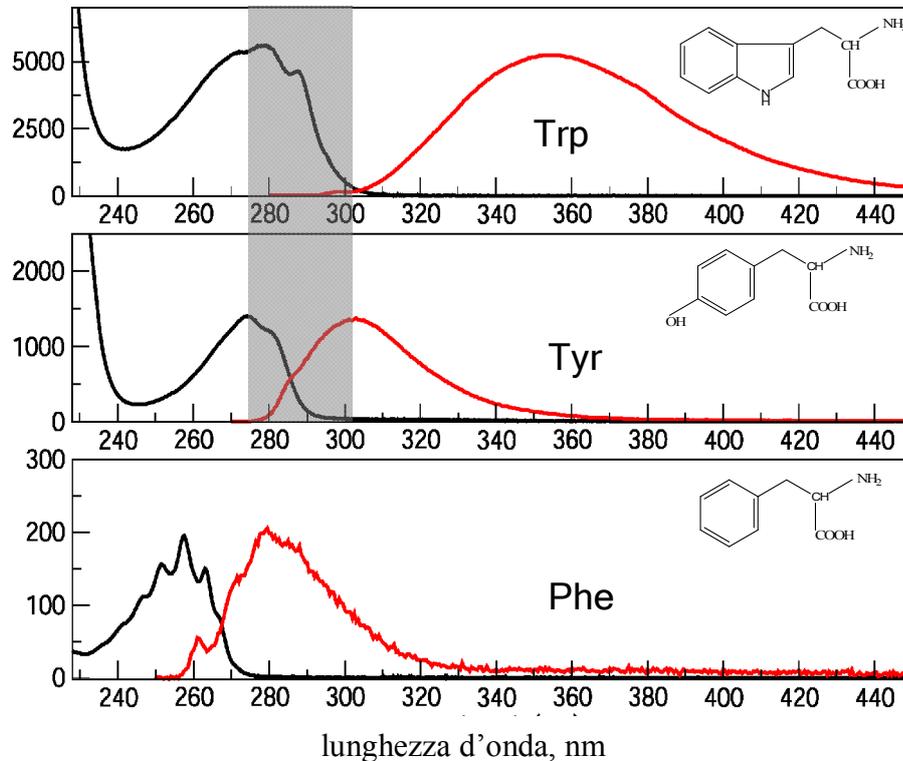
L'ossigeno singoletto non è coinvolto nella formazione di SSB fotoindotta dal NAP [142]. Tuttavia, secondo alcuni autori, l'ossigeno singoletto potrebbe

contribuire al taglio del DNA [34]. Infatti, la formazione di SSB indotta dal NAP in  $\phi$  X174 DNA è maggiore in soluzioni deaerate: è stato supposto che le specie transienti come l'OH $\cdot$  e l'O $_2^{\cdot-}$  siano i principali intermedi reattivi [142].

I dati ottenuti sono consistenti con un meccanismo che coinvolge sia i radicali liberi sia l'ossigeno singoletto, il quale è prodotto con alta resa quantica attraverso trasferimento di energia da  $^3$ NAP. La fotolisi del NAP è stata studiata in tampone PBS a pH 7.4 sia in condizioni aerobiche che anaerobiche. Studi di Laser Flash Photolysis hanno evidenziato che nella fotodegradazione del NAP è coinvolto uno stato di tripletto eccitato il quale va incontro a due processi: trasferimento di energia all'ossigeno molecolare tramite intersystem crossing (processo primario,  $\Phi_{\Delta}= 0,3$  [47]) e trasferimento elettronico (processo secondario) con decarbossilazione in ambiente anaerobico [145]. Durante la fotolisi del NAP si ha una decarbossilazione con produzione di radicali liberi; un pathway di fotodegradazione che coinvolge uno ione carbenico, la cui formazione può essere spiegata con un omolisi di un radicale cationico dopo fotoionizzazione [2].

### 8.3. Il Triptofano

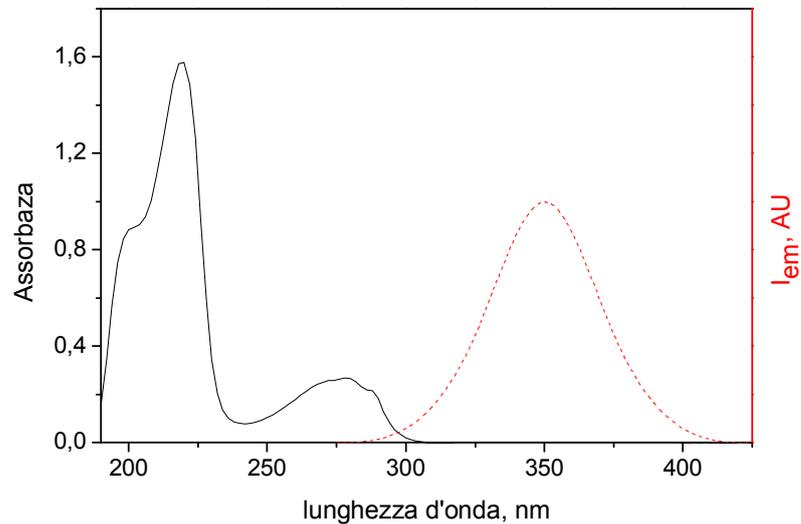
Il Trp assorbe nella regione UVC-UVB ed è uno dei tre residui peptidici aromatici responsabili dell'assorbimento delle proteine nella zona ultravioletta:



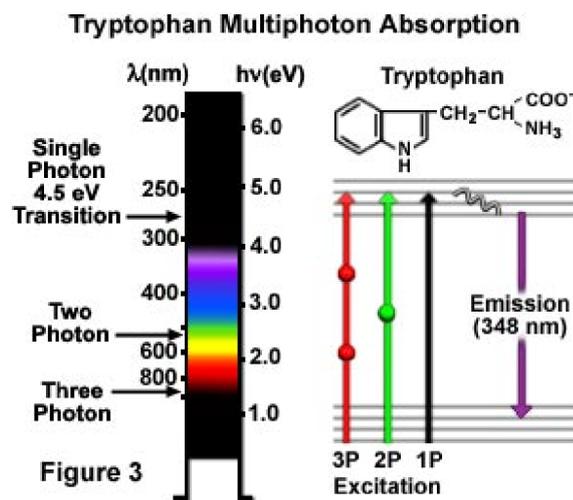
Queste caratteristiche rendono il Trp un efficace fotosensibilizzatore endogeno e uno dei target principali della fotosensibilizzazione sulle proteine indotta da vari agenti xenobiotici e per questo il Trp è stato scelto come target di fotosensibilizzazione. Infatti, il foto-danneggiamento sulle proteine, e precisamente su questo residuo aminoacidico si manifesta di frequente con fotoossidazione.

Lo spettro d'assorbimento del Trp registrato in PB (pH 7.4) è caratterizzato da una banda d'assorbimento centrata a  $\lambda = 220$  nm ( $\epsilon = 29000$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) e a  $\lambda = 278$  nm ( $\epsilon = 5280$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), e una coda che si estende fino a circa  $\lambda = 300$  nm, (Fig.8.7a), il massimo di emissione (fluorescenza) è intorno a 350 nm; in

Fig.8.7b è mostrato il diagramma energetico per l'assorbimento e l'emissione del Trp. In acqua questa molecola possiede  $pK_{a1}(\alpha\text{-COOH})= 2.4$  e un  $pK_{a2}(\alpha\text{-NH}_3^+)= 9.4$ , quindi in condizioni fisiologiche il Trp si presenta prevalentemente sotto forma di zwitterione ( $m/z(\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2)=204$ ).



a)



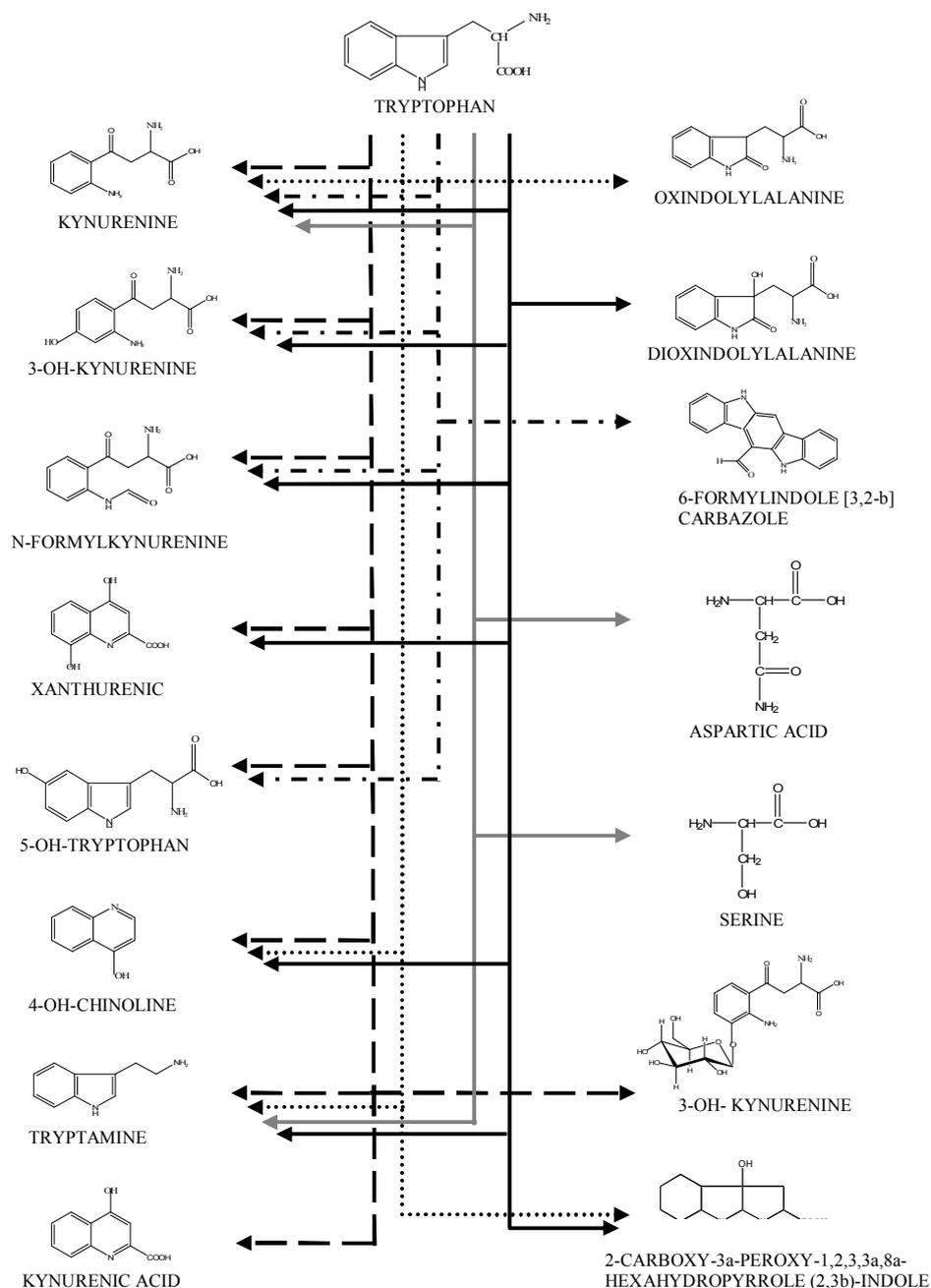
b)

Fig.8.7: a) spettro di assorbimento e di emissione (linea tratteggiata) del Trp [50  $\mu\text{M}$ ]; b) diagramma energetico per l'assorbimento e l'emissione della molecola.

### 8.3.1 Cenni sulla fotochimica del Trp

Questa molecola è uno degli amminoacidi più studiati in campo fotochimico. Come già accennato, la sua struttura aromatica lo rende particolarmente soggetto a diverse reazioni (foto)chimiche, in particolare le fotoossidazioni, da quest'ultimo processo si formano diversi prodotti. Nello Schema 10.1 sono riportati alcuni metaboliti del Trp ed alcuni suoi fotoprodotti ottenuti per irradiazione diretta con UVA/VIS, UVB ed UVC. E' da notare che la maggior parte dei metaboliti del Trp coincide con i suoi fotoprodotti. Addotti Trp-sensibilizzatore, crosslinking nelle proteine, N-formilchinurenina (massimo di assorbimento a 321 nm) e chinurenina (massimo di assorbimento a 358 nm) [48] sono tra i prodotti principali rinvenuti in vari processi dannosi sull'amminoacido.

Da quanto detto precedentemente alcuni prodotti di fotoossidazione, a loro volta, sono in grado di agire da fotosensibilizzatori e quindi di generare delle specie nocive come l'anione superossido, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (attraverso un meccanismo di tipo I) e l' $^1\text{O}_2$  (attraverso un meccanismo di tipo II) [51,146]. Se queste ossidazioni avvengono sui residui peptidici di importanti proteine come enzimi e fattori di controllo del DNA, queste modifiche si possono rivelare citotossiche. La reazione del Trp con l' $^1\text{O}_2$  risulta avere una costante di reazione di  $k = 3.2 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (pH = 7, in acqua) [52], invece quella con l'elettrone solvatato  $k = 3.2 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (T = 298K, in acqua), quindi in base a queste costanti le reazioni di tipo I risultano di un fattore di 10 più veloci. Sono state studiate anche le reazioni dell'amminoacido con i radicali; l'anione superossido che si forma dalla reazione dell'elettrone solvatato con l'ossigeno molecolare reagisce con una costante  $k = <24 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (pH = 10.6, in acqua), l'idrogeno reattivo  $\text{H}^\bullet$  con  $k = 2 \times 10^9 (\text{L mol}^{-1} \text{ s}^{-1})$ , (pH ~ 6, in acqua) ed infine il radicale idrossile  $\text{OH}^\bullet$  derivato da  $\text{O}_2^{\cdot-}$  reagisce con il Trp con  $k = 1.3 \times 10^{10} (\text{L mol}^{-1} \text{ s}^{-1})$  (pH ~ 7, in acqua).



**Schema 10.1. Metaboliti (— —) e fotoprodotti del Trp [irradiazione diretta UVA/VIS (.....), UVC (——), luce solare (— - —) e fotosensibilizzazione UVA/VIS (——) ]**

Tutti questi dati indicano che le reazioni mediate dai ROS, che coinvolgono la fotosensibilizzazione dell'amminoacido, possono avvenire con eguale probabilità e lo studio di questi meccanismi in una proteina è piuttosto complesso. È da notare che le modificazioni rilevanti dal punto di vista

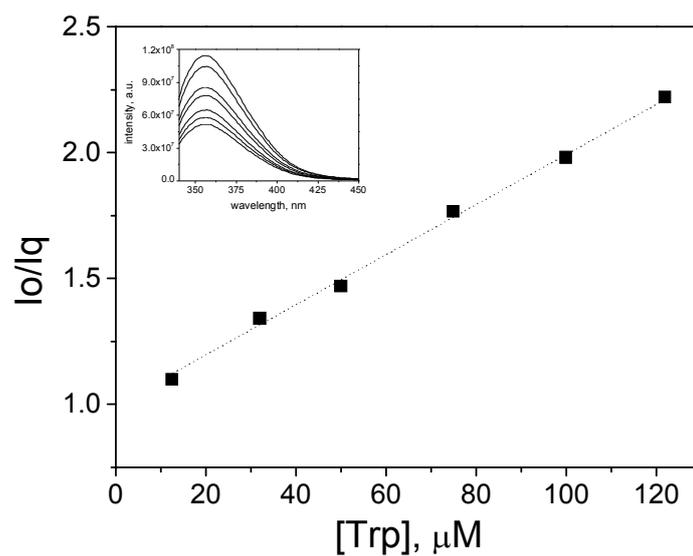
biologico avvengono mediamente attraverso un meccanismo di tipo II, mentre la via mediata direttamente dagli elettroni sembra essere la meno efficiente.

## 9. FOTOSENSIBILIZZAZIONE INDOTTA SUL TRIPTOFANO LIBERO

### 9.1 Interazione sensibilizzatore-target

Come punto di inizio è importante verificare l'interazione del target con il fotosensibilizzatore. Tale interazione è stata valutata attraverso studi di fluorescenza. Infatti, mentre gli spettri di assorbimento UV-VIS dei due fotosensibilizzatori non mostrano una variazione apprezzabile in presenza di concentrazioni crescenti di Trp, la presenza dell'aminoacido influenza le proprietà di emissione del NAP e non del BM. La Fig.9.1 riporta il grafico di Stern-Volmer ottenuto da misure di fluorescenza del NAP in presenza di concentrazioni crescenti di Trp; si osserva un quenching dose-dipendente della fluorescenza del NAP (Fig.9.1, inserto); questo può essere attribuito al legame tra il farmaco e l'amminoacido formando un complesso NAP-Trp dovuto a interazioni elettrostatiche.

La formazione di un complesso stabile rappresenta un importante prerequisito per incrementare il danno fotoindotto. Infatti, dal grafico in cui viene riportato il rapporto tra l'emissione del NAP in assenza e in presenza del quencher ( $I_0/I_q$ ) in funzione della concentrazione del Trp (Fig.9.1), è stata calcolata la costante di Stern-Volmer che è risultata  $9400 \pm 200 \text{ M}^{-1}$ . Quindi, tenendo conto che il tempo di vita della fluorescenza del NAP è di 9,23 ns [147], è stata ottenuta una costante di quenching di  $(1,069 \pm 0,02) \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Poiché questo valore è più alto rispetto alla costante di diffusione in acqua, è stata ipotizzata la formazione di un complesso tra il NAP e il Trp.



**Fig.9.1** Grafico di Stern-Volmer per il quenching di fluorescenza di 50  $\mu M$  NAP in soluzione PB ( $\lambda_{exc}$ : 320 nm,  $\lambda_{em}$ : 355 nm, slits: 3 nm) (-■-) in funzione della concentrazione del Trp; inserto: spettri di fluorescenza del NAP in presenza di concentrazioni crescenti di Trp (0 - 120  $\mu M$ ).

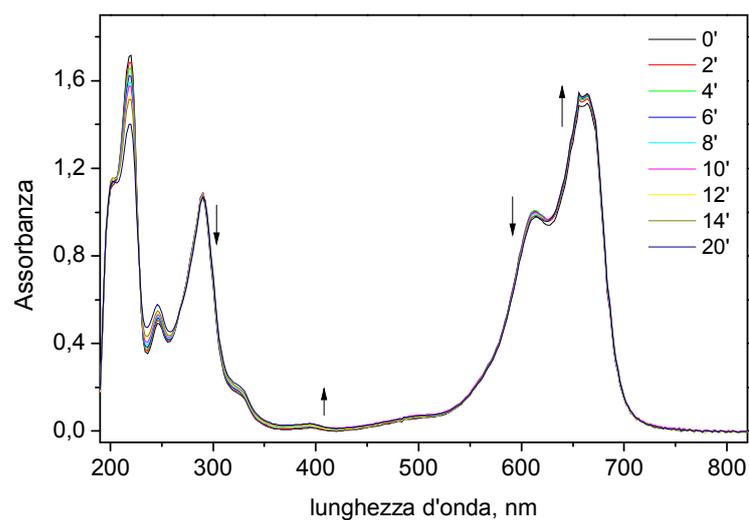
## 9.2 Fotosensibilizzazione del Trp

Nel plasma di sangue umano si può distinguere tra Trp libero (11,6  $\mu\text{M}$ ) e legato a proteine (43,2  $\mu\text{M}$ ) come l'albumina. La concentrazione totale dell'amminoacido (Trp libero e legato) nel plasma risulta essere 55,8  $\mu\text{M}$  [148]. Poiché la distribuzione proteica nel sangue è 1 mg/mL e la percentuale di Trp nelle proteine è 1,1%, la concentrazione del Trp risulta uguale a circa  $1 \times 10^{-5}$  g/mL, abbiamo quindi una concentrazione totale nelle proteine pari a 50  $\mu\text{M}$ , ed è questa la quantità di amminoacido utilizzata nelle prove effettuate.

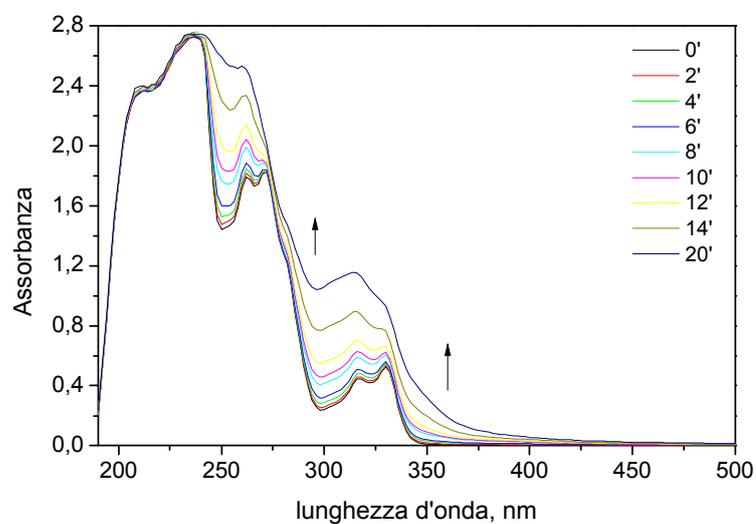
Il modello di fotosensibilizzatore scelto ha lo scopo di ipotizzare, in linea di massima, il meccanismo responsabile della fotosensibilizzazione (tipo I/II), al fine di affrontare progressivamente il modello più complicato delle proteine.

Sono state preparate delle miscele contenenti Trp 50  $\mu\text{M}$  e il fotosensibilizzatore in PB. Tali miscele sono state irradiate; in Fig.9.2 e Fig.9.3 sono riportate le variazioni spettrali dopo l'esposizione alla luce di una soluzione rispettivamente con BM 30  $\mu\text{M}$  e con NAP 300  $\mu\text{M}$  in funzione del tempo di irradiazione.

La concentrazione del NAP, così come quella del BM è stata scelta in modo da ottenere una frazione di luce assorbita dal Trp nel range di emissione delle lampade trascurabile. Questo è stato fatto considerando la frazione di luce assorbita nella regione di sovrapposizione tra gli spettri di assorbimento del fotosensibilizzatore e del target e quello della lampada.



**Fig.9.2: Variazione spettrale di una soluzione in PB contenente 30 μM di BM e 50 μM di Trp a vari tempi di irradiazione**



**Fig.9.3: Variazione dello spettro di assorbimento di una soluzione in PB di NAP 300 μM contenente Trp 50 μM a vari tempi di irradiazione**

### 9.3 Identificazione dei prodotti di fotossidazione del Trp.

Dopo l'irradiazione, frazioni dei campioni sono state iniettate in HPLC. In questo modo, utilizzando gli opportuni eluenti e sistemi di rivelazione (vedi Tab.9.1), è stato possibile separare e quantificare i componenti iniziali della miscela e gli eventuali fotoprodotti.

	SISTEMA I		SISTEMA II		SYSTEMA III		SYSTEMA IV	
	Gradiente Tampone formiato/ MeOH		Isocratica Tampone SOS /MeOH		Gradiente ACN/tampone pentansulfonico		Isocratica H <sub>2</sub> O/ACN	
	t <sub>R</sub>	detector	t <sub>R</sub>	detector	t <sub>R</sub>	detector	t <sub>R</sub>	detector
BM			7.9	DAD <sub>280</sub>	7.9	DAD <sub>664</sub>		
Triptofano	8.1	DAD <sub>278</sub> FLD <sub>278/356</sub>	5.5	DAD <sub>278</sub> FLD <sub>278/356</sub>	5.5	DAD <sub>278</sub> FLD <sub>278/356</sub>	6.5	DAD <sub>278</sub> FLD <sub>278/356</sub>
4-OH- chinolina	10	DAD <sub>280</sub> FLD <sub>278/356</sub>	10	DAD <sub>280</sub> FLD <sub>278/356</sub>				
Triptamina	9.5	DAD <sub>280</sub> FLD <sub>278/356</sub>	9.5	DAD <sub>280</sub> FLD <sub>278/356</sub>				
3-OH- chिurenina	3.8	DAD <sub>360</sub> FLD <sub>372/425</sub>	3.8	DAD <sub>360</sub> ECD <sub>372/425</sub>			3.1	DAD <sub>360</sub> FLD <sub>372/425</sub>
Chinurenina	5.5	DAD <sub>360</sub> FLD <sub>360/480</sub>	5.5	DAD <sub>360</sub> ECD			4.5	DAD <sub>360</sub> FLD <sub>360/480</sub>
N-formil- chिurenina	5.8	DAD <sub>330</sub> FLD <sub>325/435</sub>	5.8	DAD <sub>330</sub> ECD				
Acido xanturenico				ECD				
Acido chuiurenico	8.3	DAD <sub>330</sub> FLD <sub>330/375</sub>	8.3	DAD <sub>330</sub> FLD <sub>330/375</sub>				
5-OH- Triptofano	7.2	DAD <sub>280</sub> FLD <sub>278/356</sub>	7.2	DAD <sub>280</sub> FLD <sub>278/356</sub>				

**Tab. 9.1: Detector e sistemi di rivelazione usati per separare e quantificare il target, il fotosensibilizzatore e gli eventuali rispettivi fotoprodotti.**

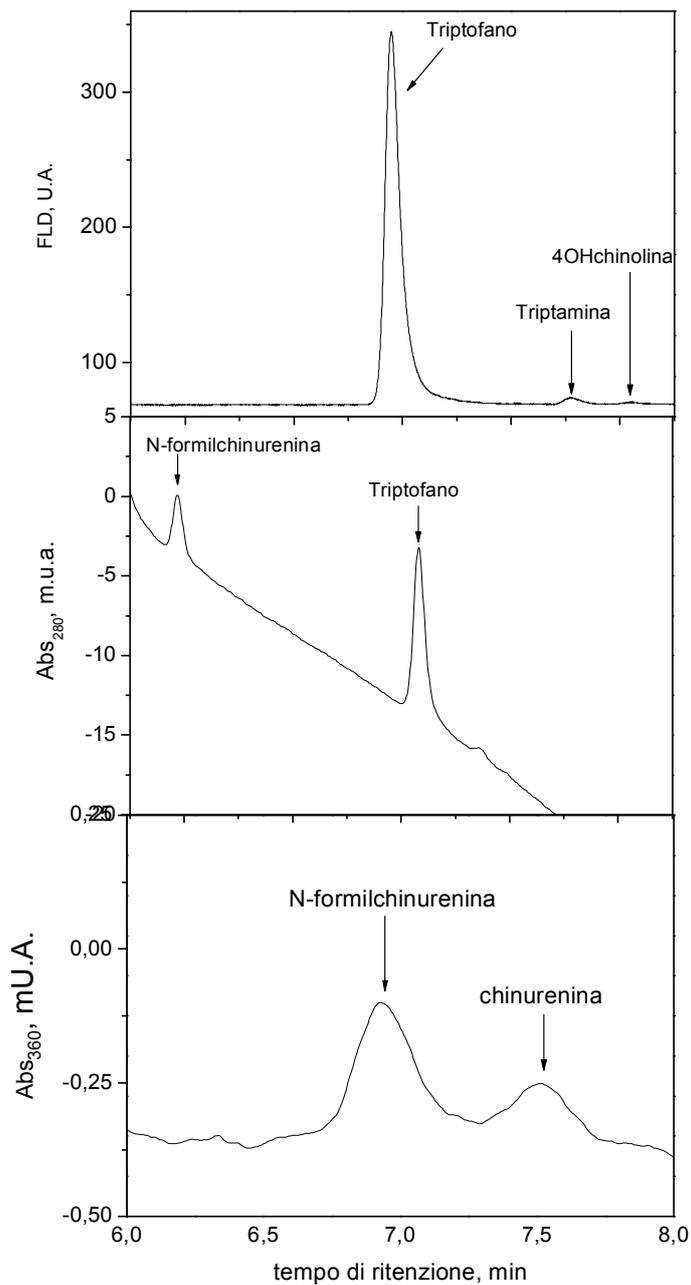
Nel sistema I (Fig.9.4a) è stato usato un gradiente tampone formiato/metanolo e i detector DAD e FLD. In queste condizioni sono stati identificati il Trp, la 4-OH-chinolina, la triptamina, la N-formilchinurenina, la chinurenina, il NAP e i suoi fotoprodotti.

Nel sistema II (Fig.9.4b) è stata usata un'isocratica tampone SOS/metanolo e i detector DAD, FLD, ECD; in questo modo sono stati identificati il Trp, la 3-OH-chinurenina e l'acido xanturenico.

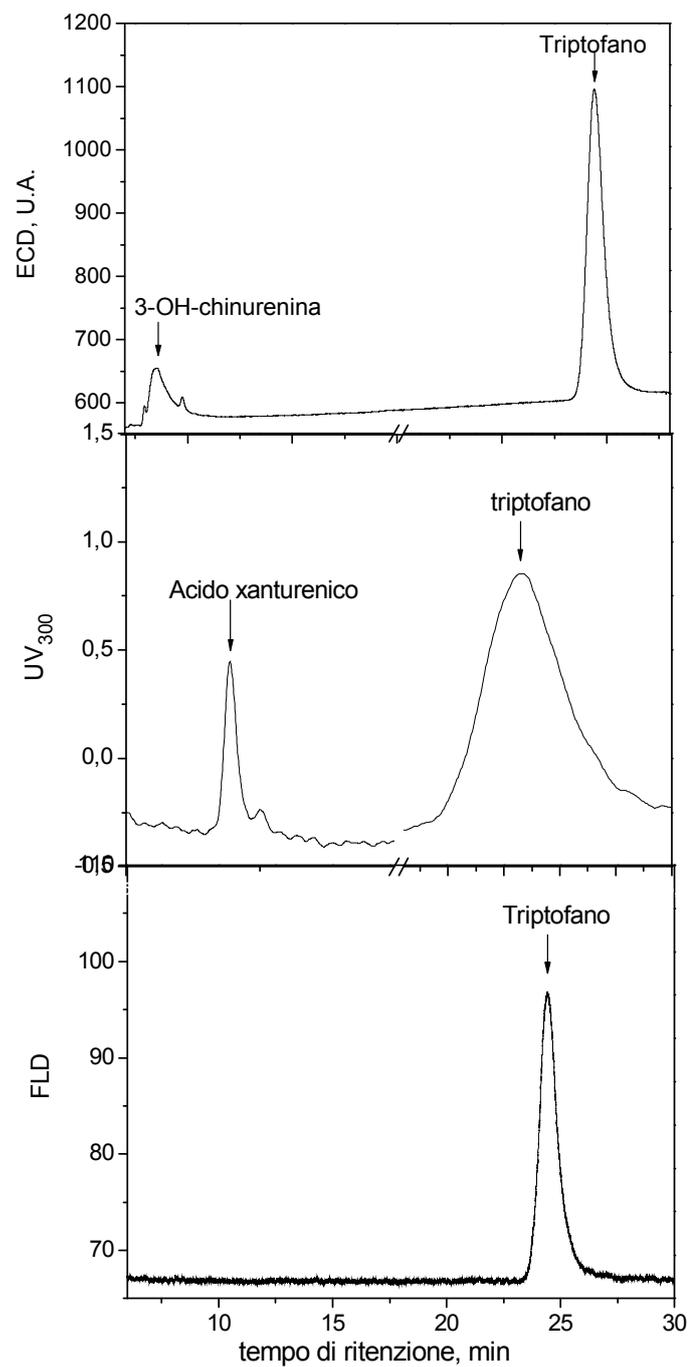
Contemporaneamente, oltre alla determinazione dei target di fotosensibilizzazione dei loro fotoprodotti, si è ritenuto necessario seguire la fotodegradazione del BM.

Le Fig.9.4c e 9.4d mostrano i cromatogrammi rappresentanti un fotoprodotto del BM, la 10H-fenotiazina. La **Fig.9.4c** mostra i cromatogrammi ottenuti utilizzando come eluenti H<sub>2</sub>O/ACN e come detector DAD e FLD (sistema IV). La **Fig.9.4d** mostra i cromatogrammi ottenuti in un sistema in cui sono stati utilizzati come eluente un gradiente tampone acido pentansulfonico / ACN e come detector DAD e FLD (sistema III). Questo prodotto si origina da processi di riduzione, si accumula fino a 15 minuti di irradiazione per poi degradarsi a causa probabilmente da attacco di ROS. La formazione del derivato 10-H è spiegabile con un meccanismo di tipo I ed è corrispondente al processo di fotoionizzazione. L'identificazione di questo fotoprodotto è stata conseguita, raccogliendo le frazioni corrispondenti al picco con il tempo di ritenzione di circa 4,2 minuti, concentrando la sostanza alla centrifuga a pressione ridotta e successivamente effettuando una scansione selettiva della sostanza in metanolo con lo spettrometro di massa (Fig.9.5).

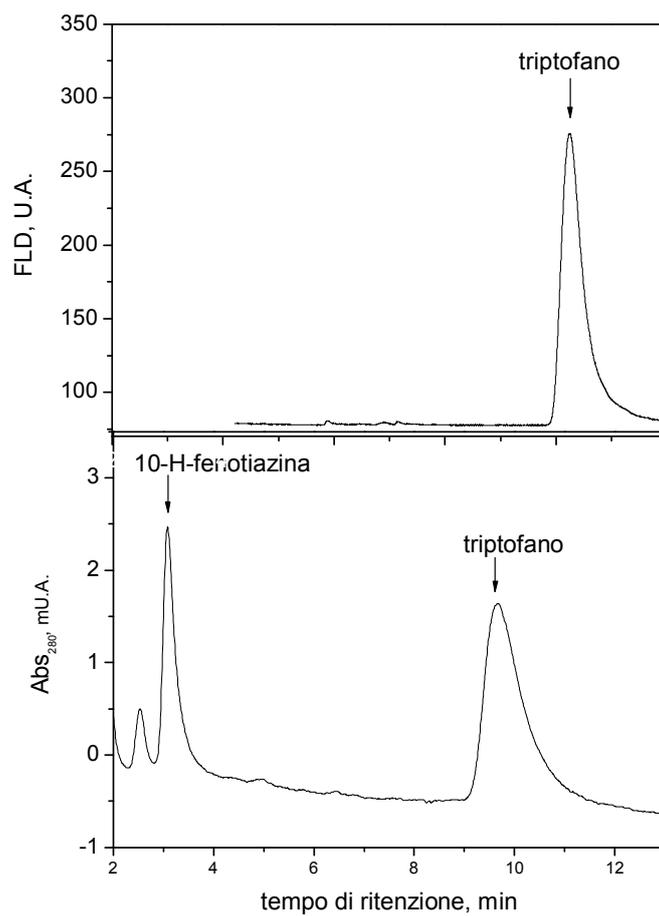
Il sistema HPLC con eluente tampone pentensulfonico non ha permesso una quantificazione adeguata del BM quindi è stata effettuata un'analisi FIA (Flow Injection Analysis) con il sistema LC-MS.



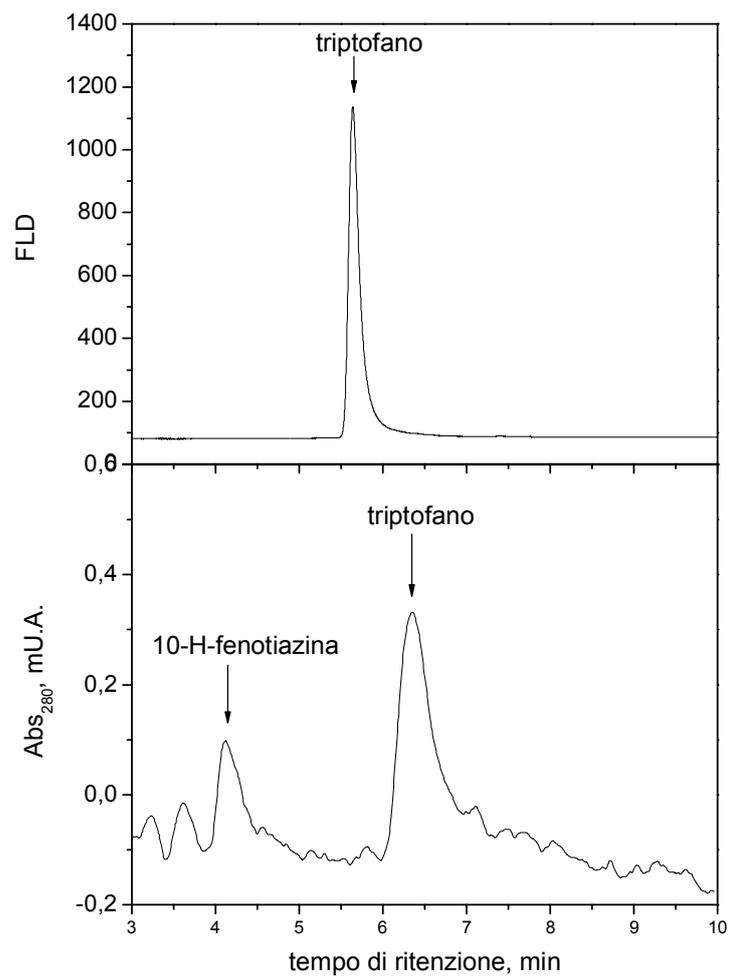
**Fig.9.4a: Tracciato cromatografico (DAD: 280 nm; FLD:  $\lambda_{ecc.}$  278 nm,  $\lambda_{em.}$  356 nm) del Trp e formazione dei suoi fotoprodotto in gradiente tampone formiato/metanolo (sistema I)**



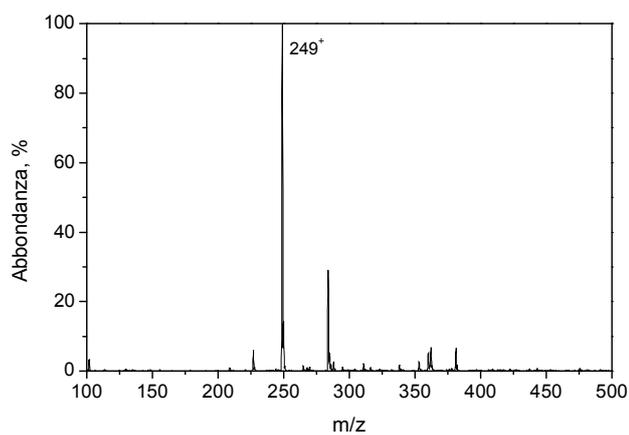
**Fig.9.4b: Tracciato cromatografico del Trp e formazione dei suoi fotoprodotti in tampone SOS (DAD: 300 e 360 nm; FLD:  $\lambda_{ecc}$ . 278 nm,  $\lambda_{em}$ . 356 nm; ECD) (sistema II)**



**Fig.9.4c: Tracciato cromatografico del Trp e formazione del fotoprodotto del BM (10H-fenotiazina) in H<sub>2</sub>O/ACN(DAD: 280 nm; FLD:  $\lambda_{ecc.}$  278 nm,  $\lambda_{em.}$  356 nm) (sistema III)**



**Fig.9.4d: Tracciato cromatografico; Trp e formazione del fotoprodotto del BM (10H-fenotiazina) in tampone pentensulfonico (DAD: 280 nm; FLD:  $\lambda_{ecc.}$  278 nm,  $\lambda_{em.}$  356 nm) (sistema IV)**

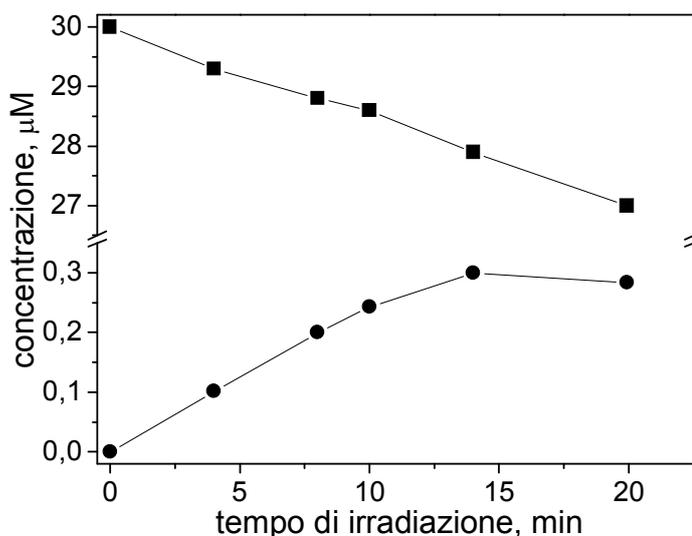


**Fig.9.5: Spettro di massa del fotoprodotto del BM (10H-fenotiazina, 249<sup>+</sup>).**

## 9.4 Degradazione dei fotosensibilizzatori e del Trp e formazione dei fotoprodotti

### 9.4.1 Cinetiche di fotodegradazione e formazione di fotoprodotti: BM

La Fig.9.6 riporta la fotodegradazione di una soluzione di BM 30  $\mu\text{M}$  e la formazione del suo principale fotoprodotto, la 10-H-fenotiazina, in presenza di Trp 50  $\mu\text{M}$ .



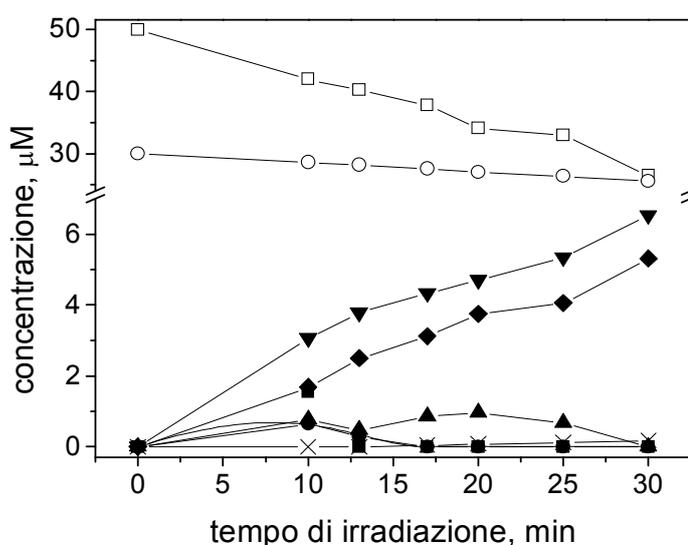
**Fig.9.6 Degradazione del BM 30  $\mu\text{M}$  (-■-) e formazione della 10-H-fenotiazina (-●-) in presenza di Trp 50  $\mu\text{M}$  in PB (pH 7.4) in funzione del tempo di irradiazione.**

Questo prodotto è la forma ridotta del BM e differisce da esso solo per una a.m.u [139]; la sua determinazione è stata confermata attraverso analisi ESI-MS. La concentrazione più alta di fotoprodotto è stata ottenuta dopo 15 minuti di irradiazione. La formazione della 10-H-fenotiazina può essere spiegata considerando il pathway radicalico della fotochimica del BM e quindi la fotoionizzazione [140] e l'aggiunta riduttiva di un idrogeno al BM [139]. D'altra parte però, il principale processo coinvolto nella fotochimica del BM è il trasferimento di energia all'ossigeno. In accordo con le misure

risolte nel tempo, in condizioni aerobiche il trasferimento di energia all'ossigeno molecolare è il processo primario.

Come mostrato in Fig.9.7 la fotodegradazione del Trp 50  $\mu\text{M}$  in presenza di BM 30  $\mu\text{M}$  procede linearmente in maniera dose- dipendente. Entro 20 minuti di irradiazione, circa il 15% del fotosensibilizzatore si degrada mentre allo stesso tempo viene osservata la degradazione al 30% del target.

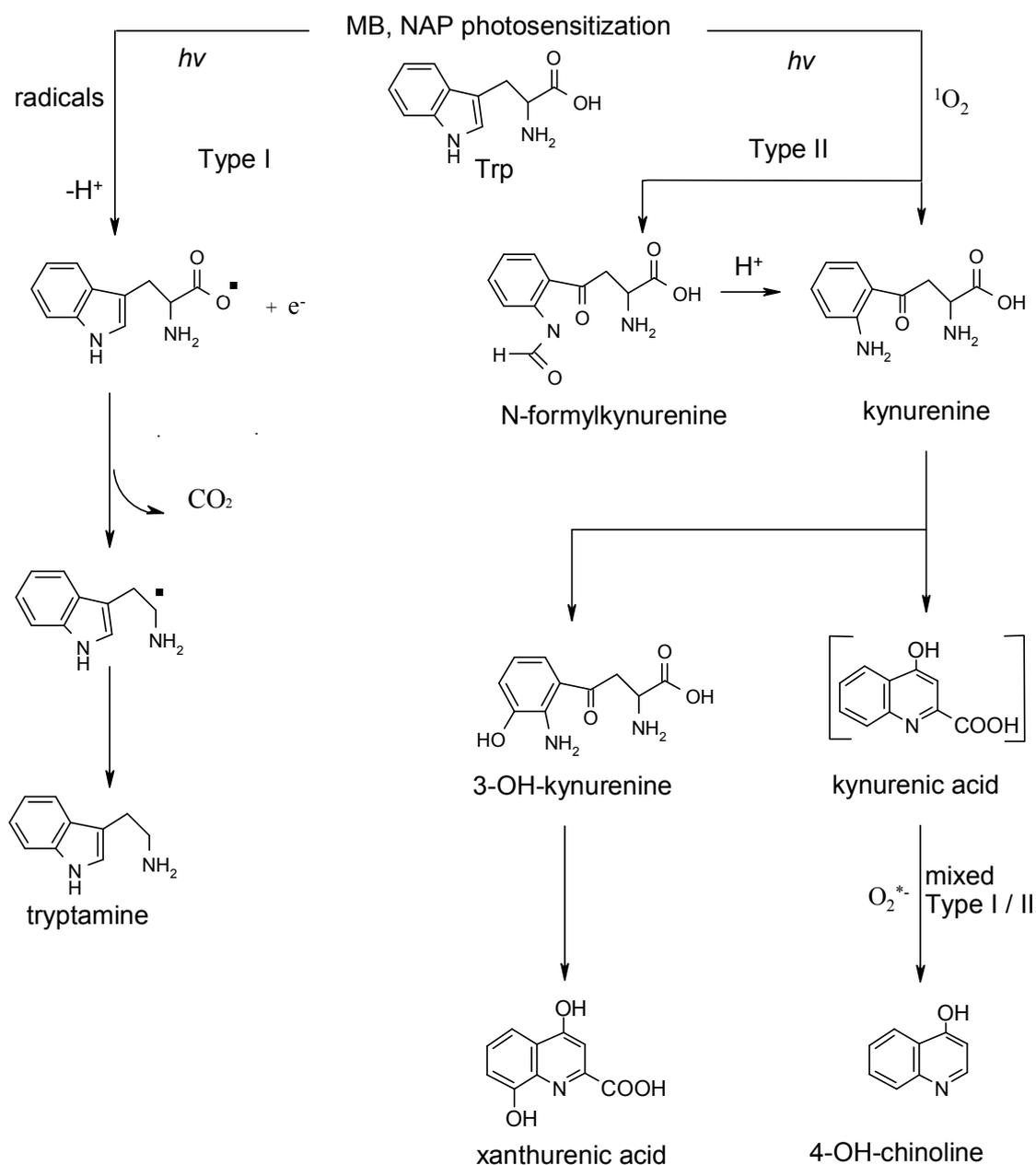
In Fig.9.7 è anche mostrata la formazione dei derivati del Trp, acido xanturenico, 4-OH-chinolina, triptamina, N-formilchinurenina, chinurenina e 3-OH-chinurenina.



**Fig.9.7 FOTOSENSIBILIZZAZIONE DEL TRP 50  $\mu\text{M}$  INDOTTA DA BM 30  $\mu\text{M}$  IN PB (pH 7.4) IN FUNZIONE DEL TEMPO DI IRRADIAZIONE. DEGRADAZIONE DEL TRP (-□-) E DEL BM (-○-). FORMAZIONE DEI DERIVATI DEI FOTOPRODOTTI DEL TRP: 4-OH-CHINOLINA (-■-), TRIPTAMINA (-●-), CHINURENINA (-▲-), 3-OH-CHINURENINA (-▼-), N-FORMILCHINURENINA (-◆-), ACIDO XANTURENICO (-X-).**

È importante sottolineare il fatto che alcuni derivati del Trp, acido xanturenico, 4-OH-chinolina, triptamina and 3-OH-chinurenina sono stati ottenuti per la prima volta da fotosensibilizzazione UVA. Generalmente questi fotoprodotti si formano per irradiazione solare, UVA-VIS, UVC. In

alcuni casi sono anche metaboliti. Alcuni di questi prodotti si formano tramite l'ossigeno singoletto. La 3-OH-chinurenina e la N-formil-chinurenina, due caratteristici prodotti di tipo II [51,146], come atteso, sono i principali composti prodotti da fotosensibilizzazione indotta da BM. Questi prodotti sono riportati nello Schema 1, che prova a dare un quadro semplificato dello stato dell'arte e dei dati sperimentali ottenuti.



**Scheme 1. Schema semplificato della fotochimica del Trp in presenza di ossigeno**

Ad una degradazione del target di circa 50% corrisponde la formazione di circa 10% di 3-OH-chinurenina e 15% di N-formilchinurenina. Sono stati determinati anche il 2% di chinurenina, un precursore della 3-OH chinurenina [146], e bassi livelli di 4-OH-chinolina, triptamina e acido xanturenico. Non sono state evidenziate invece composti come acido aspartico, serina, alanina, 5-OH-triptofano e acido chinurenico; alcuni di questi derivati sono prodotti con il contributo della radiazione UVC [149]. Bisogna anche ricordare molti sono anche metaboliti [58,66,150].

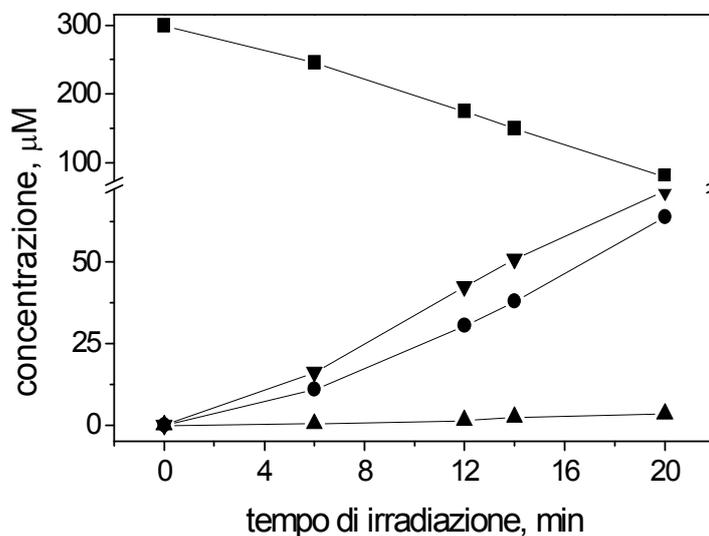
Per confermare il ruolo dell'ossigeno singoletto nel meccanismo di fotosensibilizzazione, è stato valutato l'effetto della sostituzione dell' $H_2O$  con acqua deuterata ( $D_2O$ ). In acqua deuterata il tempo di vita dell'ossigeno singoletto aumenta e con esso la possibilità di interagire con altre molecole. In questi esperimenti almeno il 90% dell'acqua è stata sostituita da  $D_2O$ . Le relative rese quantiche sono riportate in Tab.2. Rispetto alle normali condizioni di solvente, le cinetiche di fotodegradazione del BM del target sono più veloci. Allo stesso modo è stata influenzata anche la formazione dei derivati del Trp; infatti, si formano quantità più elevate di N-formilchinurenina e chinurenina che vengono raggiunte a brevi tempi di irradiazione rispetto alle condizioni normali; inoltre, la formazione della 3-OH-chinurenina è molto simile. La 4-OH-chinolina e la triptamina, sono sotto i livelli di rivelazione dello strumento e questo conferma il carattere radicale del meccanismo di formazione di questi due composti.

	tampone PB in H <sub>2</sub> O				tampone PB in D <sub>2</sub> O			
	MB/Trp		NAP/Trp		MB/Trp		NAP/Trp	
	$\Phi$ degr.	$\Phi$ form.	$\Phi$ degr.	$\Phi$ form.	$\Phi$ degr.	$\Phi$ form.	$\Phi$ degr.	$\Phi$ form.
MB	0.52				0.69			
10-H-fenotiazina		0.18				0.10		
NAP			6.4				7.1	
6-MAN				2.2				6.2
NAP derivato alcolico				2.3				
NAP derivato decarbossilato				0.14				0.15
Trp	0.62		1.0		1.45		1.25	
4-OH-chinolina		0.15		0.81				0.05
triptamina		0.067		0.45				0.07
3-OH-chinurenina		0.2		0.4		0.17		0.35
chinurenina		0.07		0.02		0.17		0.08
N-formilchinurenina		0.32		0.09		0.7		0.23
Acido xanturenico		0.006		0.016				

**Tab.2. Rese quantiche di fotodegradazione dei fotosensibilizzatori e del Trp e di formazione dei fotoprodotti (i valori sono espressi in  $\times 10^2$ )**

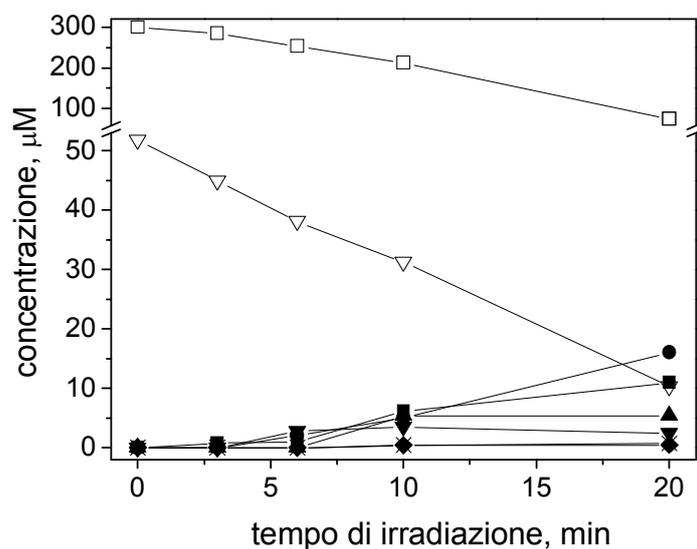
### 9.4.2 Cinetiche di fotodegradazione e formazione di fotoprodotti: NAP

La Fig.9.8 riporta la fotodegradazione del NAP 300  $\mu\text{M}$  e la formazione dei suoi fotoprodotti in PB a pH 7.4.



**Fig.9.8** Degradazione del NAP (-■-) e formazione dei suoi fotoprodotti in presenza di Trp 50  $\mu\text{M}$  in PB (pH 7.4) in funzione del tempo di irradiazione: derivato alcolico (-●-), NAP derivato decarbossilato (-▲-) e 6-MAN (-▼-).

Tra i fotoprodotti del NAP, il 6-MAN (6-methoxy-2-acetonaphthone) è ben conosciuto in letteratura [36], la sua determinazione e caratterizzazione è stata eseguita attraverso misure di assorbimento, emissione e ESI-MS. Durante 20 minuti di irradiazione, le rese dei fotoprodotti aumentano linearmente, mentre il NAP si degrada al 25%. La valutazione quantitativa dei fotoprodotti è stata effettuata valutando le loro proprietà in emissione [147] ed è supportata da misure MS. La formazione del 6-MAN e del derivato idrossilico (6-methoxy-2-(1-hydroxyethyl)-naphthalene) sono consistenti con la produzione dell'ossigeno singoletto, mentre il derivato decarbossilato (6-methoxy-2-ethyl-naphthalene) si origina dal processo di fotoionizzazione [36].



**Fig.9.9 Fotosensibilizzazione del Trp 50  $\mu$ M indotta dal NAP 300  $\mu$ M in PB (pH 7.4) in funzione del tempo di irradiazione. Fotodegradazione del Trp (- $\nabla$ -) e del NAP (- $\square$ -). Formazione dei derivati del Trp: 4-OH-chinolina (- $\bullet$ -), triptamina (- $\blacksquare$ -), chinurenina (- $\blacklozenge$ -), 3-OH-chinurenina (- $\blacktriangle$ -), N-formilchinurenina (- $\blacktriangledown$ -), acido xanturenico (- $\times$ -).**

In Fig.9.9 è riportata la degradazione del Trp 50  $\mu$ M fotoindotta dal NAP, così come la formazione dei suoi fotoprodotti. Come nel caso del BM, i derivati del Trp acido xanturenico, 4-OH-chinolina, triptamina e 3-OH-chinurenina sono stati ottenuti per la prima volta da fotosensibilizzazione UVA. La degradazione del target procede linearmente in maniera dose-dipendente. Durante 20 min di irradiazione, viene degradato circa l'80% del Trp. Facendo un confronto con i risultati ottenuti nel caso del BM, la distribuzione dei fotoprodotti del Trp è diversa. Infatti, quando circa l'80% del Trp risulta essere degradato, la 4-OH-chinolina è il fotoprodotto più abbondante (30%), seguito dalla triptamina (20%). Quest'ultimo composto è un caratteristico prodotto di ossidazione del Trp [151] ed in letteratura è riportato come prodotto da irradiazione diretta UVA del Trp [65]. La 4-OH-chinolina, composto osservato nelle modificazioni fotomediate del Trp dall'anione superossido dovuto alla reazione che comprende deaminazione e

decarbossilazione, può essere considerata un fotoprodotto indicativo per un meccanismo misto tipo I/II [68]. Inoltre, rispetto al BM, sono prodotte piccole quantità di 3-OH-chinurenina (10%) e N-formilchinurenina (4%), composti diagnostici di un meccanismo di tipo II. Gli altri composti diagnostici di un meccanismo di tipo II sono stati trovati in quantità inferiori all'1%. Non sono stati riscontrati acido aspartico, serina, alanina, 5-OH-triptofano e acido chinurenico. Questi dati confermano che la fotosensibilizzazione indotta dal NAP avviene attraverso una combinazione di entrambi i meccanismi tipo I e II. Inoltre, studi sulle membrane evidenziano la concomitante formazione del 6-MAN con il danno alle membrane [36]; questo non esclude il coinvolgimento di questo principale fotoprodotto nel danno fotoindotto. In conclusione, un confronto delle distribuzioni dei fotoprodotti del Trp nei due diversi modelli, BM e NAP, è utile nella valutazione del meccanismo di fotosensibilizzazione.

Come nel caso della fotosensibilizzazione indotta dal BM, risultati interessanti sono stati ottenuti in presenza di D<sub>2</sub>O (Tab.2). Infatti, le cinetiche di degradazione del NAP e del Trp sono più veloci rispetto alle condizioni normali confermando il parziale carattere di tipo II della fotosensibilizzazione indotta dal NAP sul Trp. La D<sub>2</sub>O influenza anche la formazione dei fotoprodotti del NAP. La resa quantica di formazione del 6-MAN aumenta e questo giustifica il fatto che il derivato alcolico non è stato rivelato. Come atteso, non è stata osservata nessuna influenza della D<sub>2</sub>O sulla formazione del derivato decarbossilato del NAP. Tra i fotoprodotti del Trp, la N-formilchinurenina è prodotta con resa quantica più alta, per la 3-OH-chinurenina la differenza è trascurabile e gli altri composti sono prodotti in quantità abbastanza basse.

**9.5 Confronto tra il modello BM-Trp e il modello NAP-Trp.** Il meccanismo di fotosensibilizzazione è stato valutato attraverso il confronto tra le rese quantiche di formazione dei fotoprodotti del Trp (Tab.2). Il Trp può reagire con i ROS formando un intermedio radicalico instabile che è decomposto attraverso diversi percorsi [152]. Le costanti di quenching  $k_q$  per  $O_2$ ,  $e^-$ ,  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H^{\bullet}$  e  $OH^{\bullet}$  sono rispettivamente  $0.5 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$  [53],  $0.32 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$  [153],  $24 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [154],  $2 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [51] e  $13 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [147]. La 3-OH-chinurenina e la N-formilchinurenina possono essere considerati composti diagnostici per un meccanismo di tipo II [51,146]. Essi si formano con rese quantiche alte per entrambi i fotosensibilizzatori e questo è in accordo con le rese quantiche di formazione dell'ossigeno singoletto (0.6 e 0.3 rispettivamente per il BM e per il NAP). La 3-OH-chinurenina ( $\phi = 0.2$  e  $0.4 \times 10^{-2}$  rispettivamente per il BM e per il NAP) è un prodotto primario di ossidazione della chinurenina; infatti, l'idrossilazione del carbonio in posizione 3 dell'anello aromatico è il sito preferenziale [157]. La 3-OH-chinurenina è presente nel cristallino dell'occhio come filtro ed è implicato nelle reazioni di cross-linking delle catene laterali delle proteine dell'occhio [74,158]. La N-formilchinurenina ( $\phi = 0.32$  e  $0.09 \times 10^{-2}$  rispettivamente con il BM e il NAP), prodotto di doppia ossidazione del Trp, si forma dall'attacco iniziale dell'ossigeno reattivo sulla posizione C-3 del Trp [157]. La N-formilchinurenina viene frequentemente caratterizzata come prodotto primario della degradazione del Trp sia diretta che fotosensibilizzata [51,54,74]. Questo composto può agire come foto sensibilizzatore, promuovendo la degradazione del target attraverso trasferimento di energia [51].

La chinurenina, un precursore della 3-OH-chinurenina, è un prodotto secondario del Trp derivato dalla N-formilchinurenina [51,146]. È stato trovato in piccole quantità per entrambi i modelli ( $\phi = 0.07$  e  $0.02 \times 10^{-2}$  rispettivamente con il BM e il NAP). La chinurenina è anche un metabolita

dell'aminoacido e questo composto può fotoindurre la formazione di cross-linking con i residui di altre proteine ed è implicato anche nei processi di invecchiamento [158].

L'acido chinurenico fa parte della via metabolica di degradazione della chinurenina [71], ma la chinurenina si trasforma in acido chinurenico attraverso la deidrogenazione spontanea, che è catalizzata dalla luce e dal calore [68]. Di conseguenza, probabilmente proprio per le quantità basse di chinurenina riscontrate, non sono state rivelate tracce di acido chinurenico nei campioni di entrambi i modelli. Il 5-OH-triptofano, un derivato del Trp che si può formare per attacco radicalico ossidativo [61], non è stato identificato sia nel caso del BM che del NAP.

L'acido xanturenico può essere prodotto dalla 3-OH-chinurenina [159]. Le rese quantiche trovate dopo fotosensibilizzazione indotta da BM e NAP sono rispettivamente 0.006 e  $0.016 \times 10^{-2}$ . Inoltre, l'acido xanturenico formato dal metabolismo agisce esso stesso come fotosensibilizzatore [60].

La triptamina, che può essere generata dal suo precursore attraverso un meccanismo di tipo I, può essere diagnostica per danno di tipo radicalico al Trp. Questo prodotto ( $\phi = 0.067$  e  $0.45 \times 10^{-2}$  rispettivamente per il BM e il NAP), si può formare per reazioni di decarbossilazione dell'intermedio reattivo del Trp [151]. Nella fotosensibilizzazione indotta dal BM, la triptamina e la 4-OH-chinolina, sono state ottenute con basse rese quantiche rispetto al caso del NAP. Questo è in accordo con l'alta componente radicalica della fotodegradazione del NAP rispetto al BM (resa quantica di fotodegradazione: 0.52 per il BM e  $6.4 \times 10^{-2}$  per il NAP).

Questo è confermato anche per la 4-OH-chinolina ( $\phi = 0.15$  e  $0.81 \times 10^{-2}$  rispettivamente con il MB e con il NAP), che, come riportato sopra, è diagnostico per un meccanismo di tipo misto I/II [68]. Un ulteriore supporto per questa ipotesi è fornita da un esperimento in cui la formazione fotoindotta dal NAP della triptamina è fortemente ridotta in presenza della superossido

dismutasi usata come scavenger del  $\bullet\text{O}_2^-$ , ed esso raggiunge livelli sotto i limiti di rivelazione in un parallelo esperimento con il BM. Inoltre, anche la produzione della 4-OH-chinolina, anche se di meno, è influenzata dalla presenza di questo enzima.

## **10. FOTOSENSIBILIZZAZIONE INDOTTA SULLA BSA**

### **10.1 Interazione BSA-fotosensibilizzatori**

Molti farmaci si legano reversibilmente alle proteine plasmatiche come l'albumina e la glicoproteina acida R1, in modo da essere trasportate sotto forma di complesso farmaco-proteina. L'albumina per la sua abbondanza e per le sue buone proprietà di legame, rappresenta un buon modello per capire le basi fisicochimiche di questa interazione [130].

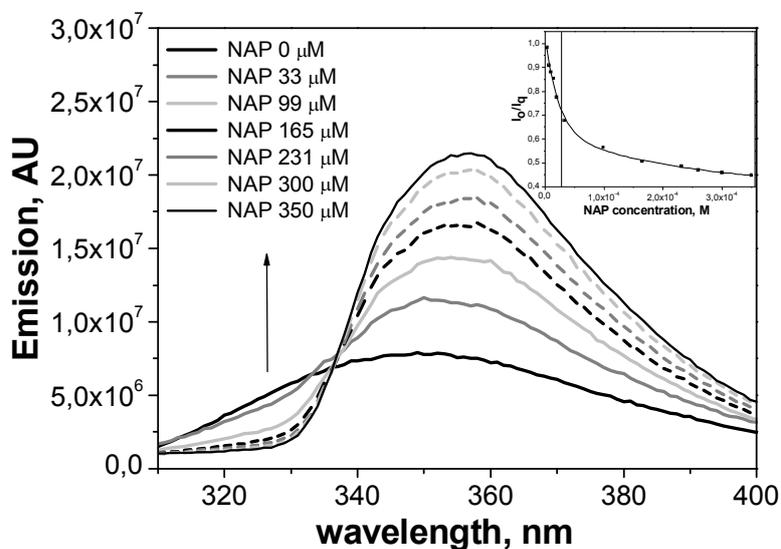
La capacità della BSA di legare composti aromatici e eterociclici è dovuta alla presenza di due regioni di legame chiamate sito I e II di Sudlow, localizzati all'interno di cavità rispettivamente nei subdomini IIA e IIIA. I due residui di Trp, Trp-134 e Trp-212, sono rispettivamente distinti in quello localizzato sulla superficie, nel loop 3 (sub-dominio IA), e quello più interno nella tasca idrofobica nel loop 4 (sub-dominio IIA) [127, 128]. Quest'ultimo è una cavità di legame ben caratterizzata per il caricamento di piccole molecole aromatiche [129]. Questa tasca idrofobica di legame permette alla BSA di aumentare la solubilità dei farmaci idrofobici nel plasma e di modulare il loro trasporto alle cellule e ai tessuti [130].

L'efficacia dei farmaci dipende dalle loro proprietà di legame e può influenzare la loro fotostabilità e fototossicità. L'informazione sull'interazione della BSA con il farmaco può facilitare la comprensione dei meccanismi di fotosensibilizzazione [160].

#### **10.1.1 Interazione BSA-NAP**

Il NAP lega la BSA in due tipi di siti di legame ( $n$ ), dove  $n_1 = 6.79$  e  $n_2 = 1.88$  [161]. Studi sulla localizzazione sul NAP e l'ibuprofene mostrano che il NAP

lega la BSA nel sito II di Sudlow, ad alta affinità di legame, e nel sito I Sudlow, a bassa affinità [162]. Come nel caso del Trp libero, l'interazione è stata studiata attraverso misure di fluorescenza. La Fig.10.1 mostra l'aumento della fluorescenza della BSA in presenza di concentrazioni crescenti di NAP.



**Fig. 10.1** Spettri di fluorescenza di una soluzione di BSA 33  $\mu\text{M}$  ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 280 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 350 nm, slits: 2.5) in PBS in presenza di concentrazioni crescenti di NAP (0-350  $\mu\text{M}$ ).

**Inserto:** grafico di Stern-Volmer relativo.

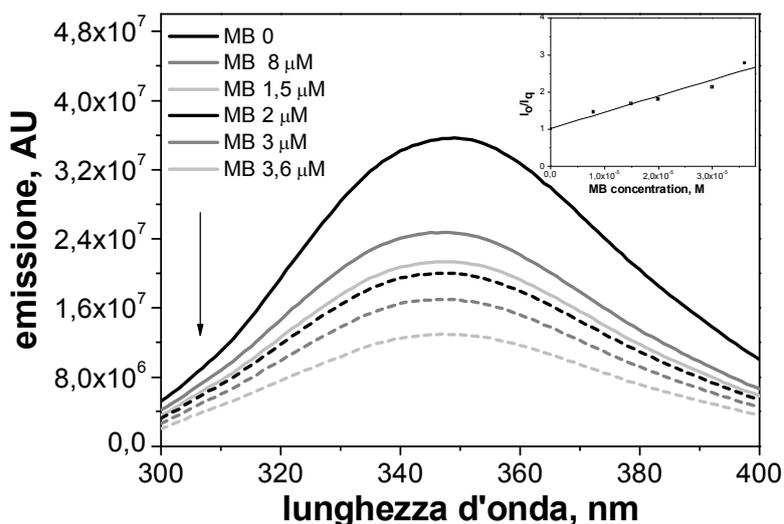
Questo risultato è stato attribuito ad un significativo legame tra il NAP e la proteina e quindi alla formazione di un complesso NAP-BSA dovuto ad interazioni elettrostatiche. Nell'inserto della Fig.10.1, è riportato il grafico di Stern-Volmer ottenuto dagli esperimenti di fluorescenza con BSA 33 $\mu\text{M}$  in presenza di concentrazioni crescenti di NAP. Tale grafico può essere analizzato dividendolo in due parti; infatti, nel grafico sono messe in relazione il rapporto tra l'emissione della BSA in assenza e in presenza del NAP ( $I_0/I_q$ ) e la concentrazione del NAP (Fig.10.1, inserto); attraverso il trattamento bi esponenziale sono state ottenute due costanti di Stern-Volmer ( $K_{\text{SV1}} = 4.5 \times 10^4$  e  $K_{\text{SV2}} = 4 \times 10^3$ ). Quindi, considerando che il tempo di vita della fluorescenza della BSA è di 6 ns [163], sono state ottenute due costanti di quenching  $7.5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  e  $6.7 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Poiché questi valori sono più alti

della costante di diffusione in acqua, è stata ipotizzata la formazione di un complesso tra il NAP e la BSA. L'andamento del grafico di Stern-Volmer è in accordo con i due tipi di siti di legame nel rapporto considerato e quindi con livello di saturazione di 1:9 (BSA:NAP).

### 10.1.2 Interazione BSA-BM

A differenza del NAP, il BM lega la BSA in un solo sito [164]. Dalla combinazione di studi cristallografici [165] e di cambiamenti conformazionali [166], è stato ipotizzato che il principale sito di legame del BM sulla BSA è localizzato nel sub-dominio IIA [111].

La Fig.10.2 mostra gli effetti del BM sulla fluorescenza della BSA. L'emissione della diminuisce in presenza concentrazione crescente di BM.



**Fig. 10.2 Spettri di fluorescenza della BSA 10 μM ( $\lambda_{ex}$ : 280 nm,  $\lambda_{em}$ : 350 nm, slits: 2.5) in PBS in presenza di concentrazioni crescenti di BM (0-3,6 μM). Insetto: grafico di Stern-Volmer relativo**

L'insetto riporta il grafico di Stern-Volmer corrispondente. In questo caso, la fluorescenza della BSA diminuisce in presenza del farmaco; in accordo con la

stechiometria di interazione BSA-BM (1:1) [164], il grafico di Stern-Volmer è lineare. Quindi, considerando la  $K_{SV}$  of  $3,9 \times 10^4$  e il tempo di vita della fluorescenza della BSA, è stata calcolata la costante di quenching che è risultata  $6.5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Come nel caso del NAP è in accordo con la letteratura [111] ed è stato ipotizzato un quenching statico e la formazione di un complesso di natura elettrostatica tra il BM e la BSA.

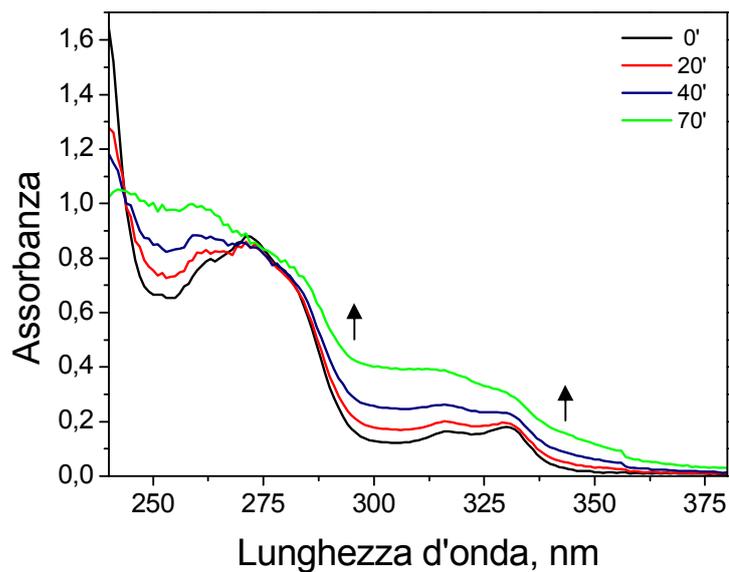
## 10.2 Fotosensibilizzazione dei residui di Trp della BSA

Il modello di fotosensibilizzatore scelto ha lo scopo di validare una tecnica sperimentale per il chiarimento dei meccanismi responsabile della fotosensibilizzazione (tipo I/II), in un sistema a maggior complessità molecolare confrontando i risultati ottenuti con quelli del modello più semplice, il Trp libero [23].

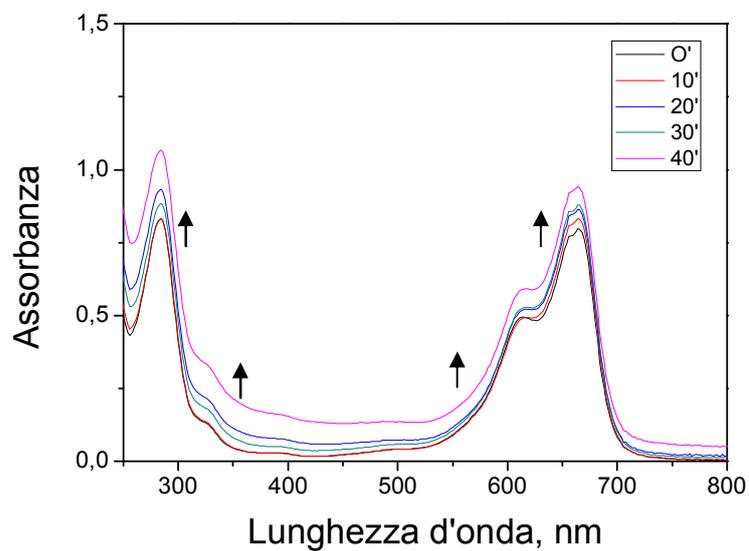
Nei campioni è stata utilizzata BSA 100  $\mu\text{M}$ , poiché la BSA contiene 2 residui di Trp [127] e quindi la concentrazione attesa dell'aminoacido è di 200  $\mu\text{M}$ . I campioni sono stati irradiati con diverse dosi di UVA. Le concentrazioni dei fotosensibilizzatori sono state scelte in modo che tutti i siti di legame della proteina fossero saturi. Come detto prima, il NAP lega la BSA in 9 siti di legame per cui la concentrazione utilizzata è di 900  $\mu\text{M}$  di NAP mentre i campioni contenenti BM i due componenti della miscela sono stati messi in rapporto 1:1 in quanto ogni molecola di BSA possiede un solo sito di legame per il BM. Tutti i campioni sono stati preparati in PBS.

In Fig.10.3 e Fig.10.4. sono riportate le variazioni spettrali di una soluzione di BSA in presenza di NAP e BM a vari tempi di irradiazione. Dopo l'irradiazione è stata seguita la degradazione dei fotosensibilizzatori e del Trp e la formazione dei rispettivi fotoprodotti.

Per effettuare questa analisi è stato necessario isolare il Trp e i suoi fotoprodotti contenuti nella proteina, mediante il metodo dell'idrolisi basica o il metodo enzimatico già descritti nella sezione materiali e metodi.



**Fig.10.3: Variazione dello spettro di assorbimento della miscela di reazione (NAP 90  $\mu$ M, BSA 10  $\mu$ M) a vari tempi di irradiazione.**



**Fig.10.4: Variazione dello spettro di assorbimento del BM (10 $\mu$ M) in presenza di BSA (10 $\mu$ M) a vari tempi di irradiazione.**

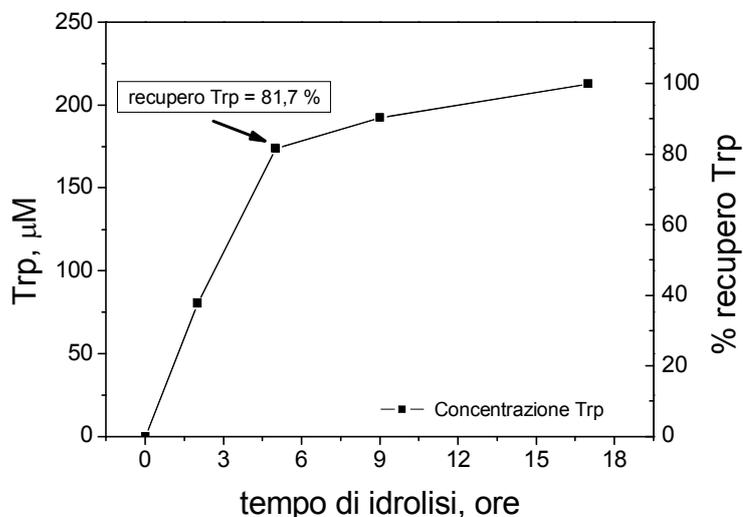
### **10.3 Ottimizzazione del protocollo sperimentale nel recupero del Trp dal BSA.**

L'esigenza di utilizzare due diversi metodi per idrolizzare la proteina, deriva dal fatto che alcuni fotoprodotti del Trp (chinurenina, N-formilchinurenina, acido xanturenico) si degradano nelle condizioni drastiche dell'idrolisi basica. Noto che la BSA contiene due residui di Trp è ipotizzabile che in condizioni ottimali tramite un processo di idrolisi basica a 100° C si possa recuperare il 100% del Trp; quindi, da una soluzione 100 µM di BSA si dovrebbe ottenere una soluzione 200 µM di Trp. A tale scopo, da prove precedentemente effettuate si è visto che un tempo ottimale di idrolisi basica è di 17 ore. I fotoprodotti del Trp però potrebbero essersi formati a causa dell'azione idrolitica dell'NaOH e non dell'azione dei fotosensibilizzatori attivati dai raggi UVA. Inoltre con un tempo di idrolisi di 17 ore è ipotizzabile che anche eventuali fotoprodotti vadano incontro a degradazione e non possano essere più rivelati. Un altro possibile effetto del processo di idrolisi basica potrebbe essere la trasformazione di un fotoprodotto in un altro prodotto (corrispondente o no ad un fotoprodotto dovuto all'irradiazione con i raggi UV). Per analizzare tutte queste eventualità e ottimizzare il metodo sono state effettuate delle prove di idrolisi consistenti nell'idrolisi basica in stufa a 100° C dei diversi composti, per diversi tempi di idrolisi.

I composti sottoposti alle prove di idrolisi sono la BSA, il Trp e i possibili fotoprodotti (4-OH-chinolina, triptamina, acido xanturenico, N-formilchinurenina, chinurenina, 3-OH-chinurenina) e infine è stato testato il NAP e i rispettivi fotoprodotti (6-MAN, derivato alcolico, derivato decarbossilato). Ciascun composto è stato trattato per 5 diversi tempi di idrolisi (0 ore, 2 ore, 5 ore, 9 ore, 17 ore).

Dopo essere stati centrifugate, aliquote dei campioni sono stati iniettati in HPLC e analizzati con gli adeguati sistemi di rivelazione.

In Fig.10.5 è mostrata la percentuale di recupero del Trp dalla BSA ai diversi tempi di idrolisi basica.



**Fig.10.5 Recupero del Trp dal BSA tramite idrolisi basica**

Da una soluzione BSA 100 µM dopo 5 ore di trattamento è stato recuperato l'80% di Trp. Vista l'alta percentuale di recupero dell'amminoacido, 5 ore sembrerebbe il tempo ottimale.

Il Trp libero, sottoposto ad idrolisi, subisce un processo di degradazione soprattutto nelle prime due ore. Da tale tempo di idrolisi fino a 17 ore non ci sono grosse differenze, quindi ancora una volta 5 ore sembra il tempo ottimale.

Per quanto riguarda i fotoprodotto del Trp non tutti si comportano allo stesso modo ai diversi tempi di idrolisi.

Per la 4-OH-chinolina, la maggior parte della degradazione avviene nelle prime due ore di idrolisi; dopo 5 ore se ne degrada circa il 40%. La triptamina si degrada per circa il 20% mentre la 3-OH-chinurenina rimane pressoché inalterata quindi, concordando con la necessità di recuperare una buona percentuale di Trp dal BSA, si può dire che 5 ore di idrolisi possono bastare.

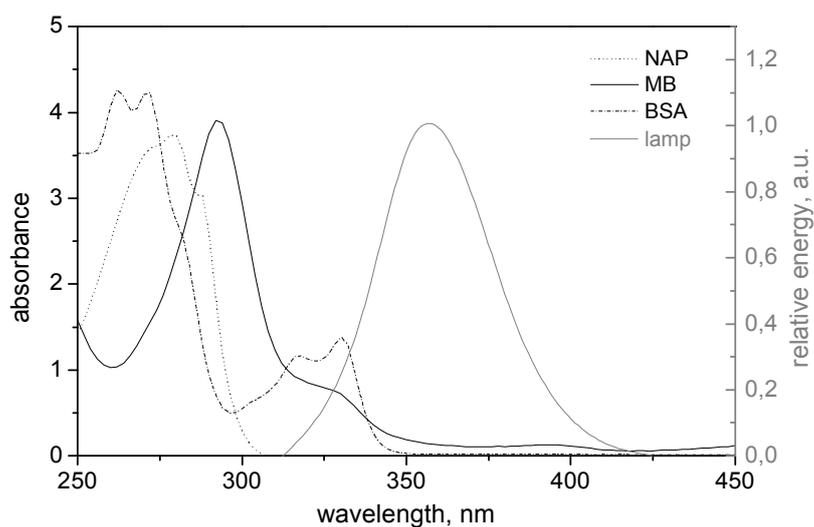
La chinurenina invece subisce una degradazione totale già dopo 2 ore di trattamento. Inoltre si è visto che la N-formilchinurenina dopo aggiunta di NaOH e immediata neutralizzazione con HCl, si trasforma in chinurenina che come detto prima si degrada velocemente. Anche l'acido xanturenico risulta totalmente degradato sottoponendolo ad un'idrolisi basica per 2 ore. Per la determinazione dei fotoprodotti nei campioni irradiati non è possibile eseguire un'idrolisi di 2 ore perché tale tempo non assicura un efficiente recupero del Trp, mentre è stato osservato che un tempo di idrolisi ottimale per il recupero dell'amminoacido dall'intera proteina non deve essere inferiore alle 5 ore (Fig. 10.5). Quindi, per analizzare le cinetiche di formazione dei fotoprodotti che si degradano in queste condizioni, è stato usato un metodo alternativo tramite gli enzimi litici (vedere materiali e metodi).

## 10.4 Fotodegradazione e formazione dei prodotti: BSA.

La strategia utilizzata per l'identificazione e la quantificazione dei diversi composti nel caso del Trp libero è stata applicata anche nel caso della BSA.

### 10.4.1 Cinetiche di fotodegradazione e formazione dei prodotti: NAP

Il NAP 900  $\mu\text{M}$  è stato irradiato con diverse dosi di UVA in presenza di BSA 100  $\mu\text{M}$  in PBS 10 mM pH 7.4. Queste condizioni assicurano la completa saturazione dei siti della BSA. Inoltre, la concentrazione di NAP è sufficiente per ottenere una frazione di luce assorbita trascurabile nel range di emissione della lampada (Fig.10.6). Questo perchè si ha la sovrapposizione degli spettri di assorbimento dei fotosensibilizzatori e del target con quello della lampada.

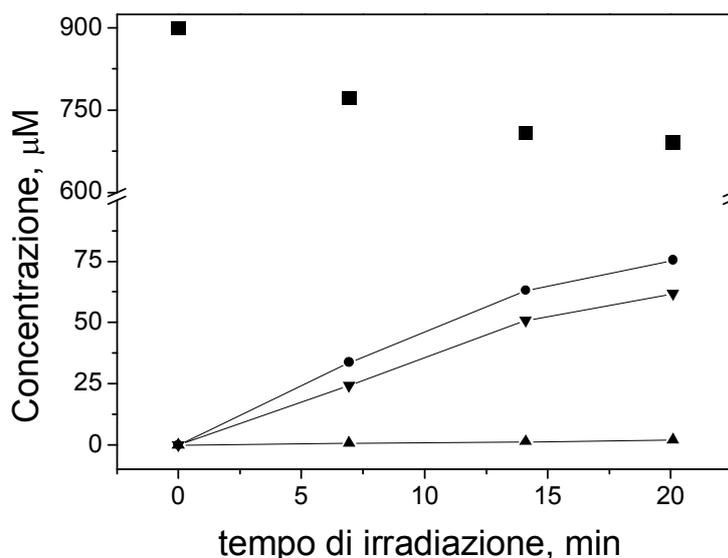


**Fig.10.6 Confronto tra gli spettri di assorbimento della BSA, del NAP, del MB e di emissione della lampada**

La valutazione quantitativa dei fotoprodotti è stata effettuata considerando le loro proprietà in emissione ed è supportata da ESI-MS [27]. Tra i fotoprodotti del NAP, la formazione del 6-MAN (6-methoxy-2-acetonaphthone) e del

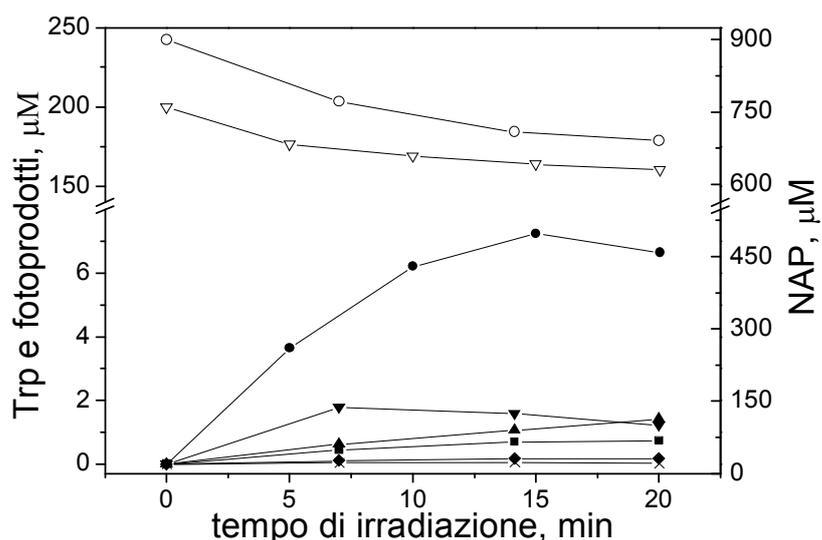
derivato idrossilico (6-methoxy-2-(1-hydroxyethyl)-naphthalene) è consistente con la formazione di  $^1\text{O}_2$ , mentre il rimanente fotoprodotto è il derivato decarbossilato (6-methoxy-2-ethyl-naphthalene) originatosi per fotoionizzazione [25]. Il NAP si degrada per il 25 % entro 20 minuti di irradiazione.

La formazione dei fotoprodotto è consistente: dopo 20 minuti di irradiazione, si formano 6-MAN 70  $\mu\text{M}$ , derivato idrossilico 75  $\mu\text{M}$  e decarbossilato 2.2  $\mu\text{M}$  (Fig.10.7).



**Fig.10.7 Fotodegradazione del NAP 900  $\mu\text{M}$  (-■-) e formazione dei fotoprodotto in presenza di BSA 100  $\mu\text{M}$  in PBS (pH 7.4) in funzione del tempo di irradiazione: derivato alcolico (-●-), derivato decarbossilato (-▲-) e 6-MAN(-▼-).**

La Fig.10.8 mostra le cinetiche di degradazione del Trp e di formazione dei suoi fotoprodotto ottenute negli stessi esperimenti.



**Fig.10.8. Fotosensibilizzazione del Trp 200  $\mu\text{M}$  (isolato dalla BSA) indotta dal NAP 900  $\mu\text{M}$  in PBS (pH 7.4) in funzione del tempo di irradiazione. Fotodegradazione del Trp ( $-\nabla-$ ) e del NAP ( $-\circ-$ ). Formazione dei derivati del Trp: 4-OH-chinolina ( $-\bullet-$ ), triptamina ( $-\blacksquare-$ ), chinurenina ( $-\blacklozenge-$ ), 3-OH-chinurenina ( $-\blacktriangle-$ ), N-formilchinurenina ( $-\nabla-$ ), acido xanturenico ( $-\times-$ ).**

La concentrazione iniziale di Trp 200  $\mu\text{M}$  riflette la presenza di due residui di Trp nella BSA [127]. La fotodegradazione del Trp procede linearmente in maniera dose-dipendente. In presenza di NAP, dopo 20 minuti di irradiazione, circa il 20 % del target si degrada. Nella Fig.10.8 è riportato anche la degradazione del NAP per confronto. La Fig.10.8 mostra anche la fotogenerazione dei derivati del Trp 4-OH-chinolina, triptamina, chinurenina, N-formilchinurenina, 3-OH-chinurenina e acido xanturenico. Generalmente questi prodotti si formano per irradiazione diretta UVA-VIS [65,68], UVC [72], o irradiazione solare [64]; in alcuni casi, sono anche metaboliti [58,63,150].

Alcuni di questi fotoprodotti si formano principalmente attraverso l'ossigeno singoletto [50, 146]. Come nel caso della fotosensibilizzazione sul Trp libero [23], i derivati del Trp, acido xanturenico, 4-OH-chinolina, triptamina e 3-OH-chinurenina sono stati ottenuti per la prima volta dai processi di

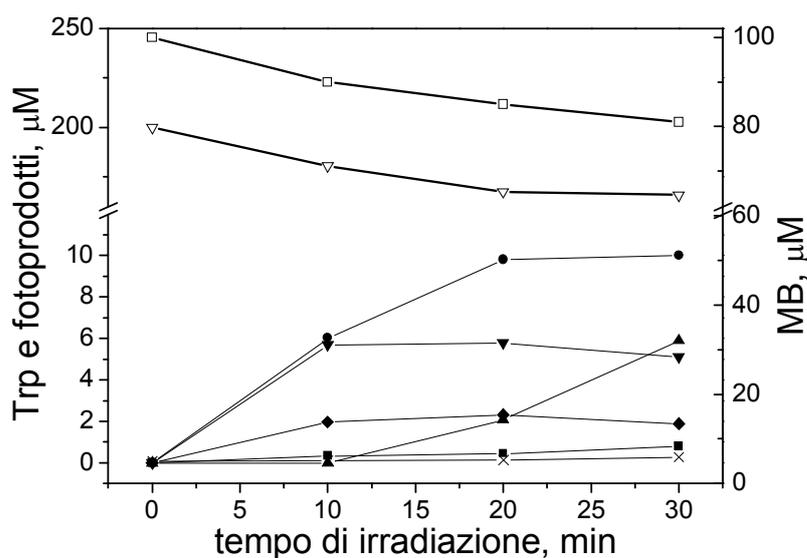
fotosensibilizzazione UVA. La 4-OH-chinolina è il prodotto più abbondante. Questo composto è un caratteristico prodotto del metabolismo ossidativo del Trp [48] ed è stato precedentemente trovato solo dopo diretto trattamento del Trp con luce UVA-Vis [65]. Inoltre, questo composto è stato osservato in modificazioni fotomediate dall'anione superossido dovute a reazioni che comprendono deaminazione e decarbossilazione ( $\Phi = 2 \times 10^{-5}$  in argon,  $1 \times 10^{-4}$  in soluzioni sature di ossigeno); quindi questo composto può essere considerato un fotoprodotto diagnostico per un meccanismo misto tipo I/II [68]. Dopo irradiazioni prolungate, la 4-OH-chinolina diminuisce drasticamente: precedenti studi sulle membrane evidenziano il coinvolgimento del 6-MAN nel danno alle membrane [36]. In un esperimento parallelo, è stato verificato che questo fotoprodotto del NAP è capace di indurre la degradazione della 4-OH-chinolina. Infatti, la 4-OH-chinolina 40  $\mu\text{M}$  irradiata in presenza o in assenza di NAP 120  $\mu\text{M}$  rimane inalterata, mentre quando l'irradiazione di 4-OH-chinolina 15  $\mu\text{M}$  avviene in presenza di 6-MAN 10  $\mu\text{M}$ , il 30% di 4-OH-chinolina viene degradato.

Altri fotoprodotti del Trp sono prodotti con rese più basse (Fig.10.8). Dopo 7 minuti di irradiazione, quando circa il 10% del fotosensibilizzatore e del target vengono degradati, sono stati quantificate la N-formilchinurenina (1.8  $\mu\text{M}$ ) e la 3-OH-chinurenina (0.65  $\mu\text{M}$ ), due prodotti caratteristici per un meccanismo di tipo II [50, 146]. Inoltre si forma anche la triptamina (0.5  $\mu\text{M}$ ) che è un composto indicativo per un meccanismo di tipo I [151]. Sono stati prodotti anche bassi livelli di chinurenina (0.16  $\mu\text{M}$ ) e acido xanturenico (0.05  $\mu\text{M}$ ), altri due composti caratteristici per un meccanismo di tipo II. Non sono state rivelate tracce di 5-OH-triptofano e acido chinurenico. Questi dati confermano i precedenti risultati che definiscono che la fotosensibilizzazione indotta dal NAP su Trp avviene attraverso la combinazione di entrambi i meccanismi tipo I e II [23].

Per confermare il ruolo dell'ossigeno singoletto nel meccanismo di fotosensibilizzazione, anche nel caso della BSA, sono stati effettuati degli esperimenti in cui l' $\text{H}_2\text{O}$  è stata sostituita con la  $\text{D}_2\text{O}$ . In queste condizioni, come ottenuto per il Trp libero, la cinetica di degradazione del Trp è più veloce rispetto alle condizioni normali confermando il coinvolgimento dei radicali (Tipo II) nella fotosensibilizzazione sul Trp. Questa osservazione è supportata dai valori delle rese quantiche di formazione dei fotoprodotto del Trp: la N-formilchinurenina e la chinurenina, diagnostici per un meccanismo tipo II, presentano rese leggermente più alte, mentre diminuisce quella della triptamina, composto di tipo I.

### 10.4.2 Cinetiche di fotodegradazione e formazione dei prodotti:NAP

Dal confronto con i risultati osservati dalla fotosensibilizzazione indotta dal NAP si evince che la distribuzione dei fotoprodotti nel caso del BM è diversa. La Fig.10.9 mostra la degradazione del Trp e la formazione dei suoi fotoprodotti dalla BSA (100  $\mu\text{M}$ ) in presenza di MB (100  $\mu\text{M}$ ) in funzione di diverse dosi di UVA. Dopo 30 minuti di irradiazione si degrada il 17 % di Trp.



**Fig.10.9. Fotosensibilizzazione del Trp 200  $\mu\text{M}$  (isolato dalla BSA) indotta dal BM 100  $\mu\text{M}$  in PBS (pH 7.4) in funzione del tempo di irradiazione. Degradazione del Trp (- $\nabla$ -) e del BM (- $\square$ -). Formazione dei derivati del Trp: 4-OH-chinolina (- $\bullet$ -), triptamina (- $\blacksquare$ -), chinurenina (- $\blacklozenge$ -), 3-OH-chinurenina (- $\blacktriangle$ -), N-formilchinurenina (- $\blacktriangledown$ -), acido xanturenico (- $\times$ -).**

Il BM si degrada circa per il 10% mentre il suo fotoprodotto, la 10-H-fenotiazina [140] rimane al di sotto di una concentrazione di 1  $\mu\text{M}$ . La formazione di questo composto è dovuto al processo di fotoionizzazione [140]. Infatti, i fotoprodotti del Trp più abbondanti sono la 4-OH-chinolina, composto di tipo misto tipo I/II e la N-formil-chinurenina, di tipo II. Dopo 10

minuti di irradiazione, questi composti si formano rispettivamente ad una concentrazione di 6  $\mu\text{M}$  e 5.7  $\mu\text{M}$ . Ad elevate dosi di UVA, la concentrazione di N-formil-chinurenina diventa costante, mentre quella della 4-OH-chinolina aumenta e a 30 minuti è di circa 10  $\mu\text{M}$ . Il trend della formazione fotoindotta della 4-OH-chinolina differisce da quella osservata nel caso del NAP, escludendo qui il coinvolgimento dei fotoprodotti del BM. La 3-OH-chinurenina non è quantificabile entro 10 minuti di irradiazione, ma lo diventa a dosi più alte. Infatti, dopo 30 minuti di irradiazione si formano 5.9  $\mu\text{M}$  di 3-OH-chinurenina. Gli altri derivati del Trp sono prodotti in basse concentrazioni. Dopo 10 minuti di irradiazione si formano chinurenina (2  $\mu\text{M}$ ) e piccole concentrazioni di triptamina (0.34  $\mu\text{M}$ ) e acido xanturenico (0.12  $\mu\text{M}$ ). Come nel caso del Trp libero [23], si ottengono acido xanturenico, 4-OH-chinolina, triptamina e 3-OH-chinurenina per la prima volta da fotosensibilizzazione UVA.

Come per il NAP, anche per il BM sono stati effettuati degli esperimenti in  $\text{D}_2\text{O}$ . Anche in questo caso le rese di degradazione del Trp sono più veloci e viene influenzata la distribuzione dei fotoprodotti del Trp: aumentano le rese di formazione della N-formilchinurenina e della chinurenina (Tipo II), la 3-OH-chinurenina rimane pressoché invariata mentre quella della 4-OH-chinolina diminuisce. Non è stato possibile quantificare la triptamina in quanto sotto i livelli di detenzione; questo conferma il carattere radicalico del meccanismo di formazione di questi ultimi due fotoprodotti.

## 10.5 Confronto tra i sistemi BM-BSA e NAP-BSA

Un confronto tra i due sistemi sembra utile per investigare il meccanismo di fotosensibilizzazione delle proteine e per capire come la complessità molecolare del substrato possa influenzare il processo di fotosensibilizzazione. Un'analisi delle rese quantiche di fotodegradazione dei fotosensibilizzatore e dei target, così come quelle di formazione dei fotoprodotti, è utile per studiare il meccanismo. In Tab.10.1 sono messi a confronto i valori delle rese quantiche calcolate per il BM e il NAP in presenza e in assenza di D<sub>2</sub>O.

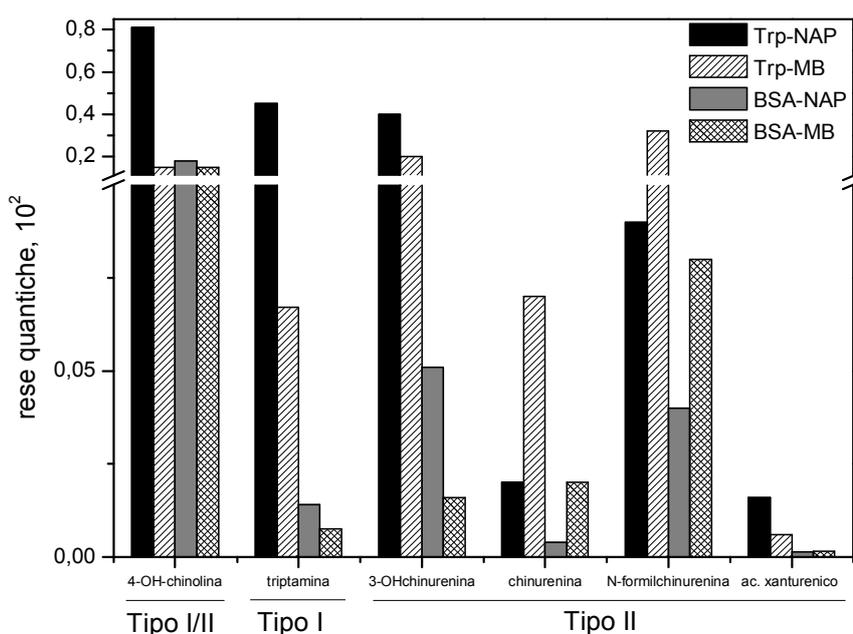
La resa quantica di fotodegradazione del NAP diminuisce leggermente nella BSA rispetto al Trp ( $6$  e  $6.4 \times 10^{-2}$ ), mentre nel caso del BM i valori variano leggermente ( $0.48 \times 10^{-2}$  e  $0.52 \times 10^{-2}$ ). Inoltre, rispetto al modello più semplice, la resa quantica di degradazione del Trp rimane inalterata nel caso del BM ( $0.62 \times 10^{-2}$ ), mentre aumenta leggermente nel caso del NAP (Trp  $0.8 \times 10^{-2}$ ; BSA  $1 \times 10^{-2}$ ). Comunque, anche se la resa di degradazione del Trp in presenza di NAP e BM sono comparabili, quelle dei due fotosensibilizzatore sono piuttosto diverse. Questo è in accordo con il fatto che il BM è un fotosensibilizzatore di tipo II ideale; il suo stato eccitato è resistente alla fotoionizzazione e il trasferimento di energia è il principale processo favorendo la produzione di ossigeno singoletto. D'altra parte, l'alta resa quantica di degradazione del NAP suggerisce un'elevata produzione di radicali. Questo è supportato dalla diversa distribuzione dei fotoprodotti nei due casi. La triptamina (tipo I) presenta la resa quantica di formazione più alta ( $0.014 \times 10^{-2}$ ) nel sistema BSA-NAP rispetto quello BSA-MB ( $0.0075 \times 10^{-2}$ ). Inoltre, i prodotti diagnostici per un meccanismo tipo II, 3-OH-chinurenina, chinurenina, N-formilchinurenina e acido xanturenico presentano rese quantiche più elevate nel caso del BM (rispettivamente  $0.051 \times 10^{-2}$ ,  $0.02 \times 10^{-2}$ ,  $0.08 \times 10^{-2}$ ,  $0.0015 \times 10^{-2}$ ) rispetto al NAP (rispettivamente  $0.016 \times 10^{-2}$ ,

$0.004 \times 10^{-2}$ ,  $0.04 \times 10^{-2}$ ,  $0.0013 \times 10^{-2}$ ). Il principale fotoprodotto generato da entrambi i fotosensibilizzatore è la 4-OH-chinolina, composto diagnostico per un meccanismo di tipo misto I/II; la resa quantica di formazione di questo composto è più alta nel caso del NAP ( $0.18 \times 10^{-2}$ ) rispetto al BM ( $0.15 \times 10^{-2}$ ), probabilmente dovuto alla prevalenza del meccanismo radicalico nel pathway di formazione della 4-OH-chinolina.

	Tampono PB in H <sub>2</sub> O				Tampono PB in D <sub>2</sub> O			
	MB/BSA		NAP/BSA		MB/BSA		NAP/BSA	
	$\Phi_{\text{degr.}}$	$\Phi_{\text{form.}}$	$\Phi_{\text{degr.}}$	$\Phi_{\text{form.}}$	$\Phi_{\text{degr.}}$	$\Phi_{\text{form.}}$	$\Phi_{\text{degr.}}$	$\Phi_{\text{form.}}$
<b>MB</b>	<b>0.48</b>							
<b>10-H-fenotiazina</b>								
<b>NAP</b>			<b>6</b>					
<b>6-MAN</b>				<b>0.95</b>				
<b>NAP derivato alcolico</b>				<b>1.15</b>				
<b>NAP derivato decarbossilato</b>				<b>0.02</b>				
<b>Trp</b>	<b>0.625</b>		<b>0.8</b>		<b>0.85</b>		<b>1</b>	
<b>4-OH-chinolina</b>		<b>0.15</b>		<b>0.18</b>		<b>0.05</b>		<b>0.016</b>
<b>Triptamina</b>		<b>0.0075</b>		<b>0.014</b>				<b>0.002</b>
<b>3-OH-chinurenina</b>		<b>0.051</b>		<b>0.016</b>		<b>0.55</b>		<b>0.018</b>
<b>Chinurenina</b>		<b>0.02</b>		<b>0.004</b>		<b>0.03</b>		<b>0.005</b>
<b>N-formilchinurenina</b>		<b>0.08</b>		<b>0.04</b>		<b>0.1</b>		<b>0.09</b>
<b>acido xanturenico</b>		<b>0.0015</b>		<b>0.0013</b>				

**Tab.10.1. Rese di degradazione del target e dei fotosensibilizzatore e di formazione dei fotoprodotti (i valori sono riportati in  $\times 10^2$ ).**

Inoltre nella maggior parte dei casi le rese quantiche di formazione dei fotoprodotti sono più basse rispetto a quelle ottenute nel modello del Trp libero [23] (Fig.10.10). Questo può essere spiegato considerando che la BSA è un modello più complesso rispetto all'aminoacido isolato, quindi le specie attive generate durante la fotolisi del fotosensibilizzatore agiscono su più substrati.



**Fig.10.10. Confronto tra le distribuzioni dei fotoprodotti del Trp nei due modelli: Trp libero e BSA**

## 11. Ruolo dell'ossigeno singoletto: misure risolte nel tempo

Il ruolo giocato dall'ossigeno singoletto nel danno fotoindotto nei sistemi più complessi non è del tutto chiaro. Questo è dovuto alla sua localizzazione spaziale nel modello considerato. La produzione di ossigeno singoletto in un determinato compartimento è anche influenzata dalla capacità di diffusione durante il suo tempo di vita ma anche dal cambiamento di polarità e viscosità ambientale. Il tempo di vita dell'ossigeno singoletto di una soluzione di BM 120  $\mu\text{M}$  preparata in tampone PB 10 mM in  $\text{D}_2\text{O}$  (pH 7.4) è  $66.5 \pm 2 \mu\text{s}$ ; questo valore è in accordo con i dati riportati in letteratura ( $68.1 \pm 2.5 \mu\text{s}$ , [167]). In presenza di BSA 120  $\mu\text{M}$ , il tempo di vita diminuisce rispetto al BM da solo ( $12.4 \pm 0.4 \mu\text{s}$ ). Questo può essere dovuto al fatto che, una volta che si è formato in un sistema così complesso come la proteina, l'ossigeno singoletto non può diffondere per lunghe distanze. La significativa riduzione del tempo di vita dell'ossigeno singoletto può essere dovuta al quenching da parte della macromolecola proteica [168]. Nelle nostre condizioni sperimentali in cui l'ossigeno singoletto si forma nel subdominio IIA vicino a uno dei due residui di Trp, i risultati indicano chiaramente che il quenching correlato alla proteina non determina la disattivazione dell'ossigeno singoletto. Se noi assumiamo che la costante di quenching di una soluzione di BSA,  $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [169], è applicabile al nostro studio in cui è stata utilizzata una concentrazione di BSA di 120  $\mu\text{M}$ , dovremmo ottenere un valore di  $\tau_d$  di 13.3  $\mu\text{s}$  in una soluzione PB preparata con  $\text{D}_2\text{O}$ . Questo valore atteso è, infatti, in accordo con il nostro valore sperimentale di 12.4  $\mu\text{s}$ . Con un tale valore di tempo di vita, l'ossigeno singoletto formatosi nel nostro sistema diffonde in modo da allontanarsi dal Trp. Ciò è in accordo con alcuni autori che hanno misurato il quenching dell'ossigeno singoletto per l'albumina umana usando due coloranti che legano la proteina [170]. Questi

autori confermano che parte dell'ossigeno singoletto fotogeneratosi fuoriesce dalla macromolecola.

Per confronto, il tempo di vita dell'ossigeno singoletto è stato misurato anche nel sistema più semplice BM/Trp (rispettivamente 120 e 60  $\mu\text{M}$ ); il tempo di vita diminuisce e risulta  $55 \pm 2 \mu\text{s}$ . In questo caso, considerando una costante di quenching di  $3.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [171], il valore sperimentale è in buon accordo con il valore atteso di 59  $\mu\text{s}$ .

Attraverso il confronto delle aree integrate di misure risolte nel tempo dell'intensità di emissione a 1264 nm, sono state calcolate le rese quantiche di ossigeno singoletto usando il BM come standard; il valore della resa del BM in acqua è di 0.6 [42] anche se questo valore varia in base al tipo di solvente, le condizioni di reazione e le tecniche usate. Nelle nostre condizioni sperimentali, le rese quantiche in presenza di 120  $\mu\text{M}$  BSA e 60  $\mu\text{M}$  Trp sono risultate rispettivamente 0.25 e 0.54.

Purtroppo, non è stato possibile effettuare lo stesso tipo di misure per il NAP nelle stesse condizioni in quanto il NAP non assorbe nella lunghezza d'onda di eccitazione del laser.

## 12. FOTSENSIBILIZZAZIONE INDOTTA SUL LIEVITO *Saccharomyces cerevisiae*

### 12.1 Concentrazione intracellulare dei fotosensibilizzatori

I campioni sono stati preparati con la stessa metodica di quelli usati per l'irradiazione. Dopo un'ora di incubazione con il NAP 900  $\mu\text{M}$  o BM 100  $\mu\text{M}$ , le cellule sono state lavate per rimuovere il farmaco extracellulare e successivamente risospese in 200 ml di PBS.

Nel caso del NAP il campione è stato centrifugato e il pellet è stato idrolizzato con NaOH, analogamente al metodo utilizzato per la quantificazione del Trp. La concentrazione intracellulare di NAP, quindi, è stata calcolata, dopo idrolisi basica, attraverso la determinazione fluorimetrica in HPLC ( $\lambda_{\text{exc}}$  330,  $\lambda_{\text{em}}$  357) e, tenendo conto che il volume intracellulare della cellula di lievito è di 120 fL, è risultata 85  $\mu\text{M}$ . La determinazione del NAP intracellulare attraverso questo metodo è stata possibile in quanto in precedenti esperimenti è stato osservato che il NAP non viene modificato durante le condizioni drastiche in cui avviene l'idrolisi basica mentre il BM, invece, si degrada; per questo per la determinazione del BM intracellulare è stato usato un metodo alternativo.

Nel caso del BM, infatti, il pellet ottenuto dopo l'incubazione e i lavaggi, è stato incubato per 3 ore con la Liticasi (da *Arthrobacter Luteus*), un enzima che rompe la parete cellulare; dopo centrifugazione, al pellet è stato aggiunto il tampone di lisi liberando così il BM intracellulare; il campione è stato poi centrifugato e il surnatante è stato analizzato spettrofotometricamente. In questo modo tenendo conto del volume intracellulare e dell'epsilon del BM è stata calcolata la concentrazione intracellulare che è risultata 90  $\mu\text{M}$ .

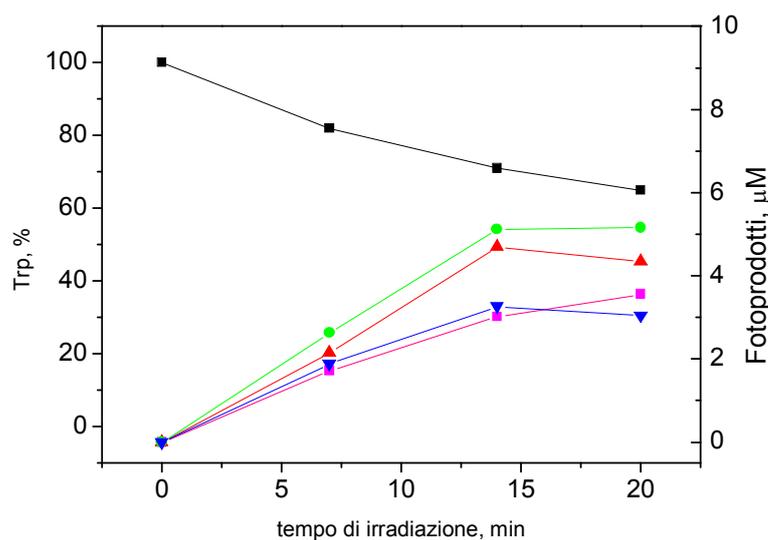
## 12.2 Fotoossidazione del Trp nei lieviti

In questo modello, l'indagine sulla fotoossidazione del Trp è risultata più articolata sia per la complessità del modello, sia perché nella cellula, oltre al Trp proteico, esso è presente in forma libera. Inoltre molti fotoprodotti del Trp sono anche metaboliti per cui possono essere già presenti all'interno della cellula in quanto metaboliti e non come fotoprodotti.

Ogni cellula di lievito di *Saccharomyces cerevisiae* contiene  $6 \cdot 10^{-14}$  g di Trp. In ogni campione sono state utilizzate  $1,8 \times 10^6$ /ml, quindi in un campione di 200 ml,  $360 \times 10^6$  cell; la concentrazione attesa di Trp nel volume finale ottenuto dopo idrolisi (circa 1,2 ml) sarà quindi di circa 90  $\mu$ M.

### 12.2.1 Fotoossidazione del Trp nei lieviti indotta dal NAP

L'andamento della fotodegradazione del Trp è in accordo con i risultati ottenuti nei modelli più semplici. La Fig.12.1 mostra la degradazione del Trp e la formazione dei suoi fotoprodotti in presenza di NAP in funzione di diverse dosi di UVA. Nel caso del NAP dopo 20 minuti di irradiazione si degrada più del 30 % del Trp. A tale degradazione corrisponde la formazione dei fotoprodotti dell'aminoacido. I due derivati che si formano in maggior quantità sono la chinurenina (meccanismo tipo II) e la 4-OH-chinolina (meccanismo tipo misto I/II), infatti, dopo 15 minuti di irradiazione le concentrazioni sono rispettivamente 5,2 e 4,7  $\mu$ M. Inoltre, anche la triptamina (tipo I) e la N-formilchinurenina (tipo II) si formano in quantità apprezzabili; dopo 15 minuti di irradiazione, infatti ne sono stati quantificati rispettivamente 2,7 e 3,2  $\mu$ M. Questi valori sembrano essere in accordo con il carattere radicalico del meccanismo del NAP, ma per razionalizzare meglio i risultati sono state calcolate le rese quantiche di degradazione del Trp e di formazione dei suoi fotoprodotti (Tab.12.1).

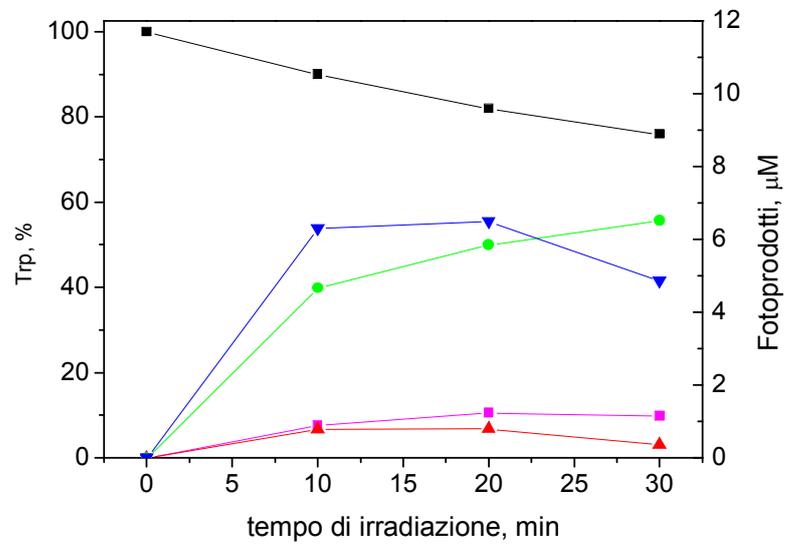


**Fig.12.1. Fotodegradazione del Trp (-■-) estratto da *Saccharomyces cerevisiae* indotta da NAP e formazione di suoi fotoprodotti: chinurenina (-●-), N-formilchinurenina (-▼-), triptamina (-■-) e 4-OH-chinolina (-▲-).**

### 12.2.2 Fotoossidazione del Trp nei lieviti indotta dal BM

La Fig.12.2 mostra la degradazione del Trp e la formazione dei suoi fotoprodotti in presenza di BM in funzione di diverse dosi di UVA. Dopo 20 minuti di irradiazione si degrada più del 20 % del Trp, quindi la cinetica di degradazione del Trp è più lenta. Come riscontrato nei modelli più semplici, anche in questo caso la formazione dei fotoprodotti del Trp indotta dal BM risulta essere diversa da quella del NAP. Infatti, i principali fotoprodotti che si formano sono la N-formilchinurenina (6,5 µM) e la chinurenina (6 µM), entrambi diagnostici per un meccanismo di tipo II. A tale degradazione corrisponde la formazione dei fotoprodotti dell'aminoacido. Come atteso, i fotoprodotti indicativi per un meccanismo di tipo II, la triptamina, e per un meccanismo misto tipo I/II, la 4-OH-chinolina, si formano in quantità minori, rispettivamente 1,3 e 0,8 µM. Come per il NAP, anche nel caso del BM sono

state calcolate le rese quantiche di degradazione del Trp e di formazione dei suoi fotoprodotto (Tab.12.1).



**Fig.12.2.** Fotodegradazione del Trp (-■-) estratto da *Saccharomyces cerevisiae* indotta da BM e formazione di suoi fotoprodotto: chinurenina (-●-), N-formilchinurenina (-▼-), triptamina (-■-) e 4-OH-chinolina (-▲-).

	Trp libero (10 <sup>2</sup> )				BSA (10 <sup>2</sup> )				<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (10 <sup>4</sup> )			
	MB/Trp		NAP/Trp		MB/Trp		NAP/Trp		MB/Trp		NAP/Trp	
	φ degr.	φ form.	φ degr.	φ form.	φ degr.	φ form.	φ degr.	φ form.	φ degr.	φ form.	φ degr.	φ form.
<b>Trp</b>	0.62		1.0		0.625		0.8		3,4		5,6	
<b>4-OH-chinolina</b>		0.15				0.15		0.18		0,15		1,11
<b>triptamina</b>		0.067				0.007 5		0.01 4		0,23		0,84
<b>3-OH-chinurenina</b>		0.2				0.051		0.01 6				
<b>chinurenina</b>		0.07				0.02		0.00 4		1,8		1,22
<b>N-formilchinurenina</b>		0.32				0.08		0.04		2,4		1
<b>Acido xanturenico</b>		0.006				0.001 5		0.00 13				

Tab.12.2 Confronto tra le rese quantiche di degradazione del Trp e di formazione dei suoi fotoprodotti nei tre modelli a crescente complessità molecolare: Trp libero, BSA, *Saccharomyces cerevisiae*.

### 12.2.3 Confronto tra i modelli BM e NAP

Come detto prima, per confrontare meglio i dati ottenuti nei due sistemi e valutare il meccanismo di fotosensibilizzazione, sono state calcolate le rese quantiche di degradazione del Trp e di formazione dei suoi fotoprodotti (Tab.12.1) I valori delle rese di degradazione di Trp sono rispettivamente

$3,4 \times 10^{-4}$  e  $5,6 \times 10^{-4}$  per il BM e il NAP. Inoltre le rese dei fotoprodotti confermano i risultati ottenuti nei modelli più semplici. Infatti, quelle dei fotoprodotti indicativi per un meccanismo di tipo II, chinurenina e N-formilchinurenina, risultano più elevati nel caso del BM (rispettivamente  $1,8 \times 10^{-4}$  e  $2,4 \times 10^{-4}$ ) rispetto al NAP (rispettivamente  $1,22 \times 10^{-4}$  e  $1 \times 10^{-4}$ ) mentre quella della triptamina, di tipo I, è più elevata nel caso del NAP ( $0,84 \times 10^{-4}$ ) rispetto al BM ( $0,23 \times 10^{-4}$ ). Inoltre le rese della 4-OHchinolina, derivato indicativo per un meccanismo di tipo misto, sono  $1,11 \times 10^{-4}$  per il NAP e  $0,15 \times 10^{-4}$  per il BM. Quindi, come ottenuto nei sistemi più semplici, questi valori confermano il carattere radicalico del meccanismo di fotosensibilizzazione indotta dal NAP. Inoltre, le rese sono state messe a confronto con quelle calcolate nel Trp libero e nella BSA (Tab.12.1); è evidente che aumentando la complessità del modello, le rese diminuiscono. In particolare, in quest'ultimo caso diminuiscono drasticamente, tuttavia ciò è comprensibile in quanto in un sistema così complesso come la cellula esistono più target di fotosensibilizzazione. Inoltre, anche dal punto di vista tecnico, l'indagine è risultata più articolata sia per la complessità del modello, sia perché nella cellula, oltre al Trp proteico, esso è presente in forma libera. Inoltre molti fotoprodotti del Trp sono anche metaboliti per cui possono essere già presenti all'interno della cellula in quanto metaboliti e non come fotoprodotti.

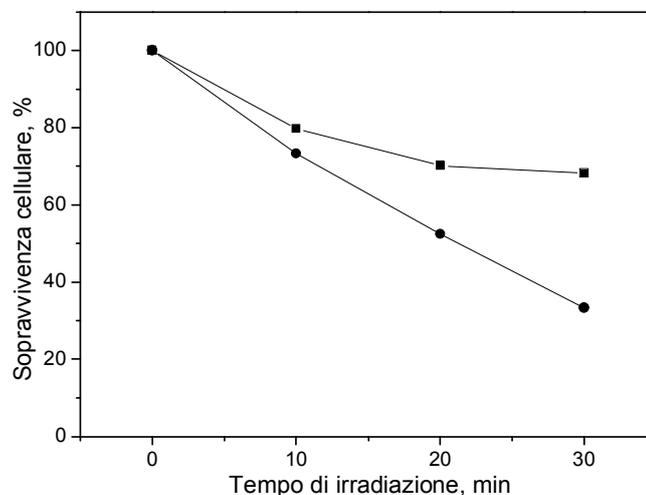
### **12.3 Fototossicità**

Le cellule dopo un'ora di incubazione con BM  $100 \mu\text{M}$  o con NAP  $900 \mu\text{M}$  sono state lavate per rimuovere il farmaco esterno e successivamente irradiate con diverse dosi di UVA. Dopo il trattamento, un'aliquota per campione è stata seminata su piastra di Petri e ne è stata analizzata la sopravvivenza

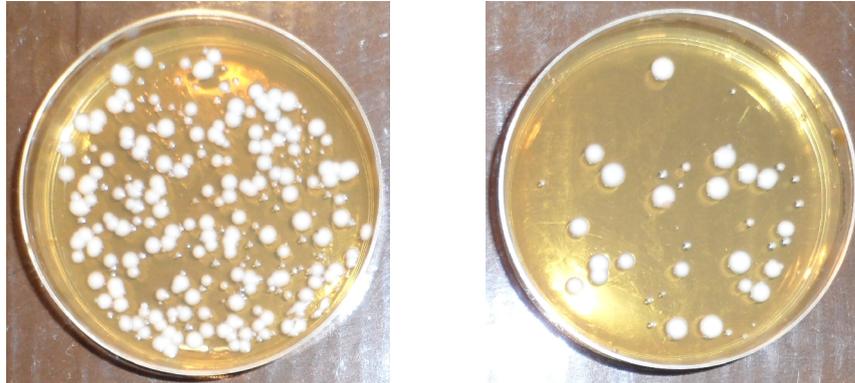
cellulare. La restante parte è stata sottoposta ad idrolisi isolando così il Trp e i suoi fotoprodotto dalle proteine cellulari.

In Fig.12.3 la sopravvivenza cellulare ottenuta nel caso del BM è messa a confronto con quella del NAP. I dati della conta cellulare vengono riportati in un grafico che mette in relazione la percentuale di colonie sopravvissute in funzione del tempo d'irradiazione. Nella Fig.12.4, invece sono mostrati due esempi di culture cellulari di *Saccharomyces cerevisiae* trattate con BM con e senza UVA.

Come si può osservare, nelle nostre condizioni il BM risulta essere più fototossico rispetto al NAP. Quindi anche se il NAP induce una maggiore degradazione del Trp rispetto al BM, questo dato non può essere correlato del tutto con la fototossicità. Comunque i risultati dei test di sopravvivenza per il NAP indicano che esiste una buona correlazione tra fotodegradazione intracellulare e cellule danneggiate mentre ciò non avviene nel caso del BM, probabilmente per il maggior danno causato ad altri target cellulari come il DNA. Infatti, il BM può fotoindurre danno al DNA mediato dall'ossigeno singoletto [172,173]. Il BM è una molecola che, quando irradiata, determina la formazione di 8-OxoG sia nel DNA estratto [174] che nelle cellule [175].



**Fig.12.3 Sopravvivenza cellulare di colture di *Saccharomyces cerevisiae* dopo irradiazione con diverse dosi di UVA: BM (-●-) e NAP (-■-) è messa a confronto la con quella del NAP**



**Fig.12.4 Culture cellulari di *Saccharomyces cerevisiae* trattate con BM con e senza UVA (30').**

### **13. FOTOSENSIBILIZZAZIONE INDOTTA DAL NAPROSSENE NEI FIBROBLASTI UMANI: UN'INDAGINE SUI PATHWAY COINVOLTI NELLA FOTOTOSSICITA' CELLULARE**

Questi risultati rappresentano un punto d'inizio per estendere lo studio ai meccanismi molecolari indotti dal NAP nei fibroblasti umani al fine di capire quali sono i target cellulari in questo modello così complesso e chiarire quali sono i pathway coinvolti nella fototossicità cellulare.

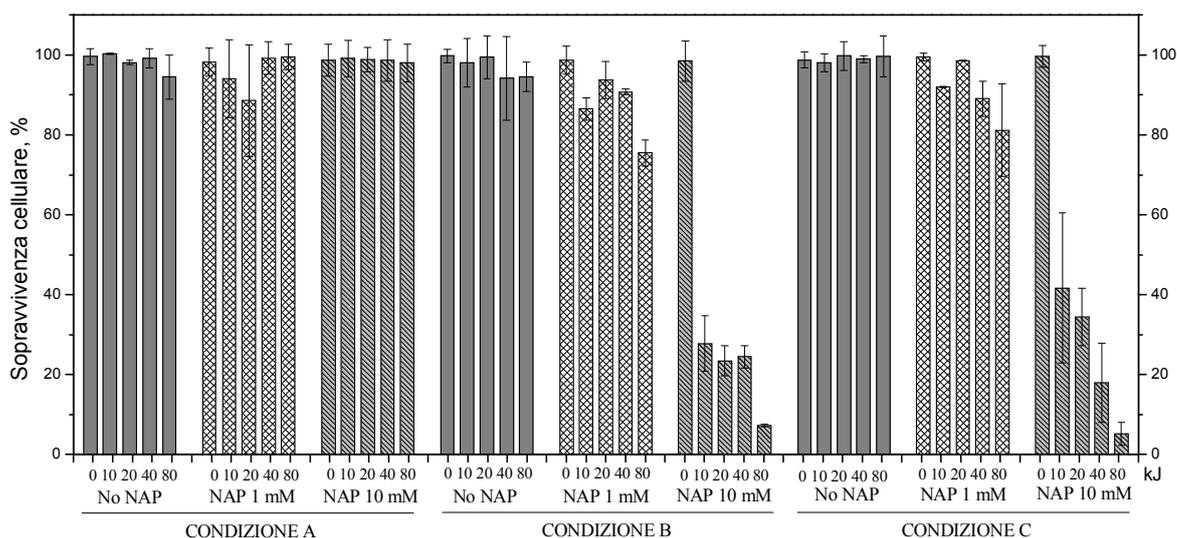
#### **13.1. Fotocitotossicità**

La Fig.13.1 mostra la fotocitotossicità indotta dal NAP nei fibroblasti nelle tre condizioni sperimentali descritti nei materiali e metodi:

A) La sopravvivenza cellulare dopo un'ora di incubazione con NAP (condizione A) non è influenzata dall'irradiazione con UVA anche ad alte concentrazioni di farmaco. Tutti i campioni mostrano una sopravvivenza al di sopra del 90%.

B) La citotossicità è al di sopra del 90% quando le cellule sono esposte a una dose di UVA di  $80 \text{ kJ/m}^2$  in presenza di NAP 10 mM senza precedente incubazione con il farmaco (condizione B).

C) Quando le cellule sono state preincubate con il NAP e successivamente irradiate in presenza di 1 e 10 mM NAP (condizione C), la citotossicità è simile a quella trovata nella condizione B. Questo conferma il fatto che la preincubazione non influenza la tossicità del farmaco sulle cellule.



**Fig. 13.1. Sopravvivenza cellulare di cellule trattate con 0-1-10 mM di NAP in funzione della dose di UVA nelle tre condizioni sperimentali**

Per comprendere meglio l'influenza delle tre condizioni sperimentali sull'uptake cellulare del NAP e di conseguenza sulla citotossicità, è stata determinata la concentrazione intracellulare del farmaco.

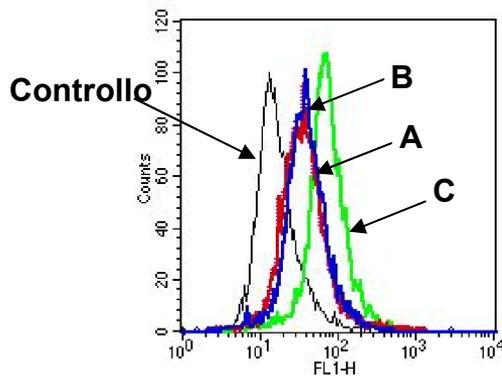
I campioni sono stati trattati con NAP 10 mM nelle tre condizioni sperimentali e in seguito sono stati lavati con PBS, trattati con tripsina e centrifugati. I pellet sono stati idrolizzati con NaOH, analogamente al metodo utilizzato per la quantificazione del Trp. Inoltre, tenendo conto del volume intracellulare dei fibroblasti (7 picolitri) e del numero totale di cellule (circa 1 milione), è stata calcolata la concentrazione intracellulare del farmaco. Nelle condizioni A, B e C, le concentrazioni intracellulari calcolate attraverso la determinazione fluorimetrica in HPLC ( $\lambda_{exc}$  330,  $\lambda_{em}$  357) sono rispettivamente 320, 200 e 860  $\mu$ M.

Nel caso A la sopravvivenza cellulare non viene alterata perchè probabilmente durante l'irradiazione la presenza di solo il NAP intracellulare non è sufficiente per danneggiare la membrana. Questo è supportato dai risultati ottenuti nelle condizioni B e C; infatti, la preincubazione con il farmaco non influenza la fototossicità e quando le cellule sono irradiate con

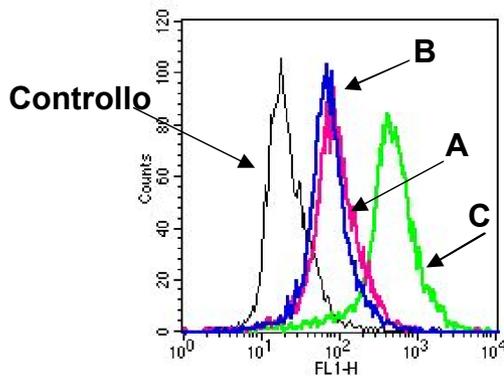
NAP esterno, la luce viene principalmente assorbita dal farmaco esterno mentre il contributo di quello intracellulare è trascurabile. Questo supporta l'ipotesi che il principale danno avviene a livello della membrana [188].

### **13.2. Produzione dei ROS**

I ROS possono reagire con le molecole biologiche incluse acidi nucleici, lipidi e proteine. I ROS sono largamente prodotti a livello endogeno dal metabolismo mitocondriale in risposta ad un ampio range di fattori ambientali come la fotosensibilizzazione [74]. Per valutare la produzione intracellulare di ROS indotta dal NAP e quali specie sono coinvolte nei processi di fotosensibilizzazione, queste specie transienti sono state misurate nelle tre condizioni sperimentali usate negli esperimenti sulla sopravvivenza cellulare. La Fig.13.2a mostra lo shift della fluorescenza della produzione di ROS in assenza di UVA rispetto al controllo (senza NAP, linea nera). Il NAP in assenza di irradiazione produce ROS molto più efficientemente del controllo. In particolare dopo un'ora di incubazione con NAP (condizione A, linea rosso), causa una produzione di ROS analoga a quella riscontrata nei campioni incubati per circa 10 minuti nella condizione B (linea blu). La produzione di ROS, invece è maggiore quando le cellule vengono trattate due volte con il NAP (condizione C, linea verde).



a)

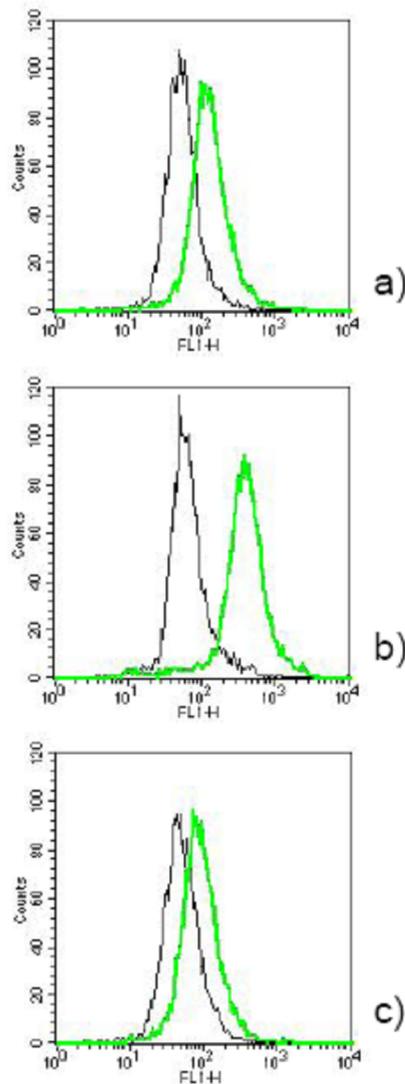


b)

**Fig.13.2. Produzione di ROS in assenza (a) e in presenza (b) di  $40 \text{ kJ/m}^2$  di UVA nelle tre diverse condizioni sperimentali: controllo senza NAP (nero). Condizione A (rosso), condizione B (blu) e condizione C (verde) con NAP 10 mM.**

In Fig.13.2b è riportata la produzione di ROS nelle stesse condizioni ma in presenza di UVA. L'irradiazione causa un piccolo shift del controllo senza NAP (linea nera) rispetto a quello al buio in Fig.13.2a. Gli shift nelle tre condizioni, specialmente per la C, sono più alti rispetto a quelli riportati in Fig.13.2a. La differenza può essere dovuta alla doppia aggiunta di NAP, la prima nella preincubazione, la seconda immediatamente prima dell'irradiazione. Per supportare questa ipotesi, l'esperimento è stato ripetuto senza preincubazione (condizione B) ma trattando le cellule con NAP 20 mM immediatamente prima dell'irradiazione (Fig.13.3a) (linea verde). Per confronto, in nero è mostrato il comportamento in assenza di UVA. In questo

esperimento lo shift è analogo a quello osservato nelle cellule trattate nelle stesse condizioni (B) ma con NAP 10 mM e non pronunciato come quello per la condizione C (Fig.13.3b). Quindi, non si tratta solo di un effetto dovuto alla concentrazione in quanto la preincubazione influenza la produzione di ROS. Per capire quale meccanismo è coinvolto nella produzione di ROS, gli esperimenti sono stati ripetuti usando sodio azide che può agire come quencher dell'ossigeno singoletto [141]. Nelle cellule irradiate in presenza di NAP 10 mM e 10 mM  $\text{NaN}_3$  dopo un'ora di preincubazione con NAP 10 mM (condizione C), la produzione di ROS diminuisce drasticamente (Fig.13.3c) rispetto a quelli senza  $\text{NaN}_3$  (Fig.13.3b). Quindi possiamo ipotizzare che l'ossigeno singoletto sia coinvolto nella produzione dei ROS. Inoltre possiamo anche supporre che probabilmente dopo la preincubazione con il NAP, il farmaco si lega alle membrane e le modifica [142]: la produzione di ROS potrebbe determinare un'alterazione del bilayer lipidico senza compromettere la sopravvivenza cellulare. Quando il farmaco viene aggiunto la seconda volta, può penetrare più facilmente all'interno della cellula inducendo nuovamente la produzione di ROS.



**Fig.13.3. Produzione dei ROS nelle cellule irradiate in presenza di a) NAP 20 mM (condizione B); b) 10mM NAP dopo un'ora di incubazione con NAP 10 mM (condizione C) ; c) NAP 10 mM + NaN<sub>3</sub> 10mM dopo un'ora di incubazione con NAP 10 mM (condizione C)**

### **13.3. Modificazioni proteiche**

È noto che i ROS sono coinvolti nell'ossidazione delle proteine [74]. In un primo esperimento è stata valutata la glutationilazione delle proteine (proteina-SSG). Questo processo consiste nella formazione di ponti disolfuro tra gruppi sulfidrilici delle proteine e quelli del glutatione (GSH); negli ultimi

anni è stata rivolta particolare attenzione a questo processo come potenziale meccanismo di regolazione post-traslazionale delle proteine regolatorie, strutturali e metaboliche sia in condizioni normali che patologiche [93-97] e per la protezione delle proteine dalle ossidazione irreversibile dei tioli [98].

La Fig.13.4a mostra la glutationilazione delle proteine osservata nella condizione sperimentale C. I campioni sono stati irradiati con 10 e 40 kJ/m<sup>2</sup> di UVA usando NAP 1 e 10 mM. Sono stati preparati anche i rispettivi controlli con e senza UVA/NAP. In queste condizioni, il processo di glutationilazione si osserva maggiormente in presenza di NAP 10 mM e 40 kJ/m<sup>2</sup>.

Come nei precedenti esperimenti sulla citotossicità e sulla produzione dei ROS, è stato valutato il ruolo della preincubazione con il NAP sul processo di glutationilazione. Per questo è stato effettuato un Western blot dei campioni trattati nelle tre diverse condizioni sperimentali (Fig.13.4b) usando NAP 10 mM e una dose di 40 kJ/m<sup>2</sup>. Tale modificazione è stata riscontrata principalmente nei campioni irradiati in presenza di NAP 10 mM (B e C), mentre i segnali sono molto deboli nei campioni irradiati in assenza di NAP extracellulare (A). Inoltre, il segnale per il campione preincubato e irradiato con NAP (C) è più intenso rispetto a quello senza preincubazione (B).

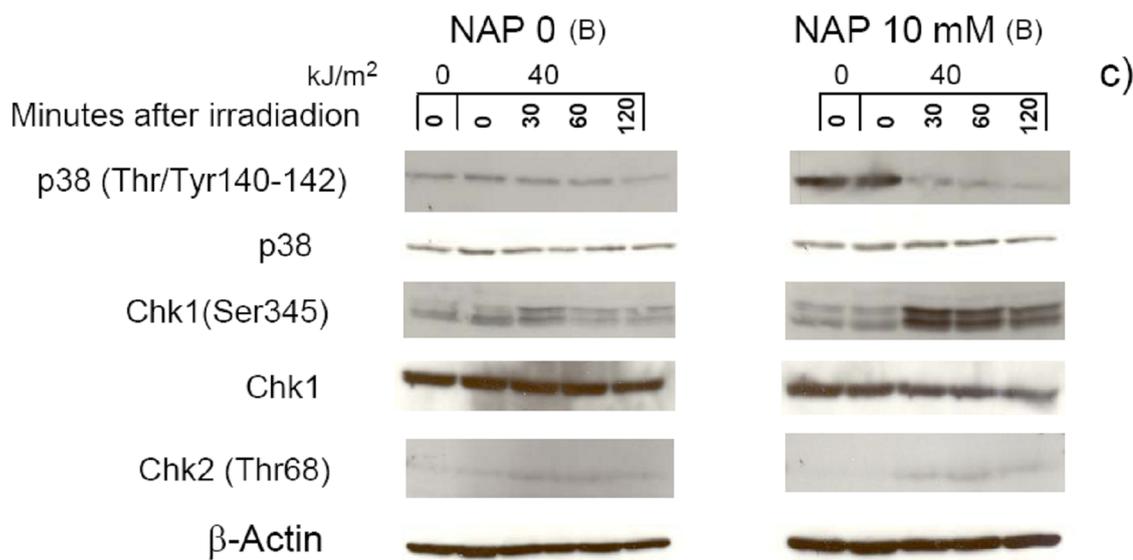
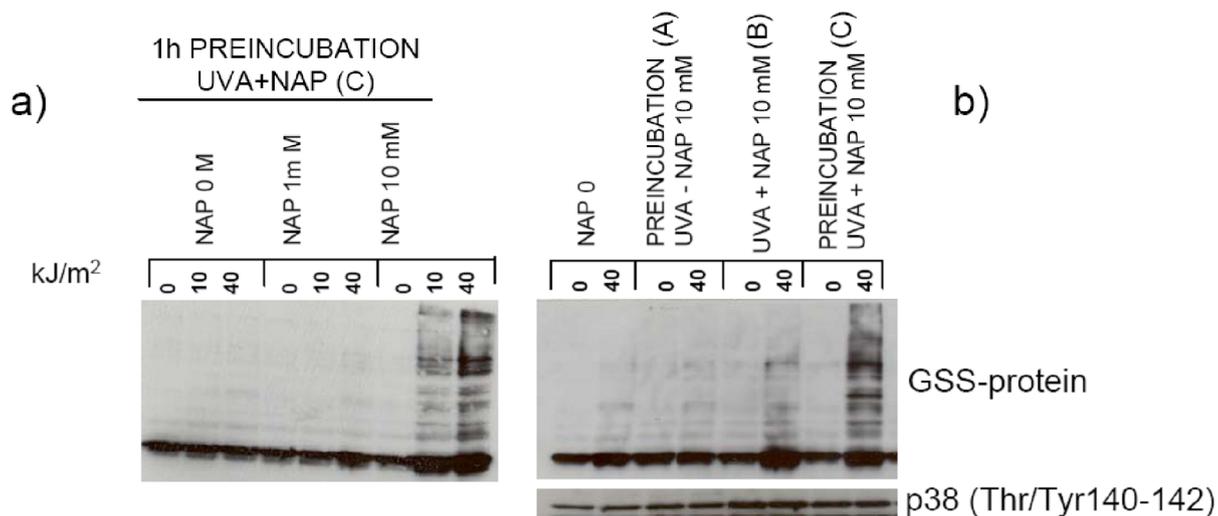
In questi campioni, è stata investigata anche un'altra proteina, la p38, una MAP-chinasi che partecipa a una cascata di segnale che controlla la risposta cellulare allo stress ossidativo [176]. Quindi questa proteina è attivata in risposta agli stimoli di stress e l'attivazione consiste nella fosforilazione a livello della sequenza Thr/Tyr 140-142. L'attivazione della p38, rivelata attraverso anticorpi anti-p38-fosforilata, aumenta dopo l'aggiunta del NAP e persiste durante l'irradiazione in presenza di NAP 10 mM (Fig.13.4b).

In un terzo esperimento, è stata valutata la durata dell'attivazione della p38 (Fig.13.4c); infatti, poiché l'attivazione della p38 avviene analogamente nelle condizioni B e C, è stata determinata dopo 30, 60 e 120 minuti dalla fine dell'irradiazione con 40 kJ/m<sup>2</sup> in presenza di NAP 10 mM senza

preincubazione (condizione B). Come mostrato in Fig.13.4c, l'attivazione della p38 si osserva dopo l'aggiunta del NAP 10 mM, persiste durante l'irradiazione, ma non dopo 30, 60 e 120 minuti dalla fine dell'irradiazione.

La Fig.13.4c riporta anche l'attivazione delle proteine Chk1 e Chk2. Queste proteine sono coinvolte nel controllo del ciclo cellulare determinando l'inibizione della sua progressione in seguito di danno al DNA [177]. L'attivazione consiste nella fosforilazione dei residui di Ser345 e Thr68, rispettivamente per la Chk1 e la Chk2. L'attivazione è stata rivelata usando gli anticorpi specifici per Chk1 e Chk2 fosforilati. Si è osservato che Chk1 viene attivato dopo irradiazione in presenza di NAP 10 mM e l'attivazione risulta più elevata dopo 30 minuti dall'irradiazione anche se successivamente progressivamente diminuisce. Il segnale per la fosforilazione e quindi attivazione della Chk2 è molto debole, ma sembra che abbia lo stesso andamento della Chk1. I risultati per la  $\beta$ -actina, la p38 totale e Chk1 totale sono riportati come controlli del caricamento dei campioni.

In entrambe le condizioni sperimentali B e C, è stata osservata la glutationilazione che invece è trascurabile nella condizione A. Inoltre tale modificazione proteica è maggiore quando le cellule sono preincubate con il NAP prima dell'irradiazione. Questo è in accordo con l'ipotesi del danno alle membrane e la conseguente produzione di ROS. Inoltre le cellule rispondono all'aggiunta del NAP 10 mM con l'attivazione della p38 durante l'irradiazione ma non dopo. Quest'attivazione può essere correlata con la produzione dei ROS indotta dal NAP senza irradiazione. Inoltre si è osservata anche l'attivazione della Chk1 dopo irradiazione e persiste dopo l'esposizione all'UVA. Quindi, probabilmente avviene qualche evento a livello del nucleo; di conseguenza può essere ipotizzato un danno al nucleo e/o un pathway di segnali attivato in membrane che induce a sua volta l'attivazione della Chk1. Per questo motivo sono stati studiati gli effetti sul ciclo cellulare.



**Fig.13.4. Western blot per la rivelazione del processo di glutationilazione e per l'attivazione di p38 e Chk1/Chk2.**

**a) Glutationilazione in cellule preincubate per un'ora con NAP 1 e 10 mM, lavate e irradiate con una dose di 10-40 kJ/m<sup>2</sup> in presenza di NAP 1-10 mM (condizione C). Sono riportati anche i controlli con e senza NAP e/o con e senza UVA**

**b) Glutationilazione e fosforilazione di p38 in cellule senza NAP (controllo) e nelle tre condizioni sperimentali A, B, C usando NAP 10 mM e 0-40 kJ/m<sup>2</sup>**

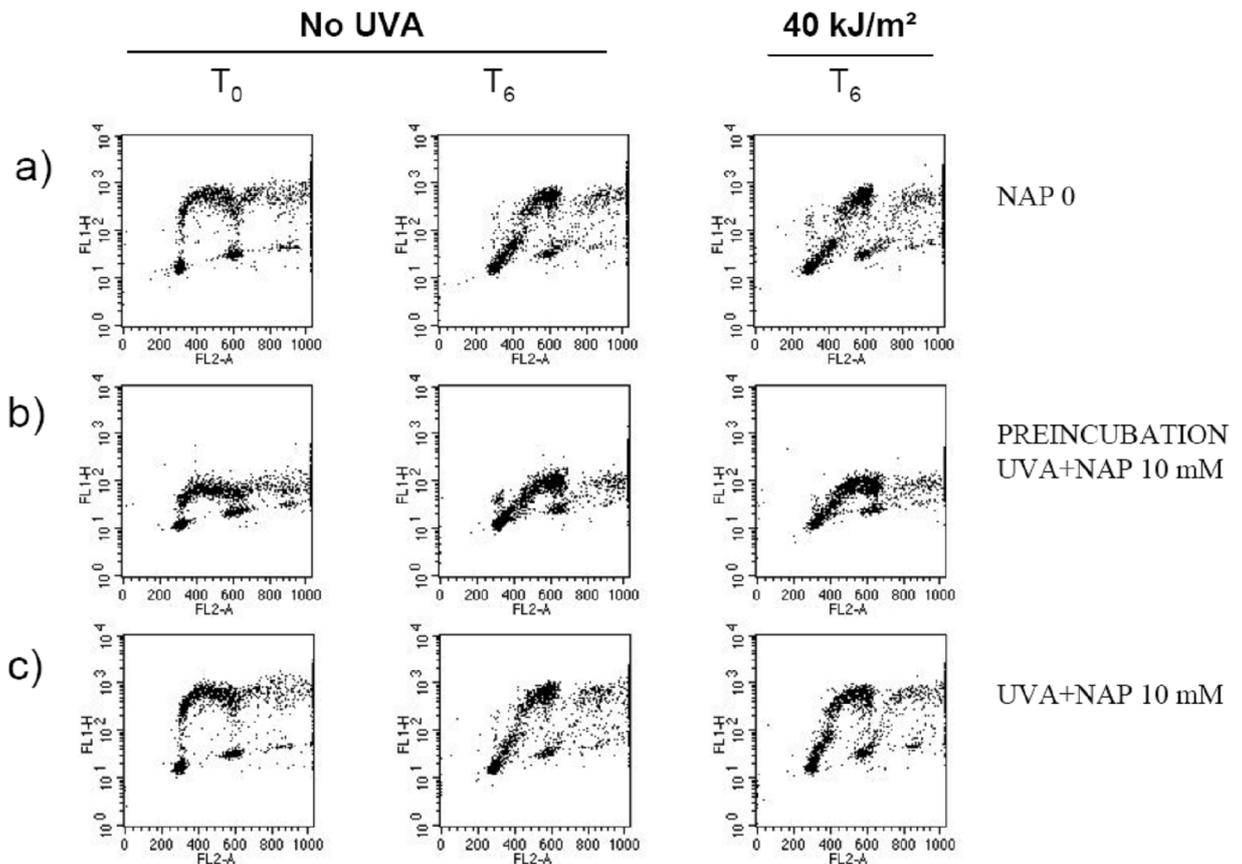
**c) p38 totale e fosforilato, Chk1 totale e fosforilato, Chk2 fosforilato e β-Actina in cellule trattate con (destra) o senza (sinistra) NAP 10 mM (condizione B). I segnali son stati rivelati immediatamente dopo l'irradiazione e dopo 30', 60', 120'.**

### 13.4. Ciclo cellulare

Poiché l'attivazione del Chk1 può determinare l'inibizione del ciclo cellulare, è stato studiato l'effetto del NAP sulla progressione del ciclo. La sua determinazione dipende dalla rivelazione di una base analoga alla timina, la bromodeossiuridina (BrdU), che è stata aggiunta al terreno di coltura e quindi incorporata nel DNA durante la replicazione.

L'arresto del ciclo cellulare è stato osservato quando le cellule sono state irradiate in presenza di NAP 10 mM senza preincubazione (condizione sperimentale B) (Fig.5b) mettendolo a confronto con il controllo (Fig.5a). Questo è in accordo con il fatto che l'attivazione del Chk1 sia responsabile dell'inibizione della progressione del ciclo cellulare, anche se non può essere esclusa l'ossidazione della proteina danneggiando la progressione della forca replicativa [178]. Quindi possiamo supporre che alcuni eventi che avvengono a livello del nucleo sono coinvolti in questo processo, anche se il principale danno avviene nelle membrane [142].

Inoltre, nelle cellule che sono state preincubate con NAP 10 mM prima dell'irradiazione (condizione C), il segnale è alterato (Fig.5c), probabilmente perché le membrane sono state danneggiate durante la preincubazione con una conseguente incorporazione inefficiente della BrdU: questo è in accordo con l'ipotesi ottenuta dai risultati sulla produzione dei ROS.



**Fig.13.5.** Progressione del ciclo cellulare immediatamente (T<sub>0</sub>) e 6 ore (T<sub>6</sub>) dopo il trattamento delle cellule con e senza UVA (40 kJ/m<sup>2</sup>): a) senza NAP; b) in presenza di NAP 10 mM dopo un'ora di preincubazione con NAP 10 mM (condizione C); c) senza preincubazione e in presenza di NAP 10 mM (condizione B).

### 13.5. Degradazione del Trp

Come visto prima, il Trp è uno dei residui aminoacidici più suscettibili alle fotoossidazioni [149,152].

Per questo è stata valutata la fotodegradazione del Trp anche in questo modello. Dopo un'ora di preincubazione con NAP 10 mM, nelle cellule irradiate senza NAP esterno (condizione A), la degradazione del Trp è trascurabile mentre se l'irradiazione avviene in presenza di NAP 10 mM esterno, dopo un'ora di incubazione con NAP 10 mM (condizione C), circa il

50% dei Trp si degrada. Risultati simili (circa il 60% di degradazione del Trp) sono stati osservati quando le cellule vengono irradiate direttamente in presenza di NAP 10 mM (condizione B). Infine, non è stata riscontrata degradazione nei controlli in assenza di farmaco. Questi risultati dimostrano che la degradazione del Trp è indipendente da un'ora di incubazione. Allo stesso modo è stata seguita pure la degradazione del NAP intracellulare nelle tre diverse condizioni sperimentali. Dopo l'irradiazione, nella condizione C, il farmaco viene quasi del tutto degradato, negli altri due casi si degrada circa il 50% di NAP. Considerando le concentrazioni di NAP intracellulare riportate sopra nelle tre condizioni A), B) e C), (rispettivamente, 320, 200 e 860  $\mu\text{M}$ ) e considerando che quest'ultima è più alta rispetto agli altri due casi, è normale aspettarsi un maggiore danno foto indotto alle cellule. Questo è in accordo con i risultati della produzione dei ROS.

## 14. CONCLUSIONI

Considerando i valori delle rese quantiche di fotodegradazione e di formazione, così come il meccanismo molecolare della fotochimica dei fotosensibilizzatori, il confronto tra NAP e BM rappresenta un utile strumento per lo studio meccanicistico in sistemi più complessi. Lo studio nei modelli più semplici è utile in quanto il meccanismo di reazione è semplificato, le condizioni ambientali sono meglio controllate e non sono presenti alcune interazioni che possono complicare le reazioni, come l'ingombro sterico.

Rispetto al BM, il NAP causa un maggiore danno fotoindotto e le distribuzioni dei fotoprodotti del Trp nei due fotosensibilizzatori sono diverse. I derivati del Trp diagnostici per un meccanismo di tipo I generati dalla fotosensibilizzazione indotta da NAP sul Trp libero sono prodotti con alte rese mentre quelli indicativi per un tipo II con basse rese (con l'eccezione della 3-OH-chinurenina). Di conseguenza, il meccanismo di fotosensibilizzazione del NAP sul Trp può essere considerato cooperativo tipo I/II mentre il BM agisce attraverso un meccanismo di tipo II.

Alcuni di questi composti, acido xanturenico, 4-OH-chinolina, triptamina e 3-OH-chinurenina sono stati identificati per la prima volta come prodotti dalla fotosensibilizzazione UVA.

I risultati ottenuti nel modello più complesso, la BSA, sono in accordo con quelli sul Trp libero, anche se nella maggior parte dei casi le rese di formazione dei fotoprodotti sono più basse. Questo è in accordo con il fatto che le proteine contengono molti target per le specie reattive prodotte durante la fotolisi del fotosensibilizzatore. Inoltre, come nel caso del Trp libero, la distribuzione dei fotoprodotti fa supporre un meccanismo di tipo cooperativo per il NAP e di tipo II per il BM.

Tutti questi risultati, sia per il Trp libero che per la BSA, sono stati supportati da esperimenti in D<sub>2</sub>O.

Queste osservazioni hanno supportato l'idea di estendere l'indagine al modello più complesso ovvero la fotosensibilizzazione del Trp nelle cellule di *Saccharomyces cerevisiae*.

In questo modello le rese diminuiscono drasticamente rispetto ai sistemi più semplici, tuttavia ciò è comprensibile in quanto in un sistema così complesso come la cellula esistono più target di fotosensibilizzazione. Inoltre, anche dal punto di vista tecnico, l'indagine è risultata più articolata sia per la complessità del modello, sia perché molti fotoprodotti del Trp sono anche metaboliti per cui possono essere già presenti all'interno della cellula in quanto metaboliti e non come fotoprodotti.

Come si può osservare, nelle nostre condizioni il BM risulta essere più fototossico rispetto al NAP. Quindi anche se il NAP induce una maggiore degradazione del Trp rispetto al BM, questo dato non può essere correlato del tutto con la fototossicità. Comunque i risultati dei test di sopravvivenza per il NAP indicano che esiste una buona correlazione tra fotodegradazione intracellulare e cellule danneggiate mentre ciò non avviene nel caso del BM, probabilmente per il maggior danno causato ad altri target cellulari in particolare il DNA. Infatti, il BM può fotoindurre danno al DNA mediato dall'ossigeno singoletto [172,173]. Il BM è una molecola che, quando irradiata, determina la formazione di 8-OxoG sia nel DNA estratto [174] che nelle cellule [175].

Questi risultati hanno rappresentato un punto d'inizio per estendere lo studio ai meccanismi molecolari indotti dal NAP nei fibroblasti umani al fine di capire quali sono i target cellulari in questo modello così complesso e chiarire quali sono i pathway coinvolti nella fototossicità cellulare.

Infatti, il NAP da solo induce la produzione di ROS intracellulare che aumenta durante l'irradiazione. Questa produzione di ROS diminuisce drasticamente in presenza di  $\text{NaN}_3$ , un quencher dell'ossigeno singoletto; quindi, la principale specie coinvolta in questi processi è l'ossigeno

singoletto. Inoltre, quando le cellule sono irradiate con il NAP extracellulare, la luce viene assorbita principalmente dal farmaco esterno e questo supporta l'ipotesi che il danno maggiore avviene a livello della membrana in accordo con i risultati ottenuti sulla progressione del ciclo cellulare e sulla produzione dei ROS.

Durante l'irradiazione in presenza di NAP avviene il processo di glutationilazione. Inoltre, l'aggiunta di NAP alle cellule induce l'attivazione della p38 che persiste durante l'irradiazione ma non dopo il trattamento.

I risultati sulla degradazione del Trp sono in accordo con quelli sulla fototossicità e sulla produzione dei ROS.

Il Chk1 viene attivato durante l'irradiazione e tale attivazione persiste dopo l'irradiazione. Questo è in accordo con i risultati ottenuti sul ciclo cellulare in quanto il ciclo viene bloccato dopo irradiazione in presenza di NAP. Probabilmente, ma non necessariamente, la progressione è inibita alla fase S dal Chk1.

Quindi il NAP da solo induce la produzione dei ROS e l'attivazione del p38. Questi effetti aumentano in presenza di UVA. Inoltre, dopo l'irradiazione si osserva l'attivazione del Chk1 e l'arresto del ciclo cellulare. Quindi sarebbe interessante fare una distinzione tra gli effetti indotti dal NAP da solo e quelli in associazione con l'UVA.

Inoltre, il NAP si lega alle membrane e le danneggia; per valutare tale danno, sarebbe utile effettuare uno studio sulla perossidazione lipidica per confermare gli studi precedenti sulla perossidazione lipidica indotta dal NAP. In più, qualche evento succede anche a livello del nucleo causando l'arresto del ciclo cellulare: questo può essere causato da danno a DNA o a una cascata di segnale che è stata attivata a livello della membrana inducendo poi l'attivazione del Chk1. Infine, sarebbe interessante capire se c'è correlazione tra il danno alle membrane e l'arresto del ciclo cellulare.

Concludendo, attraverso questi tre anni di lavoro sperimentale, si è raggiunto l'obiettivo prefissato ovvero fornire un quadro generale sul meccanismo molecolare di fotosensibilizzazione indotta dal NAP su modelli biologici a crescente complessità molecolare.

## **15. Collaborazioni**

Durante questo periodo ho anche partecipato ad un altro studio realizzato dal Prof. De Guidi in collaborazione con il Prof. Librando. Tale progetto riguarda la determinazione delle proprietà spettroscopiche di alcuni idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e i derivati nitro-IPA, i quali sono conosciuti come composti estremamente tossici e carcinogenici. Di alcuni di questi composti, è stata determinata la variazione della fotodegradazione in diverse condizioni ambientali.

## 16. Bibliografia

[1] G. de Guidi, G. Bracchitta and A. Catalfo ( 2011) Photosensitization Reactions of Fluoroquinolones and Their Biological Consequences. *Photochem. Photobiol.*, 87, 1214–1229.

[2] G. Condorelli, L.L. Costanzo, G. De Guidi, S. Giuffrida, P. Miano, S. Sortino, A. Velardita (1996) Photosensitization induced by non-steroidal antiinflammatory drugs: An overview of molecular mechanisms in biological systems *EPA newsletter*, 58, 60-77.

[3] G.M.J. Beijersbergen van Henegouwen, Medicinal Photochemistry (1997) Phototoxic and Phototherapeutic Aspects of Drugs, in *Advances in Drug Research*, Vol. 29, Acad. Press, 81.

[4] Albini and E. Fasani, *Drugs: Photochemistry and Photostability*, Royal Soc. Chem., London (1998)

[5] Urbach (1997) Phototoxicity and possible enhancement of photocarcinogenesis by fluorinated quinolone antibiotics, *J. Photochem. Photobiol.*, 37, 169.

[6] Boscá F. and M.A. Miranda (1998) Photosensitizing drugs containing the benzophenone chromophore, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 43, 120-123.

[7] J. Piette (1991) Biological consequences associated with DNA oxidation mediated by singlet oxygen, *J. Photochem. Photobiol.*, 11, 241.

[8] J. G. Lombardino (ed.) (1985) *Non steroidal antiinflammatory drugs*,

Wiley, New York, 253-451.

[9] P. Kallings, *vet. clin. am. equine, Pract.* 9 (1993), 523.

[10] G. Singh, G. Triadafilupoulos, *J. Rheumatol*, 26, (1999), 18.

[11] L. Kovacevic, J. Bernstein, R.P. Valentini, A. Iman, N. Gupta, T.K. Mattoo, *Pediatr. Nephrol.*, 18, (2003), 826.

[12] I. E. Kochevar. *Mechanisms of drugs photosensitization.* (1987), *Photochem. Photobiol.*, (1987) 45, 891.

[13] M. A. Miranda, J. V. Castell and M. J. Gòmez-Lechòn. *Phototoxicity of drugs in vitro methods in pharmaceutical research.* Academic Press, San Diego, CA, (1997), 289-315.

[14] Abe, Hideki, Ikebuchi Kenji, Hirayama Junichi, e Ikeda Hisami. *methylene blue photosensitization: Mechanisms of virus inactivation and its clinical application, Recent research developments in photochemistry photobiology*, (2001), 5 163-173

[15] J.M. May, Z.C. Qu, R.R. Whitesell, *Generation of oxidant stress in cultured endothelial cells by methylene blue: protective effects of glucose and ascorbic acid* *Biochem. Pharmacol.* 66 (2003) 777–784.

[16] L.E. Olson, M.P. Merker, M.K. Patel, R.D. Bongard, J.M. Daum, R.A. Johns, C.A. Dawson, *Cyanide increases reduction but decreases sequestration of methylene blue by endothelial cells.* *Ann Biomed Eng* 28: 85-93, 2000

[17] N.L. Callaway, P.D. Riha, A.K. Bruchey, Z. Munshi, F. Gonzalez-Lima, Methylene blue improves brain oxidative metabolism and memory retention in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 77 (2004) 175–181.

[18] A. Raffaelli, S. Pucci, I. Desideri, C.R. Bellina, R. Bianchi, P. Salvadori, Investigation on the iodination reaction of methylene blue by liquid chromatography-mass spectrometry with ionspray ionisation. *J. Chromatogr. A* 854 (1999) 57–67.

[19] B. Meric, K. Kerman, D. Ozkan, P. Kara, S. Erensoy, U.S. Akarca, M. Mascini, M. Ozsoz, Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blu *Talanta* 56 (2002) 837–846.

[20] Rengelshausen, J., J. Burhenne, M. Fröhlich, Y. Tayrouz, S. K. Singh, K.-D. Riedel, O. Müller, T. Hoppe-Tichy, W. E. Haefeli, G. Mikus, and I. Walter-Sack. 2004. Pharmacokinetic interaction of chloroquine and methylene blue combination against malaria. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 60, 709-715.

[21] L.Z. Zhang, G.Q. Tang, The binding properties of photosensitizer methylene blue to herring sperm DNA: a spectroscopic study *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* 74 (2004) 119–125.

[22] B. Lambrecht, S. G. Norley, R. Kurth, H. Mohr, Rapid inactivation of HIV-1 in single donor preparations of human fresh frozen plasma by methylene blue/light treatment. *Biologicals* 22 (1994) 227-231.

[23] A. Catalfo, G. Bracchitta, G. De Guidi; Role of aromatic amino acid tryptophan UVA-photoproducts in the determination of drug photosensitization mechanism: a comparison between methylene blue and naproxen. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2009, 8, 1467–1475

[24] G. Bracchitta, A. Catalfo, E. Sage, P. M. Girard, G. De Guidi, Drug photosensitization induced in proteins and cells, 3rd Joint Meeting of the Italian and French Societies for Photobiology, Paris, France, October 25-26, 2010

[25] Kasai, H. and Nishimura, S. (1984) DNA damage induced by asbestos in the presence of hydrogen peroxide. *Gann*, 75, 841–844

[26] Asami, S., Manabe, H., Miyake, J., Tsurudome, Y., Hirano, T., Yamaguchi, R., Itoh, H. and Kasai, H. (1997) Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis*, 18, 1763–1766.

[27] M.K. Hailer, P.G. Slade, B.D. Martin, T.A. Rosenquist, K.D. Sugden, Recognition of the oxidized lesions spiroiminodihydantoin and guanidinohydantoin in DNA by the mammalian base excision repair glycosylases NEIL1 and NEIL2, *DNA Repair* 4 (2005) 41–50.

[28] D. Wang, D.A. Kreuzer, J.M. Essigmann, Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions, *Mutat. Res.* 400 (1998) 99–115

[29] Moriya, M. (1993) Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C/T.A

transversions in simian kidney cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90, 1122–1126

[30] Finkel, T. and Holbrook, N. J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239–247.

[31] Washington, M. T., Johnson, R. E., Prakash, L. and Prakash, S. (2001) Accuracy of lesion bypass by yeast and human DNA polymerase  $\gamma$ . *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 98, 8355–8360.

[32] Van der Kemp, P. A., Thomas, D., Barbey, R., De Oliveira, R. and Boiteux, S. (1996) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 93, 5197–5202.

[33] R.W. Gracy, K.U. Yuksel, A. Gomez-Puyou, Deamidation of triosephosphate isomerase in vitro and in vivo, in: D. Aswad \_Ed., Deamidation and Isoaspartate Formation in Peptides and Proteins, CRC Press, Boca Raton, FL, 1995, pp. 133–155.

[34] Nadia Chouini-Lalanne, Martine Defais and Nicole Paillous. NonSteroidal Antiinflammatory Drug-Photosensitized Formation of Pyridine Dimer in DNA. *Biochemical Pharmacology*, Vol 55, pp. 441.446, 1998.

[35] G. De Guidi, Santa Ragusa, Maria T. Cambria, Alessandra Belvedere, Alfio Catalfo and Antonio Cambria. Effect of Some Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on Natural and Artificial Membranes: Dependence on Phospholipid Composition, *Chemical Research in Toxicology* 2005.

- [36] L. L. Costanzo, G. De Guidi, G. Condorelli, A. Cambria and M. Famà, Molecular mechanism of Naproxen photosensitization in red blood cells. *Photochem. Photobiol.B: Biol.* 3 (1989) 223-235.
- [37] B. Przybilla , U. Schawab, J. Ring. Phototoxicity of non steroidal antiinflammatory drugs demonstrated in vitro by a photo-basophil-histamine-release test. (1987). *Photodermatology.* 4, 73-78.
- [38] R. T. Nabeya, T. Kojima, M. Fujita. Photocontact dermatitis from ketoprofen with an unusual clinical feature. *Contact Dermatitis*, 32 (1995) 52-53.
- [39] L. L. Costanzo, G. De Guidi, G. Condorelli A. Cambria, and M.Famà Molecular mechanism of drug photosensitization. Part 11 . Photohaemolysis sensitized by Ketoprofen. *Photochem. Photobiol.*, 50 (1989) 359.
- [40] Neumann, N. J., and Lehmann, P. (2003) The photopatch test procedure of the German, Austrian, and Swiss photopatch test group. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 19, 8-10.
- [41] Guttman, Ehrlich.Über die Wirkung des Methylenblau bei Malaria. *Berl. Klin. Wochenschr.* (1981) 28, 60-77.
- [42] Usui, Y.; Tsukada, M.; Nakamura; Kinetic studies of photosensitized oxigenation by single oxygen in aqueus micellar solutions; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 51(2): 379-84 (1978).

[43] Liu, Zhi-Ren; Wilkie, Arlene M.; Clemens, Michael J.; Smith, Christopher W. J. Detection of double-stranded RNA-protein interactions by methylene blue-mediated photo-crosslinking. *RNA* (1996), 2(6), 611-621.

[44] JE Schneider, S Price, L Mardt, JM Gutteridge and RA Floyd, Methylene blue plus light mediates 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine formation in DNA preferentially over strand breakage, *Nucleic Acids Research*, Vol 18, Issue 3 631-635.

[45] B. Lambrecht, S. G. Norley, R. Kurth, H. Mohr, Rapid inactivation of HIV-1 in single donor preparations of human fresh frozen plasma by methylene blue/light treatment. *Biologicals* 22 (1994) 227-231.

[46] Danziger, R.M.; Bar-Eli, K.H.; Weiss, K. The laser photolysis of methylene blue. *J. Phys. Chem.* 71: 2633-40 (1967)

[47] F. Boscà, M. L. Marin and M. A. Miranda, Photoreactivity of the nonsteroidal anti-inflammatory 2-arylpropionic acids with photosensitizing side effects, *Photochem. Photobiol.*, 2001, 74, 637-655.

[48] Churakova, N. I.; Kravchenko, N. A.; Serebryakov, E. P.; Kaverzneva, E. D. Nature of tryptophan photooxidation products in lysozyme in the presence of methylene blue. *Biokhimiya (Moscow)* (1976), 41(5), 822-6.

[49] Andley U P; Clark B A. The effects of near-UV radiation on human lens beta-crystallins: protein structural changes and the production of O<sub>2</sub>- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Photochemistry and photobiology* (1989 Jul), 50(1), 97-105.

[50] Walrant, P.; Santus, R. N-Formylkynurenine, a tryptophan photooxidation product, as a photodynamic sensitizer. *Photochemistry and Photobiology* (1974), 19(6), 411-417.

[51] Walrant, P.; Santus, R.; Grossweiner, L.I. Photosensitizing properties of N-formylkynurenine. *Photochem. Photobiol.* 22(1/2): 63-5 (1975).

[52] S. G. Bertolotti, N. A. Garcia and G. A. Argüello , Effect of the peptide bond on the singlet molecular oxygen-mediated photo-oxidation of tyrosine and tryptophan dipeptides, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 1991, 10, 57–70.

[53] Bent, D.V.; Hayon, E. Excited state chemistry of aromatic amino acids and related peptides. III. Tryptophan. *J. Am. Chem. Soc.* 97: 2612-9 (1975).

[54] Spodheim-Maurizot M; Charlier M; Helene C. Photochemical modifications of lac repressor: effect of effectors binding on tryptophan photooxidation. *Photochemistry and photobiology* (1985 Oct), 42(4), 353-9

[55] Vorobey, A. V.; Pinchuk, S. V. Formation and photosensitizing activity of protein tryptophan photochemical destruction products in isolated erythrocyte membranes. *Biofizika* (1995), 40(2), 342-6.

[56] Jasminka Mizdrak, Peter G. Hains, Danuta Kalinowski, Roger J. W. Truscott, Michael J. Davies and Joanne F. Jamie. Novel human lens metabolites from normal and cataractous human lenses. *Tetrahedron* 63 (2007) 4990-4999.

[57] Terness, Peter; Bauer, Thomas; Opelz, Gerhard. Use of tryptophan metabolites as pharmaceutical agents. Germany. Eur. Pat. Appl. (2003).

[58] Wood, A. M. and R. J. W. Truscott (1994) Ultraviolet filter compounds in human lenses: 3-hydroxykynurenine glucoside formation. *Vis. Res.* **34**,1369-1374. È IL 61

[59] Ming Sun and Seymour Zigman. Isolation and identification of tryptophan photoproducts from aqueous solutions of tryptophan exposed to near-UV light. *Photochemistry and photobiology* Volume 29 Issue 5 Page 893-897, May 1978.

[60] Liang Shen, Hong-Fang Ji. Theoretical exploration of the photosensitive properties of xanturenic acid, a tryptophan metabolite in cataractous human lenses. *Dyes and Pigments* 76 (2008) 646-649.

[61] Simat, T. J.; Steinhart, H. Oxidation of free Tryptophan and Tryptophan Residues in Peptides and Proteins. *Juornal of Agricultural and Food Chemistry* (1998), 46(2), 490-498.

[62] Anastasia korlimbinis, J Andrew Aquilina, Roger J.W. Trascott. Protein-bound UV filters in normal human lenses: the concentration of bound UV filters equals that of free UV filters in the center of older lenses. *Investigstive ophthalmology & visual science* (2007), 48(4), 1718-23.

[63] Yesu T. Das, Manashi Bagchi, Debasis Bagchi and Harry G. Preuss. Safety of 5-hydroxy-L -tryptophan. *Toxicology Letters*. Volume 150, Issue 1, 15 April 2004, Pages 111-122.

[64] Dyer, J. M.; Bringans, S. D; Bryson, W. G.. Canesis Network Ltd., Lincoln, N. Z. Characterisation of photo-oxidation products within photoyellowed wool proteins: tryptophan and tyrosine derived chromophores. *Photochemical & Photobiological Sciences* (2006), 5(7), 698-706.

[65] Schafer, K.; Goddinger, D.; Hocker, H. photodegradation of tryptophan in wool. *Journal of the society of Dyers and colourists* (1997), 113(12), 350-355.

[66] Wang, Wei; Qiu, Bin; Xu, Xueqin; Zhang, Lan; Chen, Guonan. Separation and determination of L-tryptophan and its metabolites by capillary micellar electrokinetic chromatography with amperometric detection.. *Electrophoresis* (2005), 26(4-5), 903-910.

[67] Jk McCormack, AJ Beitz and AA Larson. Autoradiographic localization of tryptamine binding sites in the rat and dog central nervous system. *Journal of Neuroscience*, 6, 94-101, 1986.

[68] Tsentalovich Yuri P. ; Snytnikova Olga A. ; Forbes Malcolm D. E. ; Chemyak Elena I. Morozov Sergey V. Photochemical and thermal reactivity of kynurenine. 2006, vol. 83, n°6, pp. 1439-1445

[69] Tsuchida, M.; Hayaishi, Osamu; Stanier, R. Y. Bacterial oxidation of tryptophan.IV. Analysis of two blocked oxidations. *Journal of Bacteriology* (1952) 64 49-54.

[70] Amy C. Chess<sup>1</sup>, Michael K. Simoni, Torey E. Alling and David J. Bucci. Elevations of Endogenous Kynurenic Acid Produce Spatial Working Memory Deficits. *Schizophrenia Bulletin* 2007 33(3):797-804

[71] F. Takeuchi, R. Tsubouchi, S. Izuta, Y. Shibata, Kinurenin metabolism and Xanthurenic acid formation in vitamin B6-deficient rat after tryptophan injection; *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 1989, 35, 111-122.

[72] D. Creed, The photophysics and photochemistry of the near-uv absorbing amino acids –II. Tyrosine and its simple derivatives , *Photochem. Photobiol.*, 39 (1984) 563-575.

[73] Miguel A. Miranda, Jose V. Castell, Daniel Hernandez, Maria J. Gomez-Lechon, Francisco Bosca, Isabel M. Morera, and Zaideth Sarabia Drug-Photosensitized Protein Modification: Identification of the Reactive Sites and Elucidation of the Reaction Mechanisms with Tiaprofenic Acid/Albumin as Model System *Chem. Res. Toxicol.* 1998, 11, 172-177

[74] G. T. Wondrak, M. K. Jacobson and E. L. Jacobson, Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2006, 5, 215–237.

[75] E. Silva, C. De Landea, A. M. Edwards and E. Lissi, Lysozyme photo-oxidation by singlet oxygen: properties of the partially inactivated enzyme, *Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 2000, 55, 196-200.

[76] B. Lambrecht, S. G. Norley, R. Kurth, H. Mohr, Rapid inactivation of HIV-1 in single donor preparations of human fresh frozen plasma by methylene blue/light treatment. *Biologicals* 22 (1994) 227-231

[77] Michaeli and J. Feitelson, Reactivity of singlet oxygen toward proteins: the effect of structure in basic pancreatic trypsin inhibitor and in ribonuclease A, *Photochem. Photobiol.*, 1997, 65, 309-315.

[78] N. R. Parker, J. F. Jamie, M. J. Davies and R. J. W. Truscott, Protein-bound kynurenine is a photosensitizer of oxidative damage, *Free Rad. Biol. Med.*, 2004, 37, 1479-1489.

[79] U. Khan and T. Wilson, Reactive oxygen species as cellular messengers, *Chem. Biol.*, 1995, 2, 437-445

[80] C. Wehrli, Extraterrestrial Solar Spectrum Publication, Vol. No. 615, Physikalisch Meteorologisches Observatorium and World Radiation Center (PMO/WRC), Davos Dorf, Switzerland, 1985.

[81] Philip E. Morgan, Allan D. Sturgess, Michael J. Davies Increased levels of serum protein oxidation and correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. [Volume 52, Issue 7](#), pages 2069–2079, July 2005

[82] Anastasia korlimbinis, Peter G. Hains, Roger J.W. Truscott, and J Andrew Aquilina. 3-Hydroxykynurenine Oxidizes  $\alpha$ -Crystallin: Potential Role in Cataractogenesis. *Biochemistry* 2006, 45, 1852-1890.

[83] J. D. Spikes, G. Jori, Photodynamic therapy of tumours and other diseases using porphyrins, *Lasers Med. Sci.* 2 (1987) 3-15.

- [84] R. C. Straight and J. D. Spikes, Photosensitized oxidation of biomolecules, in A. A. Frimer (ed.), Singlet Oxygen, Vol. IV, CRC Press, Boca Raton, 1985, Chapter 2, pp 91-143.
- [85] Michael J. Davies. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. Biochemical and Biophysical Research Communications. Volume 305, Issue 3, 6 June 2003, Pages 761-770
- [86] David Pattison and Michael Davies. Actions of ultraviolet light on cellular structures. Cancer: cell structures, carcinogens and genomic instability, 2006, Volume 96, 131-157
- [87] M.J. Davies and R.J. Truscott, Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis. J. Photochem. Photobiol. B, 63 (2001), pp. 114–125.
- [88] F. Trautinger, Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. Clin. Exp. Dermatol., 26 (2001), pp. 573–577
- [89] L. Weil, On the mechanism of photooxidation of amino acids sensitized by methylene blue, Arch. Biophys., 110 (1965) 57-68.
- [90] C. A. Benassi, E. Scoffone, G. Galiazzo and G. Jori, Proflavine sensitized photooxidation of tryptophan and related peptides, Photochem. Photobiol., 6 (1967) 857-866.
- [91] E. R. Stadman, Protein Oxidation and Aging. Science, Vol. 257, 28 August 1992.

[92] Khalilah G Reddie, Kate S Carroll. Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. *Current Opinion in Chemical Biology*. Vol 12, Issue 6, December 2008, Pages 746-754

[93] PIETRO GHEZZI Regulation of protein function by glutathionylation. *Free Radical Research*, June 2005; 39(6): 573–580

[94] Shackelford RE, Heinloth AN, Heard SC, Paules RS. Cellular and molecular targets of protein S-glutathiolation. *Antioxid Redox Signal*. 2005 Jul-Aug;7(7-8):940-50. Review

[95] Shelton MD, Mieyal JJ. Regulation by reversible S-glutathionylation: molecular targets implicated in inflammatory diseases. *Mol Cells*. 2008 May 31;25(3):332-46.

[96] Dalle-Donne I, Milzani A, Gagliano N, Colombo R, Giustarini D, Rossi R. Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Mar;10(3):445-73.

[97] Giustarini D, Dalle-Donne I, Milzani A, Rossi R. Oxidative stress induces a reversible flux of cysteine from tissues to blood in vivo in the rat. *FEBS J*. 2009 Sep;276(17):4946-58.

[98] Berndt C, Lillig CH, Holmgren A. Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Apr;1783(4):641-50.

[99] Lillig CH, Holmgren A. Thioredoxin and related molecules--from biology to health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2007 Jan;9(1):25-47.

[100] Shelton MD, Chock PB, Mieyal JJ. Glutaredoxin: role in reversible protein s-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation. *Antioxid Redox Signal*. 2005 Mar-Apr;7(3-4):348-66.

[101] Gallogly MM, Starke DW, Mieyal JJ. Mechanistic and kinetic details of catalysis of thiol-disulfide exchange by glutaredoxins and potential mechanisms of regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2009 May;11(5):1059-81.

[102] H. Durchschlag, Strategies for the spectroscopic characterization of irradiated proteins and other biomolecules. *Journal of Molecular Structure*. Volumes 565-566, 30 May 2001, Pages 197-203

[103] Maresca V, Flori E, Briganti S, Camera E, Cario-André M, Taïeb A, Picardo M. UVA-induced modification of catalase charge properties in the epidermis is correlated with the skin phototype. *J Invest Dermatol*. 2006 Jan;126(1):182-90.

[104] Fernando Lledí'as, Pablo Rangel, Wilhelm Hansberg. Oxidation of Catalase by Singlet Oxygen. *J. Biol. Chem.*, 273, No. 17, 10630–10637, 1998

[105] Silva E; Salim-Hanna M; Becker M I; de Ioannes A. Toxic effect of a photo-induced tryptophan-riboflavin adduct on F9 teratocarcinoma cells and preimplantation mouse embryos. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. J. international de vitaminologie et de nutrition* (1988), 58, 394-401.

- [106] Wolff, S. P., G.-M. Wang and A. Spector (1987) Pro-oxidant activatistimm of ocular reductants. 1. Copper and riboflavin stimulate ascorbate oxidation causing lens epithelial cytotoxiciti in vitro. *Eye Res.* 45, 777-789.
- [107] J. Bathia, A. Rivera, M. T. Moplen, D. Rassin, W. Gourley, Hepatic function durino short-term total parenteral nutrition: effect of exposure of parenteral nutrients to light, *Pediatrics* 78 (1982) 321-340.
- [108] M.N. Donoso, A. Valenzuela, E. Silva, Tryptophan-riboflavin photoinduced adduca and hepatic dysfunction in rats, *Nutr. Rep. Int.* 37 (1988) 599-606
- [109] E. Silva, J. Godoy, Riboflavin sensitized photooxidation of tyrosine, *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 64 (1994) 253-256.
- [110] A.M. Edwards, F. Barredo, E. Silva, A. E. De Ioannes, M. I. Becker, Apoptosis induction in non-irradiated human HL-60 and Murine NSO/2 tumoral cells by photoproducts of indole-3-acetic acid and riboflavin, *Photochem. Photobiol.* 70 (1999) 645-649.
- [111] Yan-Jun Hu, Yi Liu, Ru-Ming Zhao, Jia-Xin Dong and Song-Sheng Qu. Spectroscopic studies on the interaction between methylene blue and bovine serum albumin. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.* Volume 179, Issue 3, 15 April 2006, Pages 324-329
- [112] D.R. Denver, S.L. Swenson, M. Lynch, An evolutionary analysis of the helix-hairpin-helix superfamily of DNA repair glycosylases, *Mol. Biol. Evol.* 20 (2003) 1603–1611.

- [113] Waldmann, T. A. (1977). In: *Albumin Structure, Function and Uses*. (Eds. V. M. Rosenoer, M. Oratz, and M. A. Rothschild ), 255-273. Pergamon, Oxford
- [114] Hughes, W. L. (1954). In *The Proteins* (H. Neurath and K. Biley, eds.), 2b, 663-755. Academic Press, New York.
- [115] Squire, P. G., Moser, P., and O'Konski, C. T. (1968). The hydrodynamic Properties of Bovine Serum Albumin monomer and Dimer. *Biochemistry* 7; 4261-4272.
- [116] Wright, A. K., and Thompson, M. R. (1975). Hydrodynamic structure of Bovine Serum Albumin determined by Transient Electric Birefringence. *Biophys. J.* 15; 137-141.
- [117] Bloomeld, V.(1966). The Structure of Bovine Serum albumin at Low pH. *Biochemistry* 5; 684-689.
- [118] Bendedouch, D., and Chen, S.H. (1983). Structure and Interparticle Interactions of Bovine Serum Albumin in solution Studied by Small-Angle Neutron Scattering. *J. Phys. Chem.* 87; 1473-1477
- [119] Feng, L., Hu, C. Z., and Andrade, J. D. (1988). Scanning Tunneling microscopic Images of Adsorbed Serum Albumin on Highly Oriented Pyrolytic Graphite. *J. Colloid Interface Sci.* 126; 650-653.
- [120] Brown, J. R., and Shockley, P. (1982). In *Lipid-Protein Interactions* (P. Jost and O. H. Grith, eds.), 1, 25-68. Wiley, New York.

[121] Bos, O. J. M., Labro, J. F. A., Fischer, M. J. E., Witling, J., and Janssen, L. H. M. (1989). The molecular mechanism of the Neutral-to-Base Transition of Human Serum Albumin. *J. Biol. Chem.* 264; 953-959.

[122] Sjöholm, I. and Ljungstedt, I. (1973). Studies on the Tryptophan and Drug-binding Properties of Human Serum Albumin Fragments by anion chromatography and circular dichroism measurements. *J. Biol. Chem.* 248; 8434-8441.

[123] Reed, R. G., Feldho, R. C., Clute, O. L., and Peters, T., Jr. (1975). Fragments of Bovine Serum Albumin Produced by Limited Proteolysis. Conformation and Ligand Binding. *Biochemistry* 14; 4578-4583

[124] Foster, J. F. (1977). In *Albumin Structure, Function and Uses* (V. M. Rosener, M. Oratz, and M. A. Rothschild, eds). pp. 53-84. Pergamon, Oxford.

[125] Riley, D. P. and Arndt, U. W. (1952). New Type of X-ray Evidence on the molecular structure of Globular Proteins. *Nature* 169; 138.

[126] Riley, D. P. and Arndt, U. W. (1953). X-Ray Scattering by some native and denatured Proteins in the solid state. *Proc. Roy. Soc. B.* 141; 93-97

[127] Meenakshi Maruthamuthu and G. Selvakumar. Selective quenching of tryptophanyl fluorescence in bovine serum albumin by the iodide ion. *Journal of Chemical Sciences* Volume 107, Number 1 / February, 1995.

[128] T. Peters Jr., *Adv. Protein Chem.* 37 (1985) 161–245.

- [129] R.G. Eckenhoff, J.S. Johansson, *Pharmacol. Rev.* 49 (1997) 343–367.
- [130] Tuhina Banerjee, Sreelekha K. Singh, and Nand Kishore. Binding of Naproxen and Amitriptyline to Bovine Serum Albumin: Biophysical Aspects *J. Phys. Chem. B*, 2006, 110 (47), pp 24147–24156
- [131] Carter, D. C. and Ho, J. X. (1994). Structure of Serum Albumin. *Adv. Protein Chem.* 45; 153-203.
- [132] Figge, J., Rossing, T. H. and Fencel, V. (1991). The Role of serum-proteins in Acid-Base Equilibria. *J. Lab. Clin. Med.* 117; 453-467.
- [133] Brown, J. R., and Shockley, P. (1982). In *Lipid-Protein Interactions* (P. Jost and O. H. Grith, eds.), Vol 1, pp. 25-68. Wiley, New York.
- [134] F.K. Zimmermann, R. Kern, H. Rasenberger, A yeast strain for simultaneous detection of induced mitotic crossing over, mitotic gene conversion and reverse mutation, *Mutat. Res.* 28 (1975) 381–388.
- [135] G. Miloshev, I. Mihaylov, B. Anachkova, Application of the single cell gel electrophoresis on yeast cells, *Mut. Res.* 513 (2002) 69-74.
- [136] A. Terziyska, L. Waltchewa, P. Venkov, A new sensitive test based on yeast cells for studying environmental pollution, 2000.
- [137] L. Marrot, J. P. Belaidi, C. Chaubo, J. R. Meunier P. Perez, C. Agapakis-Caussé, An in vitro strategy to evaluate the phototoxicity of solar

UV at the molecular and cellular level: application to photoprotection assessment, *Eur. J. Dermatol.* 8 (1998) 403-412

[138] Kamat, P.V.; Lichtin, N.N. Photoinduced electron ejection from methylene blue in water and acetonitrile. *J. Phys. Chem.* 85: 3864-8 (1981)

[139] A. Blázquez-Castro, J. C. Stockert, F. Sanz-Rodríguez, A. Zamarrón and A. Juarranz, Differential photodynamic response of cultured cells to methylene blue and toluidine blue: role of dark redox processes, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2009, 8, 371–376.

[140] W. Vonach and N. Getoff, Formation of  $eaq^-$  from excited thionine and methylene blue in aqueous solutions, *J. Photochem.*, 1983, 23, 233-239.

[141] G. Condorelli, G. De Guidi, S. Giuffrida and L.L. Costanzo, Photosensitizing action of nonsteroidal antiinflammatory drugs on cell membranes and design of protective system. *Coord. . Rev.* 1993, 125, 115-128.

[142] S. Giuffrida, G. De Guidi, P. Miano, S. Sortino, G. Condorelli, and L.L. Costanzo. Molecular Mechanism of Drug Photosensitization:VIII. Effect of Inorganic Ions on Membrane Damage Photosensitized by Naproxen. *J. Inorg. Biochem.* 1996, 63, 253-263.

[143] L.L. Costanzo, G. De Guidi, S. Giuffrida, , G. Condorelli, and G. Pappalardo. Antioxidant Effect of Copper(II) on Photosensitized Lipid Peroxidation. *J. Inorg. Biochem.*, 1995, 57, 115-125

- [144]. Artuso T, Bernadou J, Meunier B, Piette J, Paillous N. Mechanism of DNA cleavage mediated by photoexcited non-steroidal antiinflammatory drugs. *Photochem Photobiol.* 1991, 54, 205-13
- [145] G. De Guidi, R. Chillemi, L.L: Costanzo, S. Giuffrida, S. Sortino, G. Condorelli, J. *Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **23**, 125, (1994).
- [146] A. Pirie, Formation of N-formylkynurenine in proteins from lens and other sources by exposure to sunlight, *Biochem. J.*, 1971, 125, 203-208.
- [147] M. Valero and C. Carrello, Effect of binary and ternary polyethyleneglycol and/or b-cyclodextrin complexes on the photochemical and photosensitizing properties of Naproxen, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 2004, 74, 151–160.
- [148] Hijikata Yasuyo, Hara Katsuko, Shiozaki Yasuko, Murata Kenjiro, Sameshima Yoshito. Determination of free tryptophan in plasma and its clinical application. *J. Clin. Chem..Clin Biochem.* (1984) 22(49) 291-299.
- [149] D. Creed, The photophysics and photochemistry of the near-uv absorbing amino acids–I. Tryptophan and its simple derivatives, *Photochem. Photobiol.*, 1984, 39, 537-562.
- [150] Balzer and R. Hardeland, Action of kynuramine in a dinoflagellate: stimulation of bioluminescence in *Gonyaulax polyedra*, *Comparative biochemistry and physiology. C. Comparative pharmacology*, 1989, 94, 129-132.
- [151] H. Salminen and M. Heinonen, Plant phenolics affect oxidation of tryptophan. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 7472–7481.

[152] R. V. Bensasson, E. J. Land and T. G. Truscott, *Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine: Contributions from Flash Photolysis and Pulse Radiolysis*, Oxford University Press, New York, 1993.

[153] J. Cygler and G. R. Freeman, Effects of solvent structure on electron reactivity and radiolysis yields: 2-propanol/water mixed solvents, *Can. J. Chem.*, 1984, 62, 1265-1270.

[154] H. J. Bielski and G. G. Shiue, *Oxygen Free Radicals and Tissue Damage*, Ciba Foundation Symposium 65 (New Series), Excerpta Medica, New York, 1979.

[155] G. Navon and G. Stein, The reactivity of atomic hydrogen with cysteine, cystine, tryptophan and tyrosine in aqueous solution, *Isr. J. Chem.*, 1964, 2, 151-154.

[156] G. V. Buxton, C. L. Greenstock, W. P. Helman and A. B. J. Ross, Critical review of rate constant for reactions with hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals (OH/O) in aqueous solutions, *Phys. Chem. Ref. Data*, 1988, 17, 513–886.

[157] T. Simat, K. Meyer and H. Steinhart, Synthesis and analysis of oxidation and carbonyl condensation compounds of tryptophan, *J. Chromatogr. A*, 1994, 661, 93-99.

[158] T. V. Birich, N. I. Pozniak, I. M. Byteva, Z. A. Luka and I. I. Ugolev, Role of singlet oxygen in formation of senile cataract, *Oftal'mologicheskii Zhurnal*, 1985, 7, 388-391.

- [159] P. G. Hainsa, L. Gaoa and R. J. W. Truscott, The photosensitiser xanthurenic acid is not present in normal human lenses, *Exp. Eye Res.*, 2003, 77, 547–553.
- [160] Hu Y. J., Liu Y., Shen X. S., Fang X. Y., Qu S. S., J. Studies on the interaction between 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil and bovine serum albumin, *Mol. Struct.*, 2005, 738, 143-147.
- [161] Shoulian Weia, Lixia Zhao, Xianglei Chengc and Jin-Ming Lina, Determination of naproxen with flow injection chemiluminescence of Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>-PbO<sub>2</sub> system and its application for the binding study of naproxen to protein, *Analytica Chimica Acta*, 2005, 545, 65-73.
- [162] M. M. Rahman, M. H. Rahman and N.N. Rahaman, Competitive binding of Ibuprofen and Naproxen to serum bovine albumin: modified form of drug-drug displacement interaction at the binding site, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005, 18, 43-47
- [163] Brotati Chakraborty, Samita Basu Interaction of BSA with proflavin: A spectroscopic approach *J. Luminescence*, 2009, 129, 34-39
- [164] Yi, Ping-gui; Liu, Jun-feng; Shang, Zhi-cai; Yu, Qing-sen. Study on the interaction between methylene blue and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy. *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi*, 2001, 21, 826-828.
- [165] D.C. Carter, X.M. He, *Science*, 1990, 249, 302–303.

[166] P. Miskovsky, D. Jancura, S. Sanchez-Cortes, E. Kocisova, L. Chinsky, J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 6374–6379.

[167] Ogilby, P. R.; Foote, C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 3423-3430.

[168] Esben Skovsen, John W. Snyder, John D. C. Lambert, and Peter R. Ogilby. Lifetime and Diffusion of Singlet Oxygen in a Cell , 2005, J. Phys. Chem.B Lett, *109*, 8570-8573

[169] Davila, J., Harriman, A., *Photochem. Photobiol.*, 1990, 51, 9-19

[170] Reddi, Photokinetic and photophysical measurements of the sensitized photooxidation of the tryptophyl residue in N-acetyl tryphophanamide and in human serum albumine, *Photochem. Photobiol.*, 1987, 45, 345-351

[171] Michaeli A, Feitelson J. Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides. *Photochem. Photobiol.*, 1994, 59, 284-9.

[172] Epe, B., Pflaum, M. and Boiteux, S. (1993) DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems. *Mutat. Res.*, 299, 135-145

[173] Epe, B.(1991) Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem. Biol. Interact.*, 80, 239-260

[174] Floyd, R. A., West, M S., Eneff, K. L. and Schneider, J.E. (1989) Methylene blue plus light mediated 8-hydroxyguanine formation in DNA. *Arch. Biochem. Biophys.*, 273, 106-111

[175] Tuite, E. M. and Kelly, J. M. (1993) Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. *J. Photochem. Photobiol. B*, 21, 103-124.

[176] Sun CL, Chao CC. Potential attenuation of p38 signaling by DDB2 as a factor in acquired TNF resistance. *Int J Cancer*. 2005 Jun 20;115(3):383-7.

[177] Despras E, Daboussi F, Hyrien O, Marheineke K, Kannouche PL. ATR/Chk1 pathway is essential for resumption of DNA synthesis and cell survival in UV-irradiated XP variant cells  
*Hum Mol Genet*. 2010 May 1;19(9):1690-701. Epub 2010 Feb 1.

[178] Pierre-Marie Girard, Mariaelena Pozzebona, Fabien Delacote, Thierry Douki, Violetta Smirnova, Evelyne Sage. Inhibition of S-phase progression triggered by UVA-induced ROS does not require a functional DNA damage checkpoint response in mammalian cells. *DNA repair*. 2008, 7,1500–1516

[179] O. Kurnasov, L. Jablonsky, B. Polanuyer, P. Dorrestein, T. Begley e A. Osterman, Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel Kynurenin formidase, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2003, 227, 219-227.