



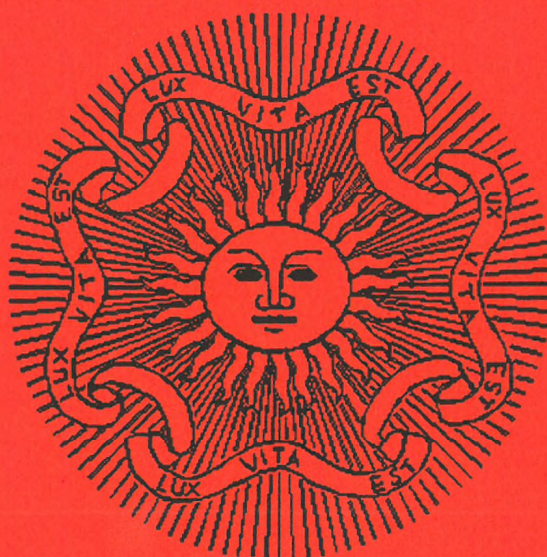
Consiglio Nazionale delle Ricerche

Istituto di Biofisica, Pisa

Centro di Studio per l'Istochimica, Pavia

Società Italiana di Fotobiologia

Sezione Nazionale della International Union for Photobiology



Congresso Annuale

Santa Croce in Fossabanda

Pisa, 24 - 26 Maggio 2001

Programma e Abstracts



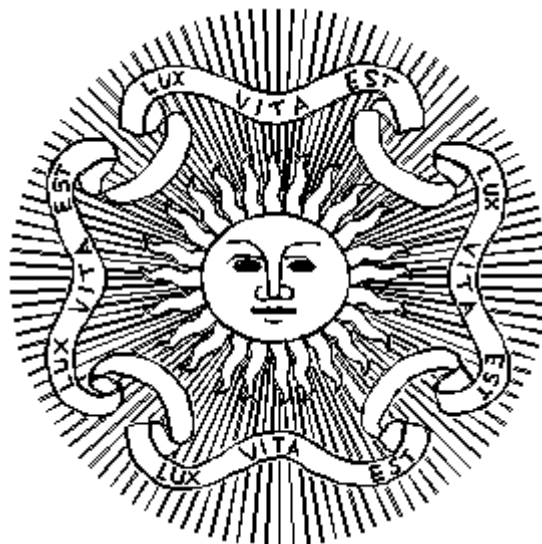
Consiglio Nazionale delle Ricerche

Istituto di Biofisica, Pisa

Centro di Studio per l'Istochimica, Pavia

Società Italiana di Fotobiologia

Sezione Nazionale della International Union for Photobiology



Congresso Annuale
Santa Croce in Fossabanda
Pisa, 24 - 26 Maggio 2001

Programma e Abstracts

Comitato Scientifico

Roberto Barbato

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Avanzate, Università del Piemonte Orientale, Alessandria

Giovanni Bottioli

Centro di Studio per l'Istochimica CNR, Università degli Studi di Pavia

Sergio Caffieri

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Padova

Gianfranco Canti

Dipartimento di Farmacologia, Università di Milano

Francesco Ghetti

Istituto di Biofisica CNR, Pisa

Marcella Guarrera

DISEM Sezione di Dermatologia, Università di Genova

Francesco Lenci

Istituto di Biofisica CNR, Pisa

Elena Reddi

Dipartimento di Biologia, Università di Padova

Paola Taroni

Istituto di Fisica, Politecnico di Milano

Segreteria Scientifica

Francesco Ghetti

Istituto di Biofisica

Consiglio Nazionale delle Ricerche

Area della Ricerca di Pisa

Via G. Moruzzi 1, 56100 PISA

Tel: 050 3152764, Fax: 050 3152760, E-mail: ghetti@ib.pi.cnr.it

Segreteria Organizzativa

Rosaria De Luca, Francesco Ghetti, Claudia Neri

Claudia Petrongolo, Sabina Rolandelli, Antonella Sgarbossa

Istituto di Biofisica

Consiglio Nazionale delle Ricerche

Area della Ricerca di Pisa

Via G. Moruzzi 1, 56100 PISA

Tel: 050 3152764, Fax: 050 3152760

Il Congresso è organizzato con il contributo di
Presidenza del Consiglio Nazionale delle Ricerche
Banca Toscana
Crisel Instruments, Roma
LOT Oriel Italia, Milano
L.O.T.O. Scientific Instruments, Firenze

ed

il patrocinio di
SIDEV, Società Italiana di Dermatologia e Venereologia
GIFDE, Gruppo Italiano di Fotodermatologia
ESP, European Society for Photobiology

Programma

Giovedì 6 Giugno

14.00-14.45 **Registrazione e accoglienza**

14.45 **Apertura dei lavori**

Chairperson: **G. Bottiroli** (Pavia)

15.30 **M.A.J. Rodgers** (Bowling Green, OH, USA)

Excited state dynamics of metallotetrapyrroles, photosensitizers for photothermal therapy (*pag. 1*)

15.40 G. Forti, G. Finazzi, **A. Furia** (Milano)

Sintesi e utilizzazione fotosintetica di ATP e NADPH in *Chlamydomonas reinhardtii* (*pag. 12*)

15.55 **G. Zucchelli**, O. Cremonesi, G. Cinque, R. Bassi, F.M. Garlaschi, R.C. Jennings (Milano; Verona)

Spettro di assorbimento della clorofilla a: connessione tra i parametri vibrazionali microscopici e la forma della banda di assorbimento a temperatura ambiente (*pag. 13*)

16.10 Coffee break

Chairperson: **G. Forti** (Milano)

16.40 **R. Barbato** (Alessandria)

Inattivazione della fotosintesi ossigenica indotta da luce UV-B: meccanismi di inattivazione e riparo (*pag. 14*)

17.20 **P.B. Vidyasagar**, J. Gaikwad, S. Thomas (Pune, India)

Assessment and characterization of the effects of indiscriminate application of pesticides along with gibberellic acid on the photosystem II of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves (*pag. 15*)

17.35 **E. Bergo**, R. Barbato, I. Szabò, G.M. Giacometti (Padova; Alessandria)

Effetti della radiazione UV-B sull'apparato fotosintetico (*pag. 16*)

17.50 **C. Bagnoli**, S. Rolandelli, F. Ghetti (Pisa)

Spettri d'azione UVB dell'inibizione dell'attività fotosintetica in alghe verdi unicellulari (*pag. 17*)

18.05 **A. Segalla**, A. Brunetta, E. Bergantino, I. Szabò, G.M. Giacometti (Padova)

Caratterizzazione di mutanti di *Synechocystis* 6803 PSI-less con subunità PSII-H (PsbH) modificate (*pag. 18*)

18.20 **R. Vismara**, L. Barsanti, F. Verni, P. Gualtieri (Pisa)

A novel mutant of *Dunaliella salina* (*pag. 19*)

18.35 G. Agati, M. Monici, **C. Galardi**, A. Romani, E. Gravano, M. Tattini (Firenze)

Localizzazione di flavonoidi in tessuti fogliari di *Phillyrea* mediante microfluorimetria multispettrale ad immagine (*pag. 20*)

Venerdì 25 Maggio

Chairperson: **F. Lenci** (Pisa)

- 9.00 **L. Maffei** (Pisa)
Development and plasticity of the visual system: role of neurotrophins (*pag. 21*)
- 9.40 **G. Chiti**, D. Dei, M.P. De Filippis, L. Fantetti, F. Giuntini, G. Roncucci (Firenze)
Synthesis of cationic Zn(II) phthalocyanines and their activity in the photodynamic inactivation of *Candida albicans* cells (*pag. 22*)
- 9.55 **P. Sarri**, G. Chiti, M.P. De Filippis, D. Dei, L. Fantetti, G. Roncucci (Firenze)
Sintesi e valutazione dell'attività fotobioicida di derivati ftalocianinici (*pag. 23*)
- 10.10 **D. Nistri**, G. Chiti, L. Fantetti, F. Giuntini, G. Roncucci (Firenze; Padova)
Sintesi di alchilossi Zn(II)-ftalocianine 3a+b e dei loro tioanaloghi e studi di inattivazione fotodinamica su *Candida albicans* (*pag. 24*)
- 10.25 **M. Soncin**, A. Busetti, M.P. De Filippis, D. Dei, F. Giuntini, G. Jori, G. Roncucci (Firenze; Padova)
Effetto della struttura chimica di Zn-ftalocianine sull'efficienza di fotoinattivazione di *Staphylococcus aureus* (*pag. 25*)
- 10.40 Coffee break

Chairperson: **G. Canti** (Milano)

- 11.10 **E. Boer**, M. Ceccon, G. Jori (Padova)
Relazione tra struttura chimica di ftalocianine ed attività fotosensibilizzatrice su fibroblasti umani trasformati (*pag. 26*)
- 11.25 G. Bottiroli, **A.C. Croce**, R. Supino, K.S. Lanza, S. Fiorani, D. Locatelli, P. Baglioni (Pavia; Milano; Firenze)
Accumulo di fotosensibilizzanti in cellule con resistenza spontanea a farmaci diversi (MDR-1): studio comparativo con Rhodamina 123, Rosa Bengala acetato e Photofrin[®] (*pag. 27*)
- 11.40 **A.C. Croce**, M. Biggiogera, K.S. Lanza, S. Fiorani, S. Lussignoli, D. Locatelli, G. Bottiroli (Pavia)
Rosa bengala acetato: fotosensibilizzazione e siti di danno subcellulare (*pag. 28*)
- 11.55 **L. Levorato**, G. Miolo, E. Reddi, S. Caffieri (Padova)
Capacità emolitica di fotoprodotti delle fenotiazine (*pag. 29*)
- 12.10 **R. Zanoni**, L. Borsetto, L. Levorato, S. Caffieri, E. Reddi (Padova)
Attività fototossica di fenotiazine su cellule in coltura (*pag. 30*)
- 12.25 **Andrea D'Orlando** (LOT Oriel Italia, Milano)
Irraggiamento, simulazione solare e spettroscopia (*pag. 31*)
- 13.00 **Colazione di lavoro presso la sede del Congresso**

Venerdì 25 Maggio

Chairperson: **M. Guarrera** (Genova)

14.30 **G. Monfrecola** (Napoli)

L'opinione dei giovani sui danni da luce solare e lettini UV (*pag. 32*)

15.10 D. Adami, **M. Romanelli**, L. Vannucci, F. Mosca (Pisa)

Terapia fotodinamica clinica e sperimentale (*pag. 33*)

15.25 **F. Riva**, L.A. Stivala, B. Ducommun, E. Prosperi (Pavia; Toulouse, F)

Ruolo della proteina p21^{waf1/cip1} nella risposta cellulare al danno al DNA indotto da radiazioni UV-C (*pag. 34*)

15.40 **R. Rossi**, L. Mavilia, F. Prignano, P. Campolmi, P. Cappugi (Firenze)

Terapia fotodinamica e sue applicazioni cliniche in dermatologia (*pag. 35*)

15.55 **C.A. Checchi** (L.O.T.O. Scientific Instruments, Firenze)

Presentazione di illuminatori per uso fototerapico con radiazione filtrata a lunghezze d'onda determinate

16.10 Coffee break

Chairperson: **R. Cubeddu** (Milano)

16.40 **P. Taroni**, A. Pifferi, A. Torricelli, R. Cubeddu (Milano)

Spettroscopia di riflettanza risolta nel tempo per la caratterizzazione dei tessuti biologici *in vivo* (*pag. 36*)

16.55 A. Colasanti, A. Kisslinger, **R. Liuzzi**, M. Quarto, P. Riccio, G. Roberti. (Napoli)

Transilluminazione di disomogeneità sferiche in soluzioni di Intralipid (*pag. 37*)

17.10 G. Bottiroli, A.C. Croce, K.S. Lanza, **S. Fiorani**, D. Locatelli, R. Nano, E. Giombelli, F. Tancioni, E. Benericetti (Pavia; Parma)

Diagnosi in tempo reale basata sull'autofluorescenza per la resezione selettiva di tumori in neurochirurgia (*pag. 38*)

17.25 **Sabrina Picucci** (Crisel Instruments, Roma)

Sistema integrato per imaging confocale a campo largo

17.40 **Presentazione del giornale congiunto della European Society for Photobiology e della European Photochemistry Association**

18.00 **Assemblea dei soci**

Ricordo di Laura Polo

20.00 **Cena sociale presso la sede del Congresso**

Sabato 26 Maggio

Chairperson: **G. Jori** (Padova)

- 9.00 **S. Monti** (Bologna)
Fotochimica di farmaci fotosensibilizzanti (*pag. 39*)
- 9.40 **C. Marzano**, F. Bordin, F. Baccichetti, F. Carlassare, G. Pastorini, P. Rodighiero (Padova)
Aspects of the photobiological properties of some trimethylpsoralen derivatives (*pag. 40*)
- 9.55 **L. Varriale**, E. Coppola, M. Quarto, S. Salzano, G. Palumbo (Napoli)
Fotostimolazione di ipericina a basse dosi di radiazione laser (argon dye laser, 599nm): effetti differenziali sull'espressione genica e ciclo cellulare in cellule da carcinoma endometriale (*pag. 41*)
- 10.10 **B. Masala**, A. Gallone, G. Bottiroli (Pavia; Milano)
Caratterizzazione microspettrofluorimetrica di pellicole pittoriche: studio di leganti e vernici (*pag. 42*)
- 10.25 **M. Magaraggia**, C. Fabris, F. Giuntini, G. Roncucci, G. Jori (Padova; Firenze)
Boroftalocianine: potenziali agenti foto/radiosensibilizzanti per l'applicazione combinata di BNCT e PDT nella terapia di tumori (*pag. 43*)
- 10.40 Coffee break

Chairperson: **E. Reddi** (Padova)

- 11.10 **C. Beghetto**, M. Camerin, S. Gobbo, G. Tognon, C. Salet, G. Moreno, F. Ricchelli (Padova; Paris, F).
Perturbation of the mitochondrial membrane structure by disaccharides (*pag. 44*)
- 11.25 **M. Camerin**, K. Poussin, S. Gobbo, G. Moreno, F. Ricchelli, C. Salet (Padova; Paris, F)
The microenvironment of the sensitizer in mitochondrial membranes modulates the photodamage induced by singlet oxygen: a study on the permeability transition (*pag. 45*)
- 11.40 **K.S. Lanza**, S. Fiorani, D. Locatelli, A.C. Croce, G. Bottiroli (Pavia)
Equilibri redox nel metabolismo cellulare: studio mediante microspettroscopia di autofluorescenza (*pag. 46*)
- 11.55 G. Bottiroli, **A.C. Croce**, S. Fiorani, K.S. Lanza, S. Lussignoli, B. Masala, C. Pellicciari, M.G. Bottone, S. Barni (Pavia)
Tecniche microspettrofluorimetriche nello studio di eventi precoci dell'apoptosi: trasferimento di energia di risonanza in fluorescenza e autofluorescenza (*pag. 47*)

Poster

- F. Giuntini**, D. Nistri, G. Chiti, M.P. De Filippis, L. Fantetti, G. Roncucci (Padova; Firenze)
Sintesi ed attività fotodinamica di derivati arilossi-sostituiti di zinco ftalocianina e degli analoghi solforati (*pag. 48*)

Abstracts

POTENTIAL ROLE OF FLAVONOIDS AS ANTIOXIDANTS AND UV FILTERS IN PLANTS

Janet F. Bornman

Lund University, Department of Plant Physiology, Lund, Sweden

Regulatory, acclimatory and long-term adaptive mechanisms of plants may be affected by an increased amount of ultraviolet-B radiation (UV-B, 280-315 nm) as a consequence of a decreased stratospheric ozone layer. A particularly common plant response is the induction of UV-absorbing phenolic compounds such as flavonoids. These compounds usually provide an effective, protective shield, reducing the amount of UV radiation within leaves. Good correlations between UV penetration across leaves and UV-absorbing pigment accumulation have been shown using quartz optical fibres to probe the light environment within the leaf and biochemical assays to determine pigment content.

Apart from the physical screening function of the flavonoids, selective increases in specific major flavonoid compounds during exposure to enhanced levels of UV-B radiation have been suggested to favour antioxidant activity. These highly-induced compounds are commonly those with additional hydroxyl groups in the B ring of the flavonoid skeleton.

Evidence of protective mechanisms during exposure of plants to enhanced levels of UV-B radiation has been seen in certain cross-tolerance studies. In *Ocimum basilicum* plants grown under relatively low levels of supplemental UV-B radiation, a lower amount of reactive oxygen species (ROS) was measured by chemical assays and spin trapping EPR spectroscopy when these plants were challenged with increased levels of UV-B radiation. UV-grown plants showed evidence of providing further protection against an additional stress of severe drought. Plants containing higher amounts of UV-absorbing compounds showed greater tolerance to both drought and UV-B radiation than those with a lower content. Not only was photosynthetic activity less affected in the former, but also a lower level of ROS and lipid peroxidation was seen. In *Brassica napus*, additional evidence of cross-tolerance was observed when plants were subjected to enhanced levels of UV-B radiation and low temperatures. Using microscale photoacoustics and radiolabelled carbon dioxide, gradients of oxygen evolution and carbon dioxide fixation were followed across the leaves of plants grown under supplemental UV-B radiation or in its absence. Stress tolerance was tested in subsequent short-term exposures to high visible irradiance and low temperatures, with results showing that UV-B radiation appeared to decrease plant susceptibility to low temperature and high visible radiation.

Thus the potential modifying role of an enhanced level of UV-B radiation is a complex one, and it appears that in the case of certain flavonoid compounds a dual function is operative, viz., that of partial absorption of UV radiation and antioxidant capability.

**SINTESI E UTILIZZAZIONE FOTOSINTETICA DI ATP E NADPH
IN *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII***

Giorgio Forti, Giovanni Finazzi e **Alberto Furia**

*Centro di Studio CNR Biologia Cellulare e Molecolare delle Piante
Dipartimento di Biologia, via Celoria 26, Milano 20133*

Nelle piante verdi è stato dimostrato, sia *in vivo* che in cloroplasti isolati, che la fotosintesi in stato stazionario genera un rapporto ATP/ADP molto basso [1], e che la diminuzione dell'intensità della luce provoca la diminuzione della concentrazione di ATP e l'aumento di quella di NADPH, insieme alla diminuzione della velocità di fotosintesi [2]. Questo è in accordo con il fatto che la catena di trasporto degli elettroni dall'H₂O allo NADP produce una molecola di ATP per molecola di NADPH, cioè 1 ATP/2 elettroni. È noto che la assimilazione di CO₂ nel ciclo di Calvin richiede 3 ATP + 2 NADPH/CO₂. Altri fotoni debbono essere quindi assorbiti ed utilizzati per la sintesi di ATP da parte dei tilacoidi perché la fotosintesi possa procedere. Si pensa che il trasporto di elettroni lineare del sistema Mehler-ascorbato [3], oppure il trasporto ciclico di elettroni intorno al PS1 [4] contribuiscano ad incrementare il rapporto ATP/NADPH.

Abbiamo studiato le variazioni delle concentrazioni di ATP ed NADP in cellule di *Chlamydomonas reinhardtii*. A differenza di quanto riportato nel caso delle piante superiori, abbiamo riscontrato che la concentrazione di ATP ed il rapporto ATP/ADP aumentano alla luce in quest'alga unicellulare. Peraltro, il rapporto ATP/ADP è già molto elevato anche al buio (vedi anche [5]). Al contrario, l'illuminazione induce una sostanziale e veloce ossidazione di NADPH, ed un aumento del rapporto NADP/NADPH. Sembra dunque che in *Chlamydomonas* la stechiometria del rapporto ATP/NADPH prodotti dal trasporto lineare di elettroni fotosintetico non limiti l'assimilazione di CO₂, come invece avviene nelle piante superiori. Siccome è noto che l'assimilazione di CO₂ in *Chlamydomonas r.* avviene attraverso il ciclo di Calvin, si deve concludere che in questo organismo, e forse in altre alghe verdi, il trasporto di elettroni lineare attraverso i due fotosistemi può produrre ATP e NADPH in rapporto superiore a 1.5, il minimo richiesto per il funzionamento del ciclo di Calvin.

- [1] Portis A.R. Jr., Chong Ja Chou, Mosbach A., Heldt H.W. (1977) Biochim. Biophys. Acta 461: 313-325.
- [2] Heber U. (1973) Biochim. Biophys. Acta 305: 140-152.
- [3] Forti, G. and Elli G. (1995) Plant Physiol. 109: 1207-1211.
- [4] Arnon, D.I. (1977) in: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series (Trebst, A. and Avron, M. Eds.) Vol 5, pp. 7-56, Springer-Verlag, Berlin.
- [5] Finazzi G., Furia A., Barbagallo R.P., Forti G. (1999) Biochim. Biophys. Acta 1413: 117-129.

**SPETTRO DI ASSORBIMENTO DELLA CLOROFILLA A:
CONNESSIONE TRA I PARAMETRI VIBRAZIONALI MICROSCOPICI
E LA FORMA DELLA BANDA DI ASSORBIMENTO A TEMPERATURA AMBIENTE**

**Giuseppe Zucchelli¹, Oliviero Cremonesi², Gianfelice Cinque³, Roberto Bassi³,
Flavio M. Garlaschi¹, Robert C. Jennings¹**

¹ *Centro di Studio CNR Biologia Cellulare e Molecolare delle Piante, Università di Milano;*
² *Università di Milano Bicocca;* ³ *Università di Verona*

La clorofilla, il cromoforo più diffuso in natura, si trova, nelle piante superiori, legata ad un insieme strutturalmente complesso di proteine con caratteristiche spettrali che differiscono da quelle misurate in soluzione. Sono presenti diverse forme spettrali, il che rende gli spettri di assorbimento (o fluorescenza) estremamente affollati di contributi diversi. La spettroscopia convenzionale non è sufficiente ad ottenere informazioni dirette sui questi diversi contributi e, a tale scopo, sono state utilizzate tecniche di decomposizione numerica con bande di assorbimento modello (gaussiane). Il modello gaussiano, fisicamente ragionevole per la descrizione del puro contributo dovuto alla transizione elettronica, non tiene conto delle componenti vibrazionali. L'utilizzo di tecniche spettroscopiche selettive (hole-burning, fluorescence line narrowing) ha permesso di ottenere informazioni sui modi normali propri della molecola di clorofilla sia in soluzione che in vivo. Utilizzando tali informazioni, ottenute a bassa temperatura, è possibile calcolare la forma spettrale della banda di assorbimento della clorofilla, utilizzabile come forma modello nella decomposizione degli spettri di assorbimento dei complessi clorofilla-proteina. Tale forma della banda di assorbimento è stata calcolata a temperatura ambiente, confrontandola con gli spettri sperimentali della clorofilla in soluzione in due differenti solventi e con lo spettro della clorofilla "nativa" ottenuto recentemente utilizzando complessi mutati selettivamente. Il risultato indica che i dati delle spettroscopie selettive descrivono lo spettro della clorofilla esacoordinata mentre per descrivere la clorofilla pentacoordinata è necessario "spegnere" il contributo di alcuni modi vibrazionali. Lo spettro della clorofilla "in vivo" è descrivibile negli stessi termini, con l'aggiunta di due nuovi modi a bassa frequenza, dovuti, probabilmente, alla presenza della proteina.

**INATTIVAZIONE DELLA FOTOSINTESI OSSIGENICA INDOTTA DA LUCE UV-B:
MECCANISMI DI INATTIVAZIONE E RIPARO**

Roberto Barbato

*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Avanzate,
Università del Piemonte Orientale Amedeo Avogadro, Corso Borsalino 54, 15100 Alessandria*

L'inattivazione della fotosintesi ossigenica dovuto ad un eccesso di luce è un fenomeno noto come fotoinibizione. Tuttavia, non solo la quantità, ma anche la qualità della luce svolge un ruolo significativo in questo fenomeno. In particolare, radiazioni con lunghezza d'onda tra 280 e 320 nm (ultravioletto B) hanno una elevata resa quantica per il processo di inattivazione, rappresentando un fattore di stress importante anche ad intensità relativamente basse. Il chiarimento dei meccanismi con cui questa radiazione determina l'inattivazione della fotosintesi, quelli con cui le piante si difendono e riparano i danni indotti da questa radiazione, sono diventati, negli ultimi anni, argomenti di studio molto attuali, in quanto l'impoverimento dello strato di ozono atmosferico sta determinando un aumento del livello della radiazione ultravioletta che raggiunge la superficie terrestre, con conseguenze difficilmente prevedibili sull'ecosistema terrestre.

Nel corso della relazione, verranno presentati alcuni dati sui meccanismi alla base del fenomeno di inattivazione dell'apparato fotosintetico da parte della luce ultravioletta-B e sul successivo recupero quando il fattore di stress viene rimosso

**ASSESSMENT AND CHARACTERIZATION OF THE EFFECTS OF INDISCRIMINATE APPLICATION
OF PESTICIDES ALONG WITH GIBBERELIC ACID ON THE PHOTOSYSTEM II
OF GRAPE (*VITIS VINIFERA* L.) LEAVES**

Pandit B. Vidyasagar, Jyoti Gaikwad and Sarah Thomas

University of Pune, Department of Physics, Pune, India

Widespread application of pesticides has no doubt benefited agricultural production. However, since the biochemical processes of cellular and subcellular levels of the target organisms and the host plant are often quite similar, the possibility of direct effects of these protective chemicals on the host plant cannot be overlooked.

Hence, studies related to the effect of pesticides on host plants are essential. This is true especially, in case of an important cash crop, grape, in the Indian scenario. Since grape (*Vitis vinifera* L.) is more susceptible to different types of diseases, application of pesticides throughout its growth phase is a routine practice. However, it has been noted that there is no significant improvement in the yield. Since early 90's, severe losses in vineyards due to the "Pink berry" disease, which is a physiological disorder, has been noticed.

Studies related to the effect of different concentrations of the pesticides viz. endosulfan and benomyl have shown that even their lower concentrations does result in the modification of the photosynthetic electron transport chain. Investigations related to the alterations in the electron transport chain when the pesticide application is followed by treatment with a growth regulator i.e. gibberellic acid, has also been carried out

The treatment of gibberellic acid with the pesticides produced a different TL profile which have indicated the damage to the photosynthetic apparatus due to the combined application of gibberellic acid with pesticides. It was noticed that the TL spectra and thermodynamical parameters from Pink Berry affected leaves showed close resemblance to that for the combined application of all the three pesticides along with GA. The results have therefore indicated that application of pesticides along with GA creates a metabolic stress in the plant, inducing physiological disorders like Pink berry, in case of grape.

EFFETTI DELLA RADIAZIONE UV-B SULL'APPARATO FOTOSINTETICO

Elena Bergo¹, Roberto Barbato², Ildikò Szabò¹ e Giorgio M. Giacometti¹

¹ *Dipartimento di Biologia, Università di Padova;*

² *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Avanzate, Università del Piemonte Orientale.*

Negli ultimi anni viene registrato un costante aumento della quantità di radiazione ultravioletta-B che raggiunge la superficie terrestre a causa della diminuzione dello strato stratosferico di ozono. Tale componente dello spettro solare risulta dannosa per gli organismi viventi in quanto altera la struttura sia del DNA che delle proteine.

Gli organismi vegetali, che utilizzano la luce per effettuare la fotosintesi, sono quindi costretti ad utilizzare una radiazione arricchita in una componente dannosa. E' noto che il principale bersaglio dell'UV-B a livello della catena di trasporto fotosintetico degli elettroni è il fotosistema secondo (PSII), un complesso multiproteico responsabile del trasporto di elettroni dall'acqua al plastochinone. La radiazione UV-B danneggia sia la componente redox che le subunità proteiche del PSII, ma i meccanismi molecolari alla base del danno non si conoscono. A livello proteico la subunità che viene maggiormente danneggiata è D1 che viene degradata generando un frammento C-terminale di 20 kDa e uno N-terminale di 10 kDa.

Lo studio condotto *in vivo* su foglie di orzo ha chiarito alcuni aspetti circa gli effetti dell'UV-B sul turnover della proteina D1, evidenziando la diminuzione della sintesi e l'aumento della degradazione della proteina stessa. Inoltre, contrariamente a quanto si verifica in seguito a danno prodotto dalla luce visibile, i centri danneggiati vengono smantellati e non riparati, determinando il disimpilamento dei tilacoidi. Alcuni esperimenti effettuati *in vitro* hanno permesso inoltre di avanzare più ipotesi circa il possibile meccanismo coinvolto nella degradazione della proteina D1.

Un secondo aspetto preso in esame riguarda il recupero dei centri danneggiati dall'UV-B quando viene eliminata la sorgente del danno. Esperimenti condotti sia *in vivo* che *in vitro* indicano che il frammento di 20 kDa, generato durante irraggiamento con UV-B, viene degradato completamente se i campioni vengono esposti a luce visibile di bassa intensità, mentre rimane inalterato se vengono posti al buio. Questo suggerisce un ruolo della luce nell'attivazione di un possibile meccanismo di recupero.

**SPETTRI D'AZIONE UVB DELL'INIBIZIONE DELL'ATTIVITÀ FOTOSINTETICA
IN ALGHE VERDI UNICELLULARI**

Costanza Bagnoli, Sabina Rolandelli, Francesco Ghetti

CNR Istituto di Biofisica, Pisa

L'aumento della radiazione solare ultravioletta causata dalla diminuzione dell'ozono stratosferico, osservata negli ultimi anni anche nell'emisfero settentrionale, può ridurre la produttività primaria del fitoplancton, con conseguenze negative anche per la catena alimentare marina. Poiché nella regione spettrale UVB l'aumento di irradianza ha una forte dipendenza dalla lunghezza d'onda, gli studi di spettroscopia d'azione possono dare informazioni sulle risposte delle alghe unicellulari a tali cambiamenti ambientali.

In questo lavoro è stato determinato lo spettro d'azione dell'inibizione della fotosintesi determinata dalla radiazione UV-B in seguito ad esposizione di 30 e 60 minuti delle alghe marine unicellulari *Dunaliella tertiolecta*, *Dunaliella salina* e *Chlorella kessleri*. Per l'irraggiamento è stata utilizzata una lampada Oriel Hg-Xe da 1 kW, selezionando le diverse lunghezze d'onda nell'UVB con filtri interferenziali a banda stretta (10 nm). L'inibizione della fotosintesi è stata valutata studiando la resa quantica fotosintetica ottimale (F_v/F_m), per mezzo di un fluorimetro PAM (Pulse Amplitude Modulated Fluorescence).

Per ogni lunghezza d'onda di irraggiamento è stato osservato un decremento dell'attività fotosintetica relativa a quella del controllo, all'aumentare della quantità di fotoni somministrata ai campioni. Tutti gli spettri d'azione mostrano un aumento dell'inibizione con il diminuire della lunghezza d'onda. Alle lunghezze d'onda maggiori le tre specie di alghe mostrano la stessa sensibilità, mentre alle lunghezze d'onda minori le specie appartenenti al genere *Dunaliella* sono più sensibili rispetto a *Chlorella*.

Gli spettri d'azione sono stati infine combinati con ipotetici spettri di irradianza solare, corrispondenti a diverse percentuali di diminuzione dello strato di ozono, per calcolare i corrispondenti RAF (Radiation Amplification Factor).

*Lavoro finanziato da: EC Research Project 'Environment and Climate' (Contract ENV4-CT97-0538)
e Progetto Strategico CNR 'Biosensori'.*

**CARATTERIZZAZIONE DI MUTANTI DI SYNECHOCYSTIS 6803 PSI-LESS
CON SUBUNITÀ PSII-H (PSBH) MODIFICATE**

A. Segalla, A. Brunetta, E. Bergantino, I. Szabò, G.M. Giacometti

Università di Padova, Dipartimento di Biologia, Viale G. Colombo 3, Padova

Il ruolo della subunità H (PsbH) nel fotosistema II (PSII) è stato studiato nei procarioti e negli eucarioti; PsbH risulta essenziale per l'assemblaggio e la stabilità del PSII nell'alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* [1] mentre non è indispensabile nel cianobatterio *Synechocystis* [2]. In entrambi gli organismi tuttavia la subunità H sembra modulare la velocità di trasferimento elettronico tra Q_A e Q_B . Recentemente, dati strutturali hanno evidenziato la vicinanza di PsbH alle subunità D1 e D2 del centro di reazione (RC) in cui sono rispettivamente collocati i siti di legame di Q_B e Q_A [3].

Studi precedenti hanno proposto un ruolo di PsbH nella fotoinibizione [4], ovvero il danno a carico del PSII che si verifica in seguito all'esposizione ad un eccesso di energia luminosa.

Per approfondire ulteriormente l'importanza di PsbH nel PSII dei cianobatteri sono in corso studi funzionali di mutanti di *Synechocystis* 6803 PSI-less, in cui la subunità PsbH è stata sostituita da subunità chimeriche con la proteina H della pianta *Zea mays*. Tale polipeptide presenta un dominio transmembrana, con un elevato grado di omologia tra cianobatteri e piante superiori; è invece assente nei cianobatteri l'estensione N-terminale, esposta nello spazio stromatico nelle piante. In particolare, sono state effettuate misure di fluorescenza ed evoluzione di ossigeno; queste ultime hanno anche evidenziato differenze significative tra i diversi mutanti nella sensibilità alla fotoinibizione.

- [1] Summer E.J., Schmidt V.H.R., Bruns B.U. and Schmidt G.W. (1997) *Plant Physiol.* 113, 1359-1368.
- [2] Mayes S.R., Dubbs J.M., Vass I., Hideg E., Nagy L. and Barber J. (1993) *Biochemistry* 32, 1454-1465.
- [3] Zouni A., Witt H.T., Kern J., Fromme P., Krauß N., Saenger W. and Orth P. (2001) *Nature* 409, 739-743.
- [4] Komenda J. and Barber J. (1995) *Biochemistry* 34, 9625-9631.

A NOVEL MUTANT OF *DUNALIELLA SALINA*

Rosa Vismara^{1,2}, Laura Barsanti¹, Franco Verni², Paolo Gualtieri¹

¹*C.N.R. Istituto di Biofisica, Pisa*

²*Dipartimento di Biologia Evoluzionistica, Protisti, Animali e Uomo, Pisa*

A spontaneous mutant of *Dunaliella salina* (Chlorophyta, Chlorophyceae) was isolated from wild-type cultures. This mutant is characterised by two flagellar stumps, very reduced in length with respect to the wild type (0.5 μm instead of 15 μm). It is maintained under the same growth conditions of the wild type (temperature, light intensity, growth medium and salinity). Light microscopy observation show that these cells do not swim, and ultrastructural investigations confirm that their flagella are only 0,5 μm above the transition zone (200 nm from the flagellar insertion), where autotomy phenomena usually occur. Despite its handicap, the mutant shows a specific photo-behaviour, sensing the light and directing toward it.

Studies are in due course to understand which kind of movement these cells use, which kind of photo-behaviour characterises them, and which proteins and genes are involved in the mutation.

**LOCALIZZAZIONE DI FLAVONOIDI IN TESSUTI FOGLIARI DI *PHILLYREA*
MEDIANTE MICROFLUORIMETRIA MULTISPETTRALE AD IMMAGINE**

Giovanni Agati¹, Monica Monici², **Carlotta Galardi**³, Annalisa Romani³,
Elisabetta Gravano⁴, Massimiliano Tattini⁴

¹*Istituto di Elettronica Quantistica - CNR, Firenze;*

²*CEO - Consorzio di Eccellenza Optronica, Firenze;*

³*Dipartimento di Scienze Farmaceutiche - Università degli Studi, Firenze;*

⁴*Istituto Propagazione Specie Legnose - CNR, Firenze.*

Il ruolo dei polifenoli, e specificatamente quello dei flavonoidi, nei meccanismi di acclimatazione ad un eccesso di radiazione luminosa è stato largamente dimostrato. La localizzazione tessuto specifica di tali metaboliti risulta cruciale per valutarne compiutamente la funzione biologica. Sezioni trasversali ($\approx 30 \mu\text{m}$) di foglie di *Phillyrea latifolia* L. acclimatate a condizioni d'ombra oppure di pieno sole ($\text{PPFD}_{\text{max}} \approx 80$ e $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ rispettivamente) sono state analizzate dopo trattamento con reagente Naturstoff in modo da evidenziare la fluorescenza dei composti polifenolici. Lo spettro di fluorescenza, con eccitazione a 365 nm, dei tessuti fogliari esposti al sole presentava una banda di emissione spostata verso il rosso rispetto a quella di campioni d'ombra, con picchi centrati rispettivamente a 530 e 490 nm. La microfluorimetria multispettrale permetteva di acquisire immagini in sequenza ad otto diverse bande spettrali, selezionate da filtri interferenziali. Immagini monocromatiche a 450, 550 e 650 nm, con eccitazione a 365 nm, sono state ricombinate in una singola immagine a colori RGB in modo da visualizzare la co-localizzazione delle differenti strutture fluorescenti. Le immagini dei campioni esposti al sole mostravano una fluorescenza gialla principalmente associata alla parete adassiale di cellule dell'epidermide superiore ed in cellule dei tricomi ghiandolari. I campioni d'ombra, invece, presentavano una predominante fluorescenza azzurra. I risultati ottenuti sono in accordo con una maggiore sintesi ed accumulo di flavonoidi (glicosidi della quercetina e luteolina) nei tessuti fogliari esposti al sole, come confermato da analisi HPLC-DAD quali-quantitativa di estratti fogliari. La localizzazione tessuto specifica di differenti classi di polifenoli, è stata meglio evidenziata calcolando il rapporto delle immagini di fluorescenza acquisite a due bande distinte nel rosso (650 nm) e nel blu (460 nm) caratteristiche delle due principali classi di polifenoli presenti in *P. latifolia*. Il metodo qui sviluppato consente di valutare la distribuzione tessuto specifica di differenti classi di polifenoli, a partire da modifiche nelle caratteristiche spettrali di fluorescenza di tessuti acclimatati a differenti livelli di stress luminoso, con rilevanti applicazioni nel settore della biologia vegetale e dell'ecofisiologia.

DEVELOPMENT AND PLASTICITY OF THE VISUAL SYSTEM: ROLE OF NEUROTROPHINS

Lamberto Maffei

Scuola Normale Superiore and Istituto di Neurofisiologia del CNR, Area della Ricerca, Pisa, Italy

Neurotrophins have usually been considered for their involvement in the development of the nervous system and for differentiation and maintenance of specific functions of certain classes of neurones in adult life. In recent years evidence has emerged that neurotrophins might have other functions related to neural activity-dependent development and more generally to the plasticity of the brain and in particular of the neocortex. The first evidences in this sense came from studies in visual cortical plasticity in rats (Maffei et al., *J. of Neuroscience*, 1991). The functional properties of mammalian visual cortical neurones are immature at eye opening, and develop gradually during the first months of postnatal life. As shown by Hubel and Wiesel for the cat and monkey also the development of the rat visual system is strongly influenced by manipulation of visual experience such as monocular deprivation or dark rearing. For instance, one week of monocular deprivation (MD) during the critical period is sufficient to shift the ocular dominance distribution of visual cortical cells so that 80% of the cells are driven exclusively or predominantly by the non deprived eye. Exogenous NGF counteracts in rats MD and dark rearing effects; block of endogenous NGF action severely interferes with development of the visual system and prolongs the critical period.

Subsequently, a large number of investigations tackled the problem of the role of neurotrophins on the plasticity of the visual system, employing different species and different experimental protocols. The results obtained are not always in accordance and there is still controversy on the identity of the active neurotrophin. It is still unclear, in particular, whether different neurotrophins play similar or different roles and which are their effects on the electrical activity of cortical neurones *in vivo*. We therefore compared the effects of all neurotrophins, NGF, BDNF, NT-4 and NT-3 on visual cortical plasticity and on cell spontaneous and visually evoked activity. Rats were monocularly deprived for one week at the peak of the critical period and neurotrophins infused intracortically. Assessment of the outcome of MD was done electrophysiologically, by *in vivo* recordings from the striate cortex contralateral to the deprived eye. We found that different neurotrophins play their roles in visual cortical plasticity through different mechanisms and in particular through a different interplay with electrical activity. NGF and NT-4 are both able to counteract the effects of monocular deprivation without causing any detectable alteration in cell responsiveness or selectivity. BDNF is less effective on ocular dominance plasticity and, in addition, strongly affects visual cortical cell spontaneous and evoked activity. BDNF has a peculiar characteristic: it is the only neurotrophin which alters visual cortical cell electrical activity, both spontaneous and evoked. Particularly interesting seems the similarity between the effects of NGF and NT-4, which bind to different receptors, especially if compared with the difference in action between the two *trkB* ligands, BDNF and NT-4. This difference becomes striking at close distance from the infusion site, where BDNF induces a paradoxical dominance of the deprived eye on visual cortical cells while NT-4 does not. A possible mechanism of action of neurotrophins on neural plasticity is the modulation of synaptic efficacy: we have then investigated whether neurotrophins and electrical activity interact in modulating, in the visual cortex, intracortical inhibitory and excitatory systems and cholinergic system. Neurotrophin action on neurotransmitter release has been studied in visual cortical synaptosomes and neurotrophin action on the expression of key synaptic molecules for glutamatergic and GABAergic systems in the visual cortex has been studied with immunoblotting. We have found that different neurotrophins differentially modulate neurotransmitter release and synaptic protein expression in GABAergic, glutamatergic and cholinergic systems.

In a parallel study we have shown that neurotrophins, in particular NGF and BDNF can prevent the effects of dark rearing. It is well known that dark rearing slows down the maturation of the visual cortex, impairing the development of its functional properties. In man the effects of bilateral congenital cataract are dramatically detrimental, in the sense that if the cataract is not operated upon early in life, vision remains permanently impaired. In rats exogenous administration of NGF, or intrasgenic mice overexpression of BDNF mitigate or completely avoid the effects of dark rearing. In these experiments the functional properties of the binocular visual cortex were evaluated by using electrophysiological methods. It was found that while visual acuity, receptive field size are strongly affected by dark rearing in control animals they are practically normal in the experimental ones. In addition it has been shown that while dark rearing prolongs the critical period for monocular deprivation, the critical period of dark reared BDNF mice is of normal duration. The hypothesis is advanced that during development visual experience is, at least in part simply a ring in the chain of the production of neurotrophins. We discuss these results in a physiological model where different neurotrophins play different roles in regulating visual cortical development and plasticity by acting on different neural targets, such as LGN afferents, excitatory and inhibitory intracortical circuitry and subcortical afferents and propose a tentative scheme summarising these actions.

**SYNTHESIS OF CATIONIC ZN (II) PHTHALOCYANINES AND THEIR ACTIVITY
IN THE PHOTODYNAMIC INACTIVATION OF *CANDIDA ALBICANS* CELLS**

G. Chiti, D. Dei, M.P. De Filippis, L. Fantetti, F. Giuntini e G. Roncucci

Molteni Farmaceutici, S.S. 67, Loc. Granatieri, 50018, Florence; Italy

Interest in using porphyrin and phthalocyanine dyes as photosensitizers in the photodynamic therapy of cancer is increasing [1,2]. Their application in the selective local inactivation of microorganisms also has a remarkable medical potential, but is much less developed.

The improvement of selectivity and efficiency for microorganisms destruction has led to the proposal of several phthalocyanines as photosensitizers [3]. We have synthesized a series of cationic, water-soluble Zn(II) phthalocyanines introducing a different number of quaternary ammonium groups into the peripheral positions of the phthalocyanine framework. Their activity against *C. albicans* was tested by using the colony forming unit assay.

C. albicans cells from the stationary growth phase culture were harvested and washed with PBS. Aliquots of cationic phthalocyanines were added to cell suspensions (10^6 cells/mL) in order to prepare different sensitizer concentrations. The samples were incubated at 37°C for 60 min in the dark and then a red light irradiation step (700 ± 30 nm, 50 mW/cm²) was performed. The samples were 10-fold serially diluted, plated onto agar medium and the colonies formed after incubation (37°C for 24 h) were counted.

An interesting chemical structure-activity relationship has been found. While cationic charges are indeed necessary for the inactivation of this specie, also the amphiphilic nature of the compounds plays an important role and seems to be the key for the improvement of the activity. Zn-phthalocyanines bearing a single quaternary ammonium group display the highest photocytotoxic effect and concentrations as low as 0.1 μ M are required for a 4-log decrease in survival of *C. albicans*.

[1] D. Wöhrle et al. (1990) *Photochem. Photobiol.* 51:351-336.

[2] J.C. Levy (1995) *Trends Biotechnol.* 13:14-18.

[3] A. Minnock et al. (1996) *J. Photochem. Photobiol.* 32:159-162.

SINTESI E VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ FOTOBIOCIDA DI DERIVATI FTALOCIANINICI

P. Sarri, G. Chiti, M.P. De Filippis, D. Dei, L. Fantetti e G. Roncucci

Molteni Farmaceutici, S.S.67, loc. Granatieri, 50018, Scandicci Fi, Italy, Fax: +39 055 7361235

Uno dei campi più interessanti d'applicazione dei derivati ftalocianinici è l'uso che se ne può fare come fotosensibilizzanti nella terapia fotodinamica (PDT) per una larga varietà di patologie come la psoriasi, il cancro e le malattie infettive [1]. Per essere utilizzato nella PDT, un fotosensibilizzante ftalocianinico deve assorbire la luce ad una lunghezza d'onda corrispondente alla regione del rosso dello spettro visibile, entro la cosiddetta "finestra terapeutica". Deve inoltre possedere un elevato coefficiente d'estinzione molare (ϵ), fotostabilità ed una bassa tossicità al buio [2].

In un precedente lavoro è stata descritta la sintesi di una serie di isomeri di una Zn (II) Pc octacationica idrosolubile [3]. Per questi isomeri è stata evidenziata l'efficacia nella fotoinattivazione del lievito *C. albicans* presa come modello di microrganismo patogeno. In questo caso viene descritta la sintesi di due derivati ftalocianinici monosostituiti come N-metilpiperidinossi e degli analoghi cationici di cui è stata valutata l'attività fotodinamica nei confronti di *C. albicans*. È stata evidenziata e confermata l'importanza della presenza di un azoto ammonico. Il passaggio da una struttura di natura ftalocianinica ad una naftalocianinica, mantenendo inalterati i gruppi sostituenti periferici, porta ad una scomparsa dell'attività.

- [1] Wainwright M., Journal of antimicrobial chemotherapy **1998**, 42 13-28
- [2] Yarmush M.L., Thorpe W.P., Strong L., Rakestraw S.L., Toner M., Tompkins R.G., Crit. Rev. Therapeut. Drug Carrier Syst. **1993**, 10 (3) 197
- [3] De Filippis M.P., D., Fantetti L., Roncucci G., Tetrahedron Lett. **2000**, 41 9143-9147

**SINTESI DI ALCHIOSSI ZN(II)-FTALOCIANINE 3A+B E DEI LORO TIOANALOGHI E STUDI DI
INATTIVAZIONE FOTODINAMICA SU *CANDIDA ALBICANS***

Daniele Nistri¹, Giacomo Chiti¹, Lia Fantetti¹, Francesca Giuntini² e Gabrio Roncucci¹

¹*Molteni Farmaceutici, S.S.67, loc. Granatieri, 50018, Scandicci (Fi)*

²*Dipartimento di Fotobiologia, Università di Padova, via Trieste 75, 35121 Padova*

La sintesi e lo studio di ftalocianine hanno trovato negli ultimi anni un notevole impulso grazie alla loro possibile applicazione nella terapia fotodinamica (PDT) dei tumori [1].

Alcune delle applicazioni più interessanti dei fotosensibilizzanti, e delle ftalocianine in particolare, riguardano il loro impiego nella fotoinattivazione di microrganismi ed il potenziale impiego come agenti biocidi alternativi all'uso di antibiotici.

In quest'ottica è stata sintetizzata una serie di Zn(II)-ftalocianine (Zn-PCs) 3A+B sostituite da gruppi ammino e ammonio alchilossi e alchiltio e sono stati effettuati i primi studi per verificare la loro attività fotodinamica *in vitro* su *Candida albicans*, presa come modello di microrganismo patogeno.

Come precedentemente riportato [2], è stata rilevata una maggiore attività fotodinamica per le Zn-PCs che presentano un gruppo ammonico quaternario nella posizione periferica rispetto alle molecole neutre; quest'ultime mostrano, comunque, una discreta attività in quanto sono protonabili a pH fisiologico.

E' stata valutata l'eventuale variazione di attività per la sostituzione ossigeno-zolfo in molecole analoghe.

I risultati ottenuti con questi composti confermano la potenzialità del nucleo ftalocianinico per un futuro sviluppo nel trattamento *in vivo* di infezioni localizzate e ci invitano a proseguire nella sintesi di molecole analoghe, per la completa definizione di uno studio struttura-attività attraverso ulteriori prove *in vitro*, preliminari agli studi *in vivo*.

[1] Wainwright M., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (1998) 42, 13-28

[2] De Filippis M.P., Dei D., Fantetti L., Roncucci G., Oral contribution *First International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines*, Dijon, 25-30 June, 2000

**EFFETTO DELLA STRUTTURA CHIMICA DI ZN-FTALOCIANINE
SULL'EFFICIENZA DI FOTOINATTIVAZIONE DI STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

M. Soncin¹, A. Buseti¹, M.P. De Filippis¹, D. Dei¹, F. Giuntini¹, G. Jori², G. Roncucci¹

¹Molteni Farmaceutici Firenze; ²Dipartimento di Biologia Università di Padova.

La resistenza acquisita dalla maggior parte degli organismi patogeni nei confronti del trattamento con gli antibiotici di uso più comune sta diventando un problema sempre più serio e diffuso su scala mondiale. Le principali organizzazioni sanitarie internazionali hanno recentemente richiamato l'attenzione sulla necessità di limitare l'uso degli antibiotici, allo scopo di prevenire l'insorgenza di ulteriori fattori di resistenza, e di sviluppare nuovi approcci per il trattamento delle infezioni batteriche. La Terapia Fotodinamica ha le potenzialità per divenire una modalità alternativa di trattamento, infatti, numerose evidenze sperimentali suggeriscono che la fotosensibilizzazione indotta da porfirine e ftalocianine (Pcs) è in grado di promuovere una efficiente inattivazione di un ampio spettro di agenti di natura microbica tra cui batteri Gram (+) e Gram (-), lieviti e micoplasmi. Su queste basi abbiamo avviato uno studio sistematico sulla correlazione tra struttura chimica di Pcs e la loro attività fotocida di cellule microbiche. A tale fine sono state esaminate Pcs caratterizzate dalla presenza di un numero e una tipologia diversi di sostituenti periferici legati al macrociclo tetraazaisoindolico. Come substrato è stato utilizzato un ceppo selvaggio di *Staphylococcus aureus*, e alcune sue varianti antibiotico resistenti. I risultati sinora ottenuti mettono in evidenza che l'azione fototossica delle Pcs più efficienti si esplica non solo sul ceppo selvaggio di *S. aureus* ma anche sui ceppi antibiotico resistenti sebbene questi mostrino in generale una fotosensibilità leggermente inferiore. Inoltre è già possibile individuare alcune correlazioni struttura-attività. Tra queste, la maggiore efficienza fotoinattivatrice di Pcs monosostituite rispetto a quelle polisostituite, l'importanza della quaternarizzazione nei derivati amminici aromatici per ottenere una efficiente fotoinattivazione e la possibilità per le ammine alifatiche non cationiche di produrre un'ottima fotoinattivazione in seguito alla loro protonazione a pH fisiologico.

**RELAZIONE TRA STRUTTURA CHIMICA DI FTALOCIANINE
ED ATTIVITA' FOTOSENSIBILIZZATRICE SU FIBROBLASTI UMANI TRASFORMATI**

Elena Boer, Mara Ceccon, Giulio Jori

Dipartimento di Biologia, Università di Padova

Numerose ftalocianine sono state proposte come agenti fototerapeutici per il trattamento di malattie cutanee, ed è quindi importante definire la correlazione tra struttura chimica ed efficienza fotosensibilizzatrice.

A tal fine, abbiamo studiato l'attività di ftalocianine con diversa struttura chimica (a livello sia dello ione metallico coordinato con il macrociclo, sia dei sostituenti periferici) nel fotosensibilizzare la inattivazione di cellule HT1080 (fibroblasti umani trasformati).

In generale, le cellule venivano seminate ad una densità di 5.5×10^4 cell/ml; dopo circa 24 h venivano incubate per 1 h con ftalocianina 10 μ M e quindi esposte a luce di 600-700 nm ad una velocità di fluenza pari a 100 mW/cm².

I risultati sinora ottenuti permettono di ipotizzare alcune correlazioni tra struttura ed attività. Per quanto riguarda i sostituenti periferici, un effetto di esaltazione dell'attività fotodinamica è indotto dalla presenza di gruppi azotati (es. piridina, N,N-dimetilanilina) o solforati (es. tiofene), mentre un effetto inibitorio è causato dalla presenza di sostituenti come benzile, bromo o gruppo estereo. Si può anche osservare una influenza della posizione di un sostituito: ad es. un derivato m-metil-fenossi esplica una attività nettamente più elevata rispetto al corrispondente p-metil-fenossi. Una ottimizzazione dell'efficienza fotosensibilizzatrice è anche ottenuta sostituendo lo ione Zn(II) centrale con lo ione Si(IV). Quest'ultimo conferisce al macrociclo ftalocianino una elevata fotostabilità, minimizzando l'incidenza del fenomeno di fotobleaching.

**ACCUMULO DI FOTOSENSIBILIZZANTI IN CELLULE
CON RESISTENZA SPONTANEA A FARMACI DIVERSI (MDR-1):
STUDIO COMPARATIVO CON RHODAMINA 123, ROSA BENGALA ACETATO E PHOTOFRIN®**

G. Bottiroli¹, **A.C. Croce**¹, R. Supino², K.S. Lanza¹, S. Fiorani¹, D. Locatelli¹ e P. Baglioni³

¹*Centro Studio Istochimica, CNR, Dip. Biologia Animale, Università, Pavia;*

²*Istituto Nazionale Tumori, Milano;* ³*Dipartimento di Chimica, Università, Firenze*

La resistenza spontanea a farmaci non correlati tra loro chimicamente può comparire in cellule tumorali esposte per lungo tempo a chemioterapici. Essa è frequentemente dovuta alla sovra-espressione di proteine della membrana plasmatica, responsabili dell'estrusione di agenti citotossici dalle cellule (es. MDR-1) e può essere accompagnata da diverse modificazioni fenotipiche e funzionali delle cellule, similmente a quanto accade nei tumori in vivo. La possibile influenza dell'espressione spontanea della resistenza sulla capacità di accumulo intracellulare di fotosensibilizzanti è stata studiata su due linee cellulari tumorali, B16 e A2780, sensibili e selezionate per la resistenza alla Doxorubicina (MDR-1, verificata per via immunocitochimica). Sono stati considerati composti con diverse proprietà fisico-chimiche: la Rodamina 123 (Rh 123), cationica, substrato tipico della MDR-1; la Photofrin, fotosensibilizzante convenzionale, usato in clinica; il Rosa Bengala acetato (RBAc), che agisce come substrato fluorogenico. Per il RBAc, l'accumulo della forma attiva, Rosa Bengala (RB), dipende da 3 processi: ingresso nella cellula di RBAc, sua idrolisi a RB, efflusso del prodotto. I processi di accumulo e di rilascio di Rh123, Photofrin e RB sono stati studiati su singole cellule, per via microspettrofluorimetrica, anche in presenza di Verapamil (Vp), inibitore della MDR-1. I risultati ottenuti hanno indicato che: il ridotto accumulo della Rh123 e il suo ripristino con il Vp nelle cellule resistenti dipende principalmente dalla MDR-1, confermandone la funzionalità nei modelli cellulari considerati. Il ridotto accumulo della Photofrin nelle cellule resistenti dipende principalmente da un diverso turnover intracellulare tra specie porfiriniche a diverso grado di aggregazione, sebbene la MDR-1 sembri avere un effetto parziale sull'estrusione dei monomeri. Il maggiore accumulo di RB nelle cellule resistenti è il risultato di più processi: il maggiore ingresso di substrato – aumentata endocitosi- e l'aumentata attività esterasica controbilanciano la maggiore estrusione di RB, alla quale partecipa la MDR-1.

ROSA BENGALA ACETATO: FOTOSENSIBILIZZAZIONE E SITI DI DANNO SUBCELLULARE

A.C. Croce, M. Biggiogera, K. S. Lanza, S. Fiorani, S. Lussignoli, D. Locatelli e G. Bottiroli

Centro Studio Istochimica, CNR, Dip. Biologia Animale, Università, Pavia

Il Rosa Bengala acetato (RBAC), ottenuto per addizione del gruppo acetato al RB, agisce come substrato fluorogenico: il RBAC, idrofobico, non fluorescente, entra facilmente nelle cellule; qui viene idrolizzato dalle esterasi a Rosa Bengala (RB), le cui proprietà fotofisiche e fototossiche sono così ripristinate. In questo lavoro, i siti subcellulari di localizzazione e bersaglio del danno fototossico del RB sono stati studiati unitamente ai meccanismi di morte cellulare attivati a seguito del danno stesso. Il modello cellulare utilizzato, la linea C6 (glioma di ratto) aveva già dimostrato una buona capacità di accumulo di RB e di risposta fototossica a seguito ad incubazione con RBAC. La localizzazione intracellulare di RB è stata analizzata nel tempo mediante microscopia confocale. I quadri di fluorescenza relativi ai primi minuti di incubazione hanno mostrato la presenza di formazioni rotondeggianti, piccole e ben definite, nelle zone prevalentemente perinucleari del citoplasma, sostituite nel tempo da una fluorescenza più intensa e diffusa, sempre in zona perinucleare e con distribuzione polare. La dinamica della distribuzione della fluorescenza di RB e il confronto con la localizzazione di marcatori di componenti cellulari hanno indicato un coinvolgimento del traffico di membrana (endocitosi, pinocitosi) nell'internalizzazione di RBAC e il suo accumulo nei compartimenti endosomiale ed endoplasmatico. L'alta efficienza di produzione intracellulare di RB già a tempi relativamente brevi concorda con l'attività esterasica di questi siti. La localizzazione endoplasmatica di RB è indicata anche dall'analisi in microscopia elettronica. È stato infatti evidenziato un danno delle membrane in questo comparto a seguito di irraggiamento a 540 nm di cellule incubate in RBAC per tempi brevi. È stata inoltre trovata una condensazione periferica della cromatina, tipica di cellule in fase di attivazione dell'apoptosi, processo che è stato confermato anche da valutazioni su campioni paralleli mediante marcatura con Annessina V. I dati ottenuti indicano come il meccanismo di accumulo di RBAC favorisca un'elevata efficienza di localizzazione di RB nel comparto endoplasmatico, il cui danno fototossico, ottenuto già per condizioni blande di incubazione (tempi brevi, basse concentrazioni di RBAC), può innescare meccanismi di morte cellulare per via apoptotica.

CAPACITÀ EMOLITICA DI FOTOPRODOTTI DELLE FENOTIAZINE

L. Levorato¹, G. Miolo¹, E. Reddi², S. Caffieri¹

¹Dipartimento di Scienze Farmaceutiche e ²Dipartimento di Biologia
Università degli Studi di Padova

Le fenotiazine, farmaci antipsicotici largamente usati, hanno dimostrato di causare, oltre a numerosi effetti collaterali, anche effetti di fotosensibilizzazione in individui esposti a radiazioni solari. Sono stati perciò effettuati studi di fotostabilità in soluzioni acquoso – alcoliche in seguito ad irradiazione con luce UVA su tre fenotiazine: due derivati propilpiperazinicici (perfenazina e flufenazina) ed un derivato etilpiperidinico (tioridazina) in cui il diverso sostituente in posizione 2 influenza sia l'attività neurolettica che la fotostabilità e la fototossicità.

Le miscele irradiate dei tre farmaci sono state purificate mediante TLC con diversi sistemi di eluenti e sono state isolate e caratterizzate tramite spettrometria NMR e di massa le bande corrispondenti ai seguenti fotoprodotto:

fotoprodotto principale di perfenazina (Rf 0,44) dechlorurato in posizione 2 (isolato da irradiazione in soluzione acquoso-etanolica) e fotoprodotto metossilato in posizione 2 (isolato da irradiazione in soluzione acquoso-metanolica)

fotoprodotto di flufenazina con Rf 0,25 e con Rf 0,09 in corso di caratterizzazione.

fotoprodotto di tioridazina (Rf 0,27) N ossido e idrossilato in posizione 2.

fotoprodotto di tioridazina (Rf 0,09) solfossidato in posizione 2.

Dei prodotti di fotodegradazione dei farmaci si è valutata la capacità di indurre emolisi e fotoemolisi di cellule eritrocitarie di topo albino, processo indicativo di danni alla membrana. Sono stati condotti esperimenti preliminari con la miscela preirradiata dei farmaci (50 µM) addizionata ai globuli rossi e mantenuta a 37°C, effettuando prelievi a tempi stabiliti e valutando spettrofotometricamente a 650 nm la lisi. I risultati ottenuti dalle miscele preirradiate mostrano come la perfenazina a contatto con i globuli rossi dia luogo a totale emolisi quasi immediata, la flufenazina richieda 60 minuti di incubazione mentre la tioridazina non sia in grado di emolizzare significativamente. Successivamente si è voluta verificare la capacità emolitica dei singoli fotoprodotto isolati con e senza irradiazione. I fotoprodotto non irradiati non rispecchiano l'andamento osservato per le miscele: essi hanno scarsa capacità emolitica (al massimo 27%) e non sembrano quindi i responsabili della fototossicità della miscela. In seguito ad irradiazione tutti i fotoprodotto hanno portato al 100% di emolisi nel seguente ordine:

Flufenazina 0,25 > N-ossido tioridazina > flufenazina 0,09 ≥ Solfossido tioridazina ≥ Dechlorurato perfenazina. Per quanto riguarda la Tioridazina questi risultati sembrano confermare precedenti ipotesi di una maggiore fototossicità dell'idrossiderivato rispetto al solfossido che è anche un metabolita naturale. Si dimostra quindi il coinvolgimento del sostituente in posizione 2, importante per l'attività farmacologica, anche nel meccanismo di fototossicità.

Per approfondire l'interazione dei fotoprodotto con i substrati biologici, indagandone il meccanismo dell'attività fototossica, sono stati iniziati degli studi per determinare il fotodanno al DNA servendosi di un DNA plasmidico (pBR 322) e la formazione, in seguito all'interazione con la luce, di *cross-links* con le proteine di membrana utilizzando come modelli *ghosts* eritrocitari.

ATTIVITA' FOTOTOSSICA DI FENOTIAZINE SU CELLULE IN COLTURA

Roberta Zanoni¹, Lara Borsetto¹, Laura Levorato², Sergio Caffieri², Elena Reddi¹

¹*Dipartimento di Biologia e* ²*Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Padova*

Le fenotiazine, come altre categorie di farmaci, sembrano essere responsabili della comparsa di reazioni di fotosensibilizzazione cutanea in seguito all'esposizione luminosa. Su queste basi si è ritenuto opportuno effettuare uno studio per definire l'attività fotosensibilizzante di tre fenotiazine, flufenazina, perfenazina e tioridazina, correntemente utilizzate come antipsicotici. L'attività fotosensibilizzante dei tre farmaci è stata valutata determinando la mortalità di fibroblasti murini della linea 3T3 esposti alla luce UVA (365 nm, 6.3 J/cm²) dopo incubazione al buio, con concentrazioni di farmaco 5 o 10 µM, per diversi periodi di tempo (0.5-24 h). I risultati ottenuti dimostrano che la tioridazina, in presenza o in assenza di luce, provoca una diminuzione della sopravvivenza cellulare di circa il 60% e suggeriscono quindi che l'azione citotossica di questo farmaco, alle concentrazioni da noi utilizzate, è indipendente dall'esposizione luminosa. Al contrario, la flufenazina ha un'elevata attività fototossica e provoca una quasi completa mortalità cellulare. La perfenazina presenta una fototossicità modesta rilevabile solamente quando le cellule vengono esposte alla luce dopo 24 h di incubazione. La diversa attività fototossica dei farmaci è probabilmente dovuta alla diversa efficienza di generazione di specie reattive dell'ossigeno e non ad una diversa efficienza di accumulo nelle cellule.

Le fenotiazine esposte alla luce UVA formano una serie di fotoprodotti che assorbono nello stesso intervallo di lunghezze d'onda dei farmaci e potrebbero quindi contribuire all'effetto fototossico osservato. Per tale motivo, alcuni dei fotoprodotti, isolati dopo irradiazione di soluzioni dei farmaci, sono stati utilizzati in esperimenti di fotosensibilizzazione cellulare. I risultati ottenuti finora mostrano che alcuni dei fotoprodotti considerati possiedono una buona attività fotosensibilizzante e causano una diminuzione della sopravvivenza cellulare del 60-70% in condizioni sperimentali simili a quelle utilizzate per i farmaci.

IRRAGGIAMENTO, SIMULAZIONE SOLARE E SPETTROSCOPIA

Andrea D'Oriano

LOT Oriel Italia, Milano

LOT Oriel fornisce il supporto strumentale e tecnico in diversi campi della ricerca scientifica con sistemi di analisi e di metrologia. Nel campo della Fotobiologia siamo presenti con sofisticate sorgenti di luce per irraggiamento e per la simulazione solare e disponiamo di una gamma di sistemi CCD e CCD intensificati per spettroscopia ed immagine ad elevatissime sensibilità.

I simulatoli solari prodotti da Oriel Instruments sono fondamentali per ricreare in laboratorio lo spettro di irraggiamento solare per simulare in breve tempo ore ed ore di esposizione al sole. I fasci di irraggiamento ampi hanno caratteristiche di estrema uniformità. I simulatori solari Oriel sono ampiamente utilizzati in applicazioni di biologia, fotobiologia e fotodermatologia. Tipica applicazione è l'irraggiamento di colture batteriche o di cellule per verificare in tempi brevi l'effetto di esposizione a dosi intense di raggi UVA, UVB e UVC. La ricerca sull'influenza delle componenti UVA, UVB e UVC sulla insorgenza del cancro alla pelle ha compiuto progressi grazie anche ai sistemi di simulazione solare. La fototossicità di alcune sostanze viene inoltre studiata eccitando con sistemi di simulazione solare. In fotodermatologia l'utilizzo di tali sorgenti permette facilmente di valutare l'insorgenza di eritemi cutanei e di valutare in vivo i fattori di protezione solare di creme.

Oriel è nota in tutto l'ambiente scientifico non solo per i simulatori solari, ma anche per tutta la gamma di sorgenti di illuminazione e di eccitazione prodotte. Laser ad azoto, sorgenti al deuterio, al mercurio e allo xenon sono solo alcune possibili scelte per l'eccitazione di fenomeni di fluorescenza o fotoluminescenza. Spesso però si pone il problema di monitorare le sorgenti utilizzate per l'irraggiamento in modo da verificare l'effettiva quantità di radiazione emessa nelle varie zone dello spettro. Un metodo affidabile per tale monitoraggio è offerto da Andor Technology. Utilizzare un Array di fotodiodi o un dispositivo CCD opportunamente calibrati e dotati di sfera integratrice e spettrometro, consente misure spettroradiometriche precise che permettono di monitorare in tempo reale l'emissione delle sorgenti utilizzate.

Andor Technology è leader nella tecnologia dei CCD e ICCD di grado scientifico. I sistemi CCD Andor, già apprezzati per la facilità con cui riescono a risolvere le più difficili applicazioni, per la estrema compattezza e per il bassissimo rumore di fondo (raffreddamento ad acqua fino a -90°C) stanno raggiungendo nuove frontiere di sensibilità con l'introduzione dei nuovi EMCCD, dispositivi "photon counting" privi di intensificatore d'immagine che consentiranno sensibilità dall'UV al NIR fino ad ora impensate.

Fluorescenza e fotoluminescenza sono tra le analisi più diffuse in cui i nostri sistemi trovano largo impiego. Mediante opportuna configurazione ottica è possibile interfacciare i sistemi con i più comuni microscopi ottici per catturare immagini con bassissimi livelli di segnale.

Per applicazioni di spettroscopia risolta in tempo, la scelta ricadrà invece su sistemi CCD Intensificati. Andor si presenta come leader anche in questo campo e lo dimostra con il nuovo sistema Istar con tecnologia Intelligate. Nella testa compatta del sistema Istar, Andor include un generatore di ritardo gestibile interamente via software. In tal modo si minimizza ogni ritardo di propagazione e si aumenta la facilità di preparazione dell'apparato sperimentale. Con tali sistemi la progettazione di un banco di misura di tempi di vita di fluorescenza diventa accessibile a chiunque.

L'OPINIONE DEI GIOVANI SUI DANNI DA LUCE SOLARE E LETTINI UV

Giuseppe Monfrecola

Clinica Dermatologica, Università di Napoli "Federico II"

Studi clinici e sperimentali dimostrano che esposizioni croniche alla luce solare giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo di tumori cutanei epiteliali (soprattutto spinaliomi), mentre esposizioni intermittenti sembrerebbero implicate nell'insorgenza del melanoma. L'uso dei lettini solari rappresenta un controverso ma ulteriore fattore di rischio: 1) il loro impiego è sempre più diffuso fra i giovani e, paradossalmente, proprio fra quelli di fototipo basso; 2) alcune sorgenti di ultravioletto lungo (UVA), impiegate nei centri di abbronzatura artificiali, emettono anche una certa percentuale di UV corto (UVB); 3) dati sperimentali indicano che l'UVA, attraverso la produzione di specie di ossigeno reattive, può avere un effetto carcinogenico; 4) l'UVA ha effetto su cellule con funzione immunitaria.

Precedenti esperienze australiane e svedesi hanno evidenziato che campagne di educazione pubblica sono in grado di far aumentare in maniera capillare le conoscenze della popolazione su: tumori cutanei fotoindotti, luce solare, abbronzatura e lettini solari. Il frutto di tali programmi educativi sono stati rappresentati da modificazioni delle abitudini ed una maggiore attenzione ai rischi da radiazioni ultraviolette.

Scopo della nostra indagine è stato accertare il grado di conoscenza, da parte di giovani dell'Italia meridionale, circa le esposizioni ad UV naturali o artificiali. Abbiamo somministrato un questionario a 764 ragazzi di età compresa fra 16 e 22 anni. I risultati del nostro studio indicano che: a) la maggior parte dei giovani già posseggono nozioni adeguate circa i rischi dell'esposizione al sole od a sorgenti artificiali di UV, essi tuttavia non prendono in considerazione alcuna misura preventiva; b) probabilmente l'unica misura veramente efficace nell'indurre cambiamenti nelle abitudini consiste nel promuovere l'idea che "il corpo non abbronzato è più piacevole di quello abbronzato"; c) programmi finalizzati alla sicurezza dei cittadini dovrebbero essere supportati da leggi che prevedano il controllo rigoroso e regolare dei centri abbronzanti (qualificazione degli operatori, misurazione qualitativa e quantitativa dell'emissione degli apparecchi, etc.).

TERAPIA FOTODINAMICA CLINICA E SPERIMENTALE

D. Adami, M. Romanelli*, L. Vannucci, F. Mosca

*Divisione di Chirurgia Generale e Trapianti e *Clinica Dermatologica
Università degli Studi di Pisa*

Introduzione: la terapia fotodinamica (photodynamic therapy, PDT) si caratterizza per l'utilizzo di sostanze ad azione citolitica attivate da fonte luminosa di determinata lunghezza d'onda. L'impiego di sostanze fotosensibilizzanti, per via sistemica o topica, e la diversa capacità di fotoattivazione a seconda della lunghezza d'onda della fonte luminosa, ha consentito di ottenere una diversa capacità d'azione a seconda dell'obiettivo terapeutico e della sede del trattamento. Sulla base di queste potenzialità riferendoci a schemi di trattamento già pubblicati in letteratura, abbiamo condotto sia degli studi sperimentali per individuare l'efficacia della PDT in un modello animale di ulcera, sia una applicazione clinica per il trattamento di una forma di Malattia di Bowen del volto, localmente avanzata.

Materiali e metodi: Studio sperimentale: induzione di ulcera cutanea mediante iniezione intradermica di 0,4 ml di doxorubicina alla concentrazione di 10 mg/5 ml, in ratti di tipo Sprague-Dawley, in condizioni standard di stabulazione. Un gruppo A di 12 ulcere non è stato sottoposto ad alcun trattamento, un gruppo B di 12 animali è stato sottoposto a monotrattamento fotodinamico; un gruppo A1 di 7 ulcere non sottoposto a PDT è servito come controllo ad un gruppo B1 di 7 ulcere sottoposte a tre applicazioni di PDT. La PDT è stata eseguita mediante utilizzo di fotosensibilizzante topico (miscela di porfirine, HPD, all'1% in veicolo liposomiale, TOPOSAN® Seelab, Germany). La PDT viene applicata la prima volta dopo 10 gg. dall'iniezione del farmaco istolesivo (apice dell'estensione dell'ulcera) e ripetuta per tre volte nel gruppo B1 ogni 10 gg. L'irradiazione viene eseguita dopo 3 ore dall'applicazione del fotosensibilizzante con luce di lunghezza d'onda di 560 nm e dose totale di 45 J/cm². La misurazione dell'ulcera viene condotta sui due diametri principali. Applicazione clinica: abbiamo trattato una ampia lesione della guancia con diagnosi istologica di Malattia di Bowen. Si procede a PDT mediante HPD all'1% in veicolo liposomiale (TOPOSAN®) e successiva esposizione (dopo 4 ore) a luce della lunghezza d'onda di 630 nm e dose totale di 180 J/cm².

Risultati: Analizzando la velocità di riduzione dell'area delle ulcere dopo PDT, rispetto al gruppo di controllo si evidenzia maggiore velocità di riduzione delle ulcere in particolare in corrispondenza dei 5 giorni successivi all'applicazione della terapia fotodinamica (in media 2,35 mm²/die gruppo B vs 1,12 mm²/die gruppo A). L'applicazione ripetuta della PDT nel gruppo B1 ha portato ad una significativa riduzione del tempo globale di guarigione delle ulcere rispetto al gruppo di controllo A1 (in media 35,71 gg. vs 41,85 gg.). Questo dato è stato correlato ad azione della PDT di induzione di una reazione infiammatoria nella zona ulcerata (primum movens nel processo di guarigione), azione antimicrobica e limitazione dell'effetto citotossico agli strati più superficiali grazie alla scelta di una lunghezza d'onda minore e ridotta capacità di penetrazione. Il risultato della PDT applicata alla Malattia di Bowen ha portato a completa guarigione della lesione dopo 8 settimane residuando modesta retrazione cicatriziale della ferita ed esame istologico negativo per la patologia di base. In questo caso la scelta di una lunghezza d'onda e dose di irradiazione maggiori hanno consentito di ottenere una prevalenza dell'effetto citotossico anche a strati più profondi.

**RUOLO DELLA PROTEINA p21^{waf1/cip1} NELLA RISPOSTA CELLULARE
AL DANNO AL DNA INDOTTO DA RADIAZIONI UV-C**

Federica Riva¹, Lucia Anna Stivala², Bernard Ducommun³, Ennio Prosperini¹

¹*Centro di Studio per l'Istochimica del CNR, Pavia;*

²*Istituto di Patologia generale dell'Università di Pavia;*

³*L.B.C.M.C.P., Université Paul Sabatier, Toulouse, France*

La proteina p21^{waf1/cip1}, inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti (CDK), è il principale effettore dell'arresto (p53-dipendente) del ciclo cellulare in risposta a danno al DNA. p21 forma complessi con cicline e CDK e con l'antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA), un cofattore delle DNA polimerasi δ e ϵ , implicate sia nella replicazione che nella riparazione del DNA. *In vitro*, l'interazione di p21 con PCNA determina l'inibizione della sintesi replicativa, ma non di quella riparativa. Recenti dati dimostrano l'implicazione di p21 nella riparazione del DNA per escissione nucleotidica (NER), ma non è ancora chiaro il meccanismo d'azione della proteina in questo processo. Scopo del presente lavoro è di analizzare il ruolo di p21 nella risposta cellulare al danno al DNA indotto da radiazioni UV-C e, in particolare, l'influenza dell'interazione p21/PCNA nell'efficienza del NER. A tal fine, è stato utilizzato come modello cellulare la linea tumorale DLD1 di carcinoma colon-rettale umano, in cui il gene p53 è mutato, e p21 endogena è assente. In queste cellule è stato transfettato, in un sistema tetraciclina-inducibile, il gene p21^{waf1/cip1} nella forma wild-type, oppure nelle forme mutate nelle regioni N-terminale (p21^{CDK-}) o C-terminale (p21^{PCNA-}), nelle quali si trovano rispettivamente i domini di legame per CDK e PCNA. I risultati hanno mostrato che le cellule transfettate con p21^{wt} sono più resistenti all'irraggiamento con UV-C, rispetto alle cellule transfettate con p21 priva dei domini di legame per CDK o PCNA. L'influenza di p21 nel reclutamento di PCNA ai siti di riparazione del DNA è stata analizzata sia mediante citometria a flusso sia mediante western blot. A tempi brevi dall'irraggiamento (30' e 4h), un aumento dei livelli di PCNA associata alla cromatina è stato osservato nelle cellule p21^{wt} e p21^{CDK-}, ma non nelle cellule con p21^{PCNA-}, nelle quali la cinetica di reclutamento della proteina sembra essere ritardata. Questi risultati evidenziano il ruolo di p21 nella risposta cellulare al danno da UV e ne suggeriscono un'influenza sull'associazione di PCNA al DNA durante la sintesi riparativa nel NER.

Terapia fotodinamica e sue applicazioni cliniche in dermatologia

R. Rossi, L. Mavilia, F. Prignano, P. Campolmi, P. Cappugi

*Dipartimento di Scienze Dermatologiche, U.O. di Fisioterapia Dermatologica
Università degli Studi di Firenze*

La terapia fotodinamica (TFD) utilizza un fotosensibilizzante, una sorgente luminosa e ossigeno allo scopo di indurre l'apoptosi selettiva delle cellule tumorali. Questo effetto si realizza principalmente attraverso la liberazione di radicali liberi dell'ossigeno, indotta dall'esposizione del fotosensibilizzante, o di un suo precursore, ad una determinata lunghezza d'onda. Negli ultimi anni, sebbene la tecnica sia ancora largamente sperimentale, molti sono stati gli studi individuali, effettuati mediante applicazione topica del fotosensibilizzante; essi hanno riportato confortanti e promettenti risultati nei diversi protocolli proposti. La alta percentuale di guarigione riportata in letteratura e nella nostra sperimentazione mostrano come la terapia fotodinamica sembri essere, in dermatologia, una modalità terapeutica sicura e molto efficace nella terapia dei tumori primitivi e secondari non-melanoma ed in lesioni precancerose (carcinomi a cellule basali e squamose, metastasi cutanee di tumori mammari e polmonari, linfomi cutanei a cellule B e T, malattia di Bowen, sindrome del nevo basocellulare, cheratosi solari, cheiliti attiniche, leucoplachie ed eritroplachie, sarcoma di kaposi e cheratoacantomi) ma anche in selezionati disordini di natura benigna (psoriasi, verruche volgari, condilomi, acne volgare, sclerodermia localizzata, alopecia areata, irsutismo), offrendo importanti vantaggi rispetto alle terapie convenzionali e ottimi risultati estetici. I meccanismi mediante i quali tale terapia agirebbe necessitano ancora di ulteriori approfondimenti ed ulteriori ricerche sui cambiamenti nella concentrazione del fotosensibilizzante, sulla tensione d'ossigeno e sul flusso sanguigno che avvengono durante il trattamento, dovranno essere condotte per meglio definire ed ottimizzare i parametri terapeutici. In conclusione, quanto esposto evidenzia come la TFD sia una promettente terapia con un grande potenziale di sviluppo. Nuovi ambiti applicativi sono in via di studio così come nuovi fotosensibilizzanti e sorgenti luminose.

**SPETTROSCOPIA DI RIFLETTANZA RISOLTA NEL TEMPO
PER LA CARATTERIZZAZIONE DEI TESSUTI BIOLOGICI *IN VIVO***

P. Taroni, A. Pifferi, A. Torricelli e R. Cubeddu

INFN-Dipartimento di Fisica e CEQSE-CNR, Politecnico di Milano

La spettroscopia di riflettanza risolta nel tempo consente la caratterizzazione ottica completa (coefficienti di assorbimento e scattering) di mezzi altamente diffusivi, come i tessuti biologici, in modo assolutamente non invasivo. Un sistema di misura completamente automatizzato, basato su sorgenti laser in mode-locking e su elettronica per il conteggio dei singoli fotoni correlati nel tempo è stato utilizzato per caratterizzare *in vivo*, per la prima volta, vari tipi di tessuto su un ampio intervallo spettrale (600-1000 nm). I valori dei coefficienti di assorbimento e scattering ridotto sono ottenuti dalle curve di riflettanza risolta nel tempo, interpretate con l'approssimazione della diffusione alla teoria del trasporto radiativo.

Gli spettri di assorbimento sono poi interpolati con gli spettri dei principali costituenti dei tessuti che assorbono in questa regione spettrale (emoglobina e ossiemoglobina, acqua e lipidi). Questo consente di valutarne le concentrazioni relative. Gli spettri di scattering sono invece interpretati con un'approssimazione empirica della teoria di Mie e forniscono informazioni sulla struttura microscopica dei tessuti (raggio medio e concentrazione dei centri di scattering). Inoltre, misure eseguite a differenti distanze tra punto di iniezione della luce e punto di rivelazione evidenziano la natura eterogenea dei tessuti e consentono di ottenere informazioni utili per caratterizzare i diversi strati (ad esempio, lo strato superficiale lipidico rispetto al tessuto muscolare sottostante nel braccio).

TRANSILLUMINAZIONE DI DISOMOGENEITA' SFERICHE IN SOLUZIONI DI INTRALIPID

A. Colasanti^{1,3}, A. Kisslinger⁴, **R. Liuzzi**^{2,3}, M. Quarto^{1,3}, P. Riccio^{1,3}, G. Roberti^{2,3}

Università degli Studi di Napoli "Federico II"

¹*Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano"*

²*Dipartimento di Scienze Fisiche*

³*Istituto Nazionale di Fisica della Materia*

⁴*Centro endocrinologia ed Oncologia Sperimentale - CNR*

Sono state effettuate misure di transilluminazione di disomogeneità sferiche immerse in soluzioni di Intralipid. La sorgente di luce è un diodo laser Hamamatsu PLP02, che emette impulsi di luce di durata 40 ps alla lunghezza d'onda di 820 nm con frequenza di ripetizione da 0 a 2 MHz. Il campione è costituito da una sferetta di vetro contenente una miscela di Intralipid e/o inchiostro di china, immersa in una soluzione costituita dalle stesse componenti. Il sistema di rivelazione usa un fotorivelatore veloce Hamamatsu (G4176, t_r , $t_f = 30$ ps) il cui segnale viene registrato da un analizzatore digitale di segnali (Tektronix CSA803A, 50 GHz banda passante) e trasferito attraverso un'interfaccia GPIB ad un PC. La scansione del campione è ottenuta attraverso movimentatori micrometrici collegati con interfaccia GPIB allo stesso computer. Tutte le operazioni di inizializzazione e di setting dell'apparato sperimentale, la scansione, l'acquisizione, il trasferimento, la visualizzazione e l'analisi dei dati vengono effettuate attraverso un opportuno programma in ambiente LabView. Il supporto modellistico di queste misure è costituito da un programma di simulazione Monte Carlo del trasporto dei fotoni nei mezzi fortemente diffondenti, sviluppato e adattato precedentemente al calcolatore Parallelo T3E del Cineca (Colasanti et al., *Comp. Phys. Com.*, 132, 84-93). L'affidabilità dell'esperimento (compresa la corretta determinazione dei parametri ottici del campione e delle prestazioni del programma di simulazione) è stata controllata effettuando misure di transilluminazione in continua dei campioni in esame e confrontando i profili di trasmittanza osservati con quelli ricavati dalle simulazioni. Successivamente sono state effettuate misure in regime impulsato e, punto per punto del campione, sono stati analizzati i profili temporali degli impulsi trasmessi dal campione, allo scopo di individuare quali dei loro parametri sia il più adatto per un imaging della disomogeneità.

**DIAGNOSI IN TEMPO REALE BASATA SULL'AUTOFLUORESCENZA
PER LA RESEZIONE SELETTIVA DI TUMORI IN NEUROCHIRURGIA**

G. Bottioli¹, A.C. Croce¹, K.S. Lanza¹, **S. Fiorani**¹, D. Locatelli¹,
R. Nano¹, E. Giombelli², F. Tancioni², E. Benericetti²

¹*Centro Studio Istochimica, CNR - Università, Pavia*

²*Div. Neurochirurgia, Ospedale Maggiore, Parma*

I tessuti biologici eccitati ad opportune lunghezze d'onda danno luogo ad emissione di fluorescenza, nella regione UV-visibile, per la presenza di cromofori endogeni. Questi sono strettamente coinvolti sia nell'organizzazione istologica (proteine costitutive) che nei processi metabolici dei tessuti stessi (coenzimi, lipofuscine, porfirine). L'insorgenza di processi patologici, es. neoplasie, può alterare le caratteristiche strutturali e metaboliche dei tessuti, con conseguenti variazioni dei parametri di autofluorescenza, utilizzabili per scopo diagnostico. In neurochirurgia l'esatta discriminazione dei margini delle lesioni tumorali è importante per evitare sia un'eccessiva resezione del tessuto normale, con conseguenti danni funzionali, sia una incompleta rimozione della massa tumorale, causa di recidive precoci. Nei glioblastomi l'analisi spettrofluorimetrica, effettuata via fibra ottica, ha già mostrato la possibilità di discriminare la lesione tumorale rispetto a quella del tessuto sano vicino. Generalmente l'emissione del tumore ha minore ampiezza e uno spostamento del picco verso il rosso rispetto al tessuto normale. Sulla base di questi risultati, lo studio è stato esteso ai tumori delle guaine dei nervi cranici, i neurinomi. Questi interessano con maggiore frequenza i nervi vestibolare e acustico, con insorgenza preferenziale nel punto dove le cellule gliali sono sostituite dalle cellule di Schwann e dai fibroblasti. Data la localizzazione anatomica, la crescita del neurinoma può interessare anche i nervi facciale e trigemino. La discriminazione dei nervi interessati per la preservazione della loro integrità e funzionalità è ovviamente di primaria importanza durante la dissezione della massa tumorale. Fino ad ora ciò è possibile solo per il nervo facciale, mediante il suo monitoraggio con l'impiego di stimolatore. La potenzialità dell'autofluorescenza è stata considerata per la discriminazione di nervi cranici durante la rimozione di neurinomi. Risultati preliminari ottenuti su pazienti hanno indicato notevoli differenze di emissione tra tessuto tumorale e nervi, premessa promettente per lo sviluppo di una metodica di diagnosi basata sull'autofluorescenza per una migliore efficacia dell'intervento chirurgico.

Lavoro finanziato da: "CNR – Target Project Biotechnology"

FOTOCHIMICA DI FARMACI FOTOSENSIBILIZZANTI

Sandra Monti

Istituto di Fotochimica e Radiazioni d'Alta Energia del CNR, Bologna

Il controllo della fototossicità dei farmaci in situazioni pratiche e lo sviluppo di adeguate strategie protettive richiedono come prerequisiti i) la comprensione dei fattori strutturali ed ambientali che determinano la fotoreattività delle varie classi di farmaci fotosensibilizzanti e ii) l'identificazione delle specie reattive fotoprodotte.

In questa presentazione verranno discussi i meccanismi di fotodegradazione di due classi di farmaci fotosensibilizzanti: gli acidi arilpropionici (FANS), ed i fluorochinoloni, farmaci antibatterici, dei quali si è osservata anche una azione fototumorigenica. Verrà discusso il processo di fotodecarbossilazione in acidi propionici contenenti cromofori di tipo benzofenonico, in acqua ed in ciclodestrine, cavità idrofobiche modello di ambienti biologicamente significativi. Mediante spettroscopia di assorbimento al picosecondo si è accertato che il rilascio del frammento di CO₂ è innescato da un trasferimento di elettrone intramolecolare nello stato di tripletto. Si sono osservati ulteriori intermedi nel dominio del nanosecondo e del microsecondo con spettro dipendente dal pH. Si è proposta una razionalizzazione dell'intero processo in alcuni farmaci strutturalmente significativi. La fotodefluorurazione di alcuni acidi 6-fluoro-7-piperazino-4-chinolone-3-carbossilici in ambiente acquoso verrà discussa in relazione alla struttura molecolare ed alla presenza di sali di grande importanza biologica come i fosfati. Con il derivato 6,8-difluorochinolone (lomefloxacin) la rottura eterolitica del legame CF avviene nello stato di singoletto eccitato. Con il 6-monofluorochinolone (norfloxacin) e con il corrispondente 1,8-naftiridinone (enoxacin) il singoletto non è reattivo e la rottura del legame CF avviene nel tripletto, con un processo mediato dal solvente e che passa, probabilmente, attraverso un anione cicloesadienile. In presenza di sali come il solfito o il fosfato un nuovo meccanismo di defluorurazione diviene operativo, iniziato da un trasferimento di elettrone dal sale al tripletto del chinolone, con formazione dell'anione di quest'ultimo, che defluorura. Verrà discussa la rilevanza degli intermedi osservati rispetto ai fenomeni di fotosensibilizzazione.

ASPECTS OF THE PHOTOBIOLOGICAL PROPERTIES OF SOME TRIMETHYLPSORALEN DERIVATIVES

C. Marzano, F. Bordin, F. Baccichetti, F. Carlassare, G. Pastorini and P. Rodighiero

*Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Padova
Centro Studio CNR sulla Chimica del Farmaco e dei Prodotti Biologicamente Attivi*

In the last years we studied the ability of numerous furocoumarin analogues to induce DNA-protein cross-links (DPC) and tried to identify the biological consequences of these DNA lesions [1]. With an angular furoquinolinone (1,4,6,8-tetramethyl-2H-furo [2,3-h] quinolin-2-one, FQ), incapable of forming the classic furocoumarin bifunctional damage [2] (inter-strands cross-links, ISC), we observed a marked DNA fragmentation and strong clastogenic effects [3], which have been attributed to DPC, efficiently induced by this sensitizer [4]. Considering that compounds used in human therapy (e.g., 8-MOP) induce both ISC and DPC, we began to evaluate the possible interaction between these two bifunctional lesions in producing various biological consequences. For this purpose, we chose three linear furocoumarins, namely 4,5',8-trimethylpsoralen (4,5',8-TMP), 4,4',8-trimethylpsoralen (4,4',8-TMP) and 1'-thio-4,4',8-trimethylpsoralen (4,4',8-thioTMP) which are all powerful photosensitizers, like FQ. 4,5',8-TMP is a well-known and effective derivative, used both in human therapy and in biomedical research, while 4,4',8-TMP and 4,4',8-thio-TMP are two isoster, the latter recently prepared [5]. We studied some aspects of their photobiological behavior, such as the antiproliferative and clastogenic activities, comparing the results to those already obtained with the angular furoquinolinone FQ.

- [1] F. Bordin et al., *Photochem. Photobiol.* 58, 133-136, 1993
- [2] F. Bordin et al. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* 34, 159-168, 1996
- [3] C. Marzano et al., *Photochem. Photobiol.* 71, 263-272, 2000
- [4] F. Bordin et al., *Photochem. Photobiol.* 71, 254-252, 2000
- [5] O. Gia et al., *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* 56, 132-138, 2000

**FOTOSTIMOLAZIONE DI IPERICINA A BASSE DOSI DI RADIAZIONE LASER
(ARGON DYE LASER, 599NM): EFFETTI DIFFERENZIALI SULL'ESPRESSIONE GENICA E CICLO
CELLULARE IN CELLULE DA CARCINOMA ENDOMETRIALE**

L. Varriale, E. Coppola, M. Quarto, S. Salzano e G. Palumbo

*Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare & CEOS/CNR
Università di Napoli Federico II*

Cellule linfocitarie sensibili (U937) caricate con ipericina ed esposte a dosi sub-letali di radiazioni monocromatica nel visibile (599 nm), acquisiscono apprezzabile resistenza a fototrattamenti normalmente in grado di produrre danni irreversibili. Quest'osservazione è ora estesa e confermata in cellule neoplastiche endometriali (HEC1B) che, viceversa, sono poco responsive agli stimoli lesivi e naturalmente resistenti. Le cellule "caricate" sono state esposte a fluenze di 2-10 (singole) o 2+5 (separate) J/cm². In ogni condizione, a tempi e con modalità definite, sono state valutate le alterazioni nell'espressione delle proteine PARP, Bcl-XL, Bcl-2, Bax (apoptosi), p53 (apoptosi e ciclo), p21, Ciclina B, cdc2 (ciclo cellulare) e HSP 70 (stress). In alcune delle condizioni d'irraggiamento, inoltre, abbiamo valutato citofluorimetricamente la relativa distribuzione della popolazione cellulare. Singoli irraggiamenti producono effetti dose-dipendenti sia nella degradazione di PARP che nell'espressione della ciclina B, HSP70, di p53 e p21 (queste ultime con aumenti fino a ~60%). A giudicare dallo stato di integrità di PARP, singoli irraggiamenti al di sotto di 5 J/cm² (soglia) inducono apoptosi in maniera dose-dipendente. Viceversa, se le cellule sono sottoposte a pre-irraggiamento alla dose di energia più bassa (2J/cm²) seguita da dose di 5J/cm² o più, i segni di sofferenza cellulare, morfologici e molecolari, tendono a svanire; questa attenuazione diviene più significativa se l'intervallo temporale fra i due irraggiamenti viene esteso da 3 a 20 ore. Se l'intervallo fra gli irraggiamento è di 3 ore, si osserva una generale tendenza della popolazione cellulare ad accumularsi nella fase S, forse preparatoria al successivo blocco in G2M. Se l'intervallo è di 20 ore, si osserva un blocco in G2/M (compatibile con un danno a livello del DNA mediato dall'ipericina accumulata nel nucleo), l'assenza di frammentazione di PARP, l'aumento di HSP 70 e una sensibile diminuzione di p53 e p21. Ciò è compatibile con una situazione in cui le cellule bloccate in G2/M abbiano attivato l'espressione di p21 e p53 dopo il primo irraggiamento e che quindi si trovino *più tardi* (dopo 20 ore) in una fase di riparazione attiva. Così non solo non è richiesta ulteriore produzione di p21 (e p53) ma la comparsa di fenomeni di resistenza non è sorprendente.

Lavoro eseguito con il contributo Prog. final. Biotecnol. CNR/MURST e ASI (Agenzia Spaziale Italiana)

**CARATTERIZZAZIONE MICROSPETTROFLUORIMETRICA DI PELLICOLE PITTORICHE:
STUDIO DI LEGANTI E VERNICI**

B. Masala, A. Gallone, G. Bottiroli

Centro Studio Istochimica CNR, Pavia - Dipartimento di Fisica, Politecnico, Milano

La pellicola pittorica è costituita da tre strati fondamentali: i) strato interno (preparazione) con funzione di rendere il supporto – tela o muro – idoneo alla stesura dello strato di colore; ii) strato intermedio (colore) responsabile dell'immagine, costituito da pigmento disperso in un mezzo con funzione di legante; iii) strato esterno (vernice finale) con funzione estetica (uniformare la superficie, creare i giochi di luce) e protettiva per leganti idrosolubili e pigmenti chimicamente instabili.

I leganti e le vernici usati dagli artisti sono sostanze organiche naturali di origine sia vegetale, sia animale. Tra i leganti di più largo impiego si ricordano le colle animali, l'uovo e gli oli siccativi poiché possiedono un alto potere coesivo; tra le vernici particolarmente importanti sono le resine naturali.

Leganti e vernici presentano di regola gruppi fluorofori e possono pertanto essere caratterizzati mediante studio delle loro proprietà di fluorescenza. E' stata quindi sviluppata una metodologia basata sull'impiego di tecniche micro- e microspetro-fluorimetriche per l'identificazione di leganti e vernici e per la definizione della distribuzione spaziale dei medesimi all'interno della pellicola pittorica.

Le proprietà di fluorescenza di leganti (olio di lino, uovo, gomma arabica e colla di coniglio) e vernici finali (balsami, colofonia, sandracca, cere vergini) sono state determinate su modelli opportunamente allestiti in laboratorio o su campioni di opere realizzate con tecniche pittoriche note. Le indicazioni così ottenute sono quindi state impiegate per la caratterizzazione della natura della pellicola pittorica di opere di particolare interesse, sia al fine di ottimizzare le procedure per interventi di tipo conservativo che per l'inquadramento storico-artistico dell'opera stessa.

Vengono presentati risultati relativi agli spettri di emissione nel visibile, per eccitazione UV, di modelli standard e il loro impiego nella caratterizzazione di alcune opere d'arte considerate, tra cui l'Ultima Cena di Leonardo, la Pala di San Bernardino di Piero della Francesca, gli Affreschi della Basilica Superiore di Assisi.

Ricerca finanziata dal P.F. CNR "Beni Culturali"

**BOROFTALOCIANINE: POTENZIALI AGENTI FOTO/RADIOSENSIBILIZZANTI
PER L'APPLICAZIONE COMBINATA DI BNCT E PDT NELLA TERAPIA DI TUMORI**

Michela Magaraggia¹, Clara Fabris¹, Francesca Giuntini², Gabrio Roncucci², Giulio Jori¹

¹Dipartimento di Biologia, Università di Padova,²Molteni Farmaceutici, Firenze

L'approvazione della terapia fotodinamica (PDT) per il trattamento di diversi tipi di tumori solidi ha promosso diverse linee di ricerca finalizzate al miglioramento della sua efficacia e all'allargamento del campo di applicazione. In particolare, sono stati proposti alcuni approcci per combinare la PDT con altre modalità terapeutiche, come per es. la BNCT (boron neutron capture therapy). In questo modo porfirine e ftalocianine (che sono i fotosensibilizzatori utilizzati in PDT) possono agire come veicoli per l'accumulo di boro all'interno di cellule tumorali.

Per questi studi è stata utilizzata una ftalocianina boronata (B-Pc) preparata per sintesi chimica e ne è stata studiata l'attività fotosensibilizzatrice paragonandola a quella della ftalocianina non boronata. E' stata determinata la resa quantica di ossigeno di singoletto, il principale intermedio fotoreattivo in questi processi e la k di velocità di fotoossidazione di substrati modello, come il NATA (N-acetil-L-triptofanammide) e il DMA (9,10-dimetil - antracene), la cui modifica fotoossidativa può essere seguita come diminuzione nell'emissione di fluorescenza. Inoltre è stata determinata la fotostabilità della B-Pc in dimetilformammide per valutare l'importanza del processo di fotobleaching. Su queste basi abbiamo testato la B-Pc su sistemi cellulari, in particolare i fibroblasti umani trasformati HT-1080. Abbiamo valutato l'affinità della B-Pc per le cellule e la fotoinattivazione dopo 10 minuti di irradiazione.

I risultati ottenuti dimostrano che non c'è una sostanziale differenza nella resa quantica di ossigeno di singoletto tra B-Pc e la sua corrispondente non boronata. La k_v di fotoossidazione di substrati modello è dell'ordine di $10^4 s^{-1}$ in accordo con dati di letteratura per efficienti fotosensibilizzatori. Sia la B-Pc che il suo analogo non boronato subiscono una graduale fotodegradazione in seguito ad irradiazione con luce rossa: il composto boronato mostra un modesto incremento nella velocità del fotoprocesso. Infine l'accumulo della B-Pc e della Pc nei modelli cellulari aumenta all'aumentare della concentrazione del fotosensibilizzatore nel mezzo di incubazione senza raggiungere, apparentemente, valori di plateau per concentrazioni pari a 5 μM . Inoltre la B-Pc fotoinattiva i fibroblasti molto velocemente, dopo 10 minuti di irradiazione la percentuale di sopravvivenza cellulare cala dell'80%.

Appare quindi evidente che la B-Pc esibisce una abilità fotosensibilizzatrice sufficientemente elevata, in grado di indurre sia la modificazione di biomolecole che l'inattivazione di cellule umane. Questi risultati avvalorano chiaramente l'ipotesi che questi composti possano agire come agenti sia radio che foto-sensibilizzanti.

PERTURBATION OF THE MITOCHONDRIAL MEMBRANE STRUCTURE BY DISACCHARIDES

Claudia Beghetto¹, Monica Camerin¹, Silvano Gobbo¹, Giuseppe Tognon¹,
Christian Salet², Giuliana Moreno,² Fernanda Ricchelli¹

¹*Consiglio Nazionale delle Ricerche, Centro Metalloproteine, Dipartimento di Biologia,
Viale G. Colombo 3, 35121 Padova, Italy;*

²*Laboratoires de Biophysique et de Photobiologie, INSERM U 201 et CNRS UMR 8646,
Muséum National d'Histoire Naturelle, 43 Rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France*

The influence of the medium composition on the dynamic properties of mitochondrial membranes upon depolarization was studied by following the fluorescence anisotropy changes of mitochondria-bound 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) and hematoporphyrin (HP) as reporters, respectively, of lipid and protein regions. Upon collapse of the potential the membrane fluidity increased in NaCl-, KCl- and monosaccharide-based media and decreased in disaccharides. Infrared spectroscopy experiments suggested that disaccharides likely change water's structure and association on the membrane surface. These modifications mostly concerned protein regions and were particularly relevant in depolarized membranes. Electron microscopy experiments revealed that upon deenergization mitochondria preserved the "orthodox" conformation in saline and monosaccharide-based media whereas an ultrastructural transition to the "condensed" conformation occurred in disaccharides. Our results indicate that disaccharides induce membrane perturbation which may interfere in the study of structure-function correlation in biological membranes.

In conclusion, it must be underlined the importance of the composition of the suspension media in the characterization of membranes *in vitro*.

**THE MICROENVIRONMENT OF THE SENSITIZER IN MITOCHONDRIAL MEMBRANES
MODULATES THE PHOTODAMAGE INDUCED BY SINGLET OXYGEN:
A STUDY ON THE PERMEABILITY TRANSITION**

Monica Camerin¹, Karine Poussin², Silvano Gobbo¹,
Giuliana Moreno², Fernanda Ricchelli¹ and Christian Salet²

¹*Consiglio Nazionale delle Ricerche, Centro Metalloproteine, Dipartimento di Biologia,
Università di Padova, Viale G. Colombo 3, 35121 Padova Italy;*

²*Laboratoires de Biophysique et de Photobiologie, INSERM U 201 et CNRS UMR 8646,
Muséum National d'Histoire Naturelle, 43 rue Cuvier, 75231 Paris Cédex 05 (France)*

We have examined whether the effects of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) produced by photodynamic action on the mitochondrial permeability transition (PT) can be modulated by the localization of photosensitizers in irradiated mitochondria. We have previously shown that oxidation due to $^1\text{O}_2$ photogenerated in hematoporphyrin (HP)-loaded mitochondria can prevent opening of the PT pores, likely after degradation of some critical histidines (Salet *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.* 272, 21938-21943). In sharp contrast with HP, a structurally different sensitizer which mainly produces $^1\text{O}_2$ upon irradiation, i.e. 4,5',8-trimethylpsoralen (TMP), triggers *per se* pore opening. PT induction likely occurs *via* oxidation of critical thiol groups and formation of disulfide bridges, a reaction which increases the probability of the PT process. Fluorescence studies show that both HP and TMP bind to protein sites of the inner mitochondrial membrane, which, however, are not coincident.

Taken together, these findings suggest that $^1\text{O}_2$ can activate or inactivate a cellular function such as mitochondrial PT depending on the site where it is produced in the mitochondrial membrane.

**EQUILIBRI REDOX NEL METABOLISMO CELLULARE:
STUDIO MEDIANTE MICROSPETTROSCOPIA DI AUTOFLUORESCENZA**

K.S. Lanza, S. Fiorani, D. Locatelli, A.C. Croce, G. Bottioli

Centro Studio Istochimica, CNR – Dip. Biologia Animale, Università; Pavia.

L'emissione in autofluorescenza di singole cellule in coltura è attribuibile a fluorofori coinvolti nelle attività metaboliche cellulari, principalmente coenzimi nicotinici e flavinici, oltre che, in misura minore, alle proteine strutturali e ai lipopigmenti. La stretta dipendenza delle caratteristiche fotofisiche di cellule e tessuti dalle condizioni biologiche e metaboliche degli stessi fa dell'analisi in autofluorescenza un valido approccio alla caratterizzazione qualitativa e quantitativa del materiale biologico stesso. In particolare, la caratterizzazione fluorimetrica dello stato redox dei coenzimi nicotinici e flavinici fornisce informazioni sulle condizioni metaboliche cellulari sia in condizioni stazionarie che in seguito a perturbazioni del metabolismo energetico. Questo è caratterizzato dal complesso intrecciarsi di reazioni chimiche e pathways metabolici finemente regolati e in equilibrio dinamico tra loro. Pertanto le reazioni che una cellula è in grado di mettere in atto per far fronte a situazioni di stress ambientale implicano un coinvolgimento metabolico a più livelli con l'alterazione contemporanea di differenti equilibri biochimici e l'attivazione di vie metaboliche alternative.

L'analisi fluorimetrica è stata applicata allo studio delle strategie metaboliche messe in atto dalle 3T3 per far fronte a differenti situazioni sperimentali. In particolare gli effetti indotti dall'ipossia o dalla somministrazione dei veleni del catabolismo del glucosio rotenone e 2-D-deossiglucosio sono stati posti a confronto con quelli indotti dagli stessi in combinazione con il rallentamento del metabolismo energetico cellulare conseguente all'esposizione ad un mezzo a basso contenuto di glucosio. Le alterazioni riscontrate nelle caratteristiche di autofluorescenza cellulare in accordo con i target biochimici dei trattamenti applicati sono risultate in massima parte attribuibili a variazioni nei contributi relativi e nello stato di ossidoriduzione dei coenzimi nicotinici e flavinici. La presenza di situazioni metaboliche differenti (metabolismo più o meno attivo, in relazione alla disponibilità di substrati energetici) ha messo inoltre in evidenza che l'adattamento a situazioni sperimentalmente alterate avviene attraverso la ricerca di un nuovo stato di equilibrio metabolico in dipendenza dallo stato stazionario preesistente.

Lavoro finanziato da "CNR-Target Project Biotechnology"

**TECNICHE MICROSPETTROFLUORIMETRICHE NELLO STUDIO DI EVENTI PRECOCI DELL' APOPTOSI -
TRASFERIMENTO DI ENERGIA DI RISONANZA IN FLUORESCENZA E AUTOFLUORESCENZA**

G. Bottiroli, **A.C. Croce**, S. Fiorani, K.S. Lanza, S. Lussignoli,
B. Masala, C. Pellicciari, M.G. Bottone, S. Barni

Centro Studio Istochimica CNR, Dipartimento di Biologia Animale, Università, Pavia

Tecniche di analisi microspettrofluorimetriche di trasferimento di energia di fluorescenza (FRET) e di autofluorescenza, sono state usate per lo studio in cellula di alterazioni morfofunzionali nelle fasi precoci di apoptosi. Timociti di ratto sono stati usati come modello per l'apoptosi, spontanea o indotta per trattamento con etoposide. 1) Il FRET è basato sull'uso di coppie di coloranti donatore-accettore, con opportune caratteristiche spettrali e specificità di legame per le biomolecole studiate. L'efficienza di FRET dipende dalla distanza e dal reciproco orientamento dei due coloranti e può fornire informazioni sull'organizzazione supramolecolare di strutture cellulari. I timociti sono stati colorati in modo specifico per il DNA, Hoechst 33258 - non intercalante, A/T specifico, Ioduro di Propidio -intercalante, base-aspecifico. L'induzione dell'apoptosi risulta in un aumento di efficienza relativa di FRET, correlabile a modificazioni conformazionali della cromatina, prima dell'espressione delle conseguenti tipiche alterazioni antigeniche e morfologiche cellulari. La trasposizione a flusso della metodica consente l'individuazione rapida di eventi apoptotici in popolazioni cellulari eterogenee. 2) La fluorescenza naturale in singole cellule in condizioni vitali è dovuta alla presenza di coenzimi (NAD(P)H, flavine) strettamente coinvolti nel metabolismo energetico. Le loro caratteristiche di emissione dipendono dallo stato ossidato-ridotto, libero-legato, in cui si trovano, in relazione alle condizioni biologico-funzionali delle cellule. Il contributo dei singoli fluorofori all'emissione totale può essere definito con l'analisi di deconvoluzione spettrale dell'emissione di autofluorescenza, in modo assimilabile ad un'analisi biochimica *in vivo*. Durante l'induzione dell'apoptosi le variazioni di contributo dei diversi fluorofori all'autofluorescenza cellulare (alterazioni dello stato ridotto-ossidato e libero-legato del NAD(P)H, incremento dello stato ossidato delle flavine), precedono le modificazioni morfologiche e consentono lo studio delle variazioni di impegno energetico delle cellule nell'attivazione dei processi apoptotici.

Lavoro finanziato da: "CNR – Target Project Biotecnology".

**SINTESI ED ATTIVITA' FOTODINAMICA DI DERIVATI ARILOSSI-SOSTITUITI
DI ZINCO FTALOCIANINA E DEGLI ANALOGHI SOLFORATI**

F. Giuntini¹, D. Nistri², G. Chiti², M.P. De Filippis², L. Fantetti² e G. Roncucci²

¹*Dipartimento di Fotobiologia, Università di Padova, via Trieste 75, 35121, Padova*

²*Molteni Farmaceutici, S.S.67, loc. Granatieri, 50018, Scandicci (Fi), Italy*

Le applicazioni della terapia fotodinamica sono sempre più numerose ed interessano diverse aree terapeutiche, dalla terapia dei tumori al trattamento delle infezioni microbiche [1]; questo spinge alla messa a punto di molecole dotate di caratteristiche che impartiscano una maggiore efficienza fotodinamica.

Tra i requisiti di un buon fotosensibilizzante di seconda generazione si annoverano l'elevato coefficiente di estinzione molare nella regione rossa dello spettro visibile (650-700 nm), una buona fotostabilità e alta produzione di ossigeno singoletto [2].

I derivati della zinco-ftalocianina sembrano possedere questi requisiti. Inoltre la possibilità di introdurre sostituenti di varia natura sull'anello ftalocianinico permette da una parte di modulare tali caratteristiche e quindi di incrementare l'efficienza fotodinamica delle molecole ottenute, dall'altra di variare le loro caratteristiche idrofiliche e lipofiliche.

Nell'ambito della realizzazione di uno studio struttura-attività su questo nucleo è stata sintetizzata una serie di zinco ftalocianine con grado e posizione di sostituzione differenti, recanti come sostituito il gruppo trimetilammoniofenossi, e per ognuno abbiamo sintetizzato l'analogo trimetilammoniotiofenossi.

Per le molecole sintetizzate è stata valutata l'efficienza fotodinamica nei confronti di cellule di lievito (*C.albicans*) prese come modello di microorganismo patogeno: l'attività degli oxo-derivati è stata confrontata con quella degli analoghi solforati per mettere in evidenza l'effetto della sostituzione ossigeno-zolfo.

[1] Wainwright, M., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1998, 42, 13-28

[2] Bonnett, D., *Chem. Soc. Rev.*, 1995, 19.

Indice degli Autori

Adami D.	33	Coppola E.	41
Agati G.	20	Cremonesi O.	13
Baccichetti F.	40	Croce A.C.	27, 28, 38, 46, 47
Baglioni P.	27	Cubeddu R.	36
Bagnoli C.	17	De Filippis M.P.	22, 23, 25, 48
Barbato R.	14, 16	Dei D.	22, 23, 25
Barni S.	47	D' Oriano A.	31
Barsanti L.	19	Ducommun B.	34
Bassi R.	13	Fabris C.	43
Beghetto C.	44	Fantetti L.	22, 23, 24, 48
Benericetti E.	38	Finazzi G.	12
Bergantino E.	18	Fiorani S.	27, 28, 38, 46, 47
Bergo E.	16	Forti G.	12
Biggiogera M.	28	Furia A.	12
Boer E.	26	Gaikwad J.	15
Bordin F.	40	Galardi C.	20
Bornman J.F.	11	Gallone A.	42
Borsetto L.	30	Garlaschi F.M.	13
Bottiroli G.	27, 28, 38, 42, 46, 47	Ghetti F.	17
Bottone M.G.	47	Giacometti G.M.	16, 18
Brunetta A.	18	Giombelli E.	38
Busetti A.	25	Giuntini F.	22, 24, 25, 43, 48
Caffieri S.	29, 30	Gobbo S.	44, 45
Camerin M.	44, 45	Gravano E.	20
Campolmi P.	35	Gualtieri P.	19
Cappugi P.	35	Jennings R.C.	13
Carlassare F.	40	Jori G.	25, 26, 43
Ceccon M.	26	Kisslinger A.	37
Chiti G.	22, 23, 24, 48	Lanza K.S.	27, 28, 38, 46, 47
Cinque G.	13	Levorato L.	29, 30
Colasanti A.	37	Liuzzi R.	37

Locatelli D.	27, 28, 38, 46	Romani A.	20
Lussignoli S.	28, 47	Roncucci G.	22, 23, 24, 25, 43, 48
Maffei L.	21	Rossi R.	35
Magaraggia M.	43	Salet C.	44, 45
Marzano C.	40	Salzano S.	41
Masala B.	42, 47	Sarri P.	23
Mavilia L.	35	Segalla A.	18
Miolo G.	29	Soncin M.	25
Monfrecola G.	32	Stivala L.A.	34
Monici M.	20	Supino R.	27
Monti S.	39	Szabò I.	16, 18
Moreno G.	44, 45	Tancioni F.	38
Mosca F.	33	Taroni P.	36
Nano R.	38	Tattini M.	20
Nistri D.	24, 48	Thomas S.	15
Palumbo G.	41	Tognon G.	44
Pastorini G.	40	Torricelli A.	36
Pellicciari C.	47	Vannucci L.	33
Pifferi A.	36	Varriale L.	41
Poussin K.	45	Verni F.	19
Prignano F.	35	Vidyasagar P.B.	15
Prosperi E.	34	Vismara R.	19
Quarto M.	37, 41	Zanoni R.	30
Reddi E.	29, 30	Zucchelli G.	13
Ricchelli F.	44, 45		
Riccio P.	37		
Riva F.	34		
Roberti G.	37		
Rodighiero P.	40		
Rolandelli S.	17		
Romanelli M.	33		