
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

BENEDETTO NICOLETTI, GIOVANNI TRIPPA

**Sull'azione mutagenica dello psoralene irradiato con
luce ultravioletta in *Drosophila melanogaster***

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 43 (1967), n.3-4, p.
259-263.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_43_3-4_259_0>

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

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

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

Genetica. — *Sull'azione mutagena dello psoralene irradiato con luce ultravioletta in Drosophila melanogaster* (*). Nota (**) di BENEDETTO NICOLETTI e GIOVANNI TRIPPA, presentata dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — Psoralene, a photodynamic furocumarine, has been tested for mutagenic action on *Drosophila* males, fed or injected with the substance and thereafter irradiated with long wave UV light (λ 3655 Å). The treated spermatozoa bearing a yw marked X chromosome were tested with the M-5 method for sex linked recessive lethals.

Psoralene did result mutagenic after feeding in the experiments with UV irradiation and, even if in much smaller extent, in those without irradiation.

The F₃ results have also shown that ingested Psoralene can induce sex linked lethal mosaics.

It has not been possible to reach any conclusive evidence for a similar mutagenic action of the Psoralene after injection. The salivary chromosome analysis of ♀♀ heterozygous for the X chromosomes bearing Psoralene induced lethals has not shown any evident structural rearrangement.

INTRODUZIONE.

Numerose sostanze chimiche sono dotate di proprietà fotodinamiche: hanno il potere cioè di determinare una serie di caratteristiche alterazioni se presenti in sistemi biologici che vengano esposti alla luce. Gli stessi composti non danno luogo ad alcuna azione se i sistemi biologici a cui sono stati somministrati vengono mantenuti al buio: per la maggior parte delle sostanze ad azione fotodinamica, gli effetti sono dovuti ad una serie di alterazioni metaboliche risultanti da processi fotoossidativi.

Le furocumarine e i loro derivati sono un particolare gruppo di sostanze chimiche a struttura ben nota dotate di notevole azione fotodinamica: è stato dimostrato tuttavia che i loro effetti non dipendono dalla presenza di ossigeno.

La diffusione di questi composti in numerosi vegetali ed il notevole interesse farmacologico che le furocumarine possono presentare ha fatto sì che numerosi studi e ricerche siano condotti sul loro meccanismo d'azione, specialmente ad opera di Musajo e della sua scuola [1].

In questi ultimi anni è stata prospettata l'ipotesi che le furocumarine ad effetto fotodinamico possano formare, in seguito ad irradiazione, complessi col DNA cellulare, in modo da alterarne stabilmente la struttura.

Recentemente questa ipotesi ha ricevuto conferma sperimentale [2] e ci è sembrato pertanto interessante saggiare l'eventuale effetto mutageno di

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Genetica dell'Università di Roma con il contributo del C.N.R.

(**) Pervenuta all'Accademia il 12 settembre 1967.

una furocumarina, lo Psoralene, somministrato a ♂♂ di *Drosophila melanogaster*, successivamente irradiati alla lunghezza d'onda di 3655 Å (che corrisponde al picco d'assorbimento e d'azione del composto stesso).

Le furocumarine irradiate avevano già dimostrato di possedere azione mutagenica in microrganismi [3, 4, 5] e si erano rivelate capaci di indurre mutazioni cromosomiche in cellule di mammifero coltivate *in vitro* [6]. Altenburg Luolin e Altenburg [7] ne avevano inoltre saggiato la eventuale azione mutagenica in *D.m.* somministrando la sostanza ad uova in sviluppo allo stadio di capsule polari; i risultati di questi AA., che avrebbero dimostrato una debole azione mutagenica dello Psoralene, sono tuttavia solamente indicativi, dato che l'irradiazione era stata effettuata a λ 2537 Å (UV di per sé stessa mutagenica) e non possono essere quindi considerati conclusivi.

MATERIALI E METODI.

Per i nostri esperimenti abbiamo impiegato ♂♂ del ceppo *yw* (*y*, I-0,0 = corpo giallo; *w*, I-1,5 = occhio bianco; la presenza di queste mutazioni determina l'assenza di pigmenti melanici dalla chitina che riveste l'addome, facilitando così la penetrazione delle radiazioni UV fino alle cellule germinali), ai quali, prima dell'irradiazione UV, veniva somministrato lo Psoralene.

I ♂♂ adulti, dopo alcuni giorni di digiuno in bottiglie da 120 cc., sul cui fondo avevamo depositato uno strato di alcuni mm. di agar per impedire la completa disidratazione delle Drosophile, venivano tenuti in presenza di una soluzione di Psoralene per altri 3-4 giorni, in modo che ne potessero ingerire una certa quantità. La soluzione veniva preparata al momento ed era costituita da 3 mg. di Psoralene, sciolti in 2 cc. di alcool 96° e portati a 10 cc. con aggiunta di acqua e lievito fresco.

Nell'esperimento in cui la sostanza veniva somministrata a ♂♂ adulti per iniezione, la soluzione era costituita da 3 mg. di Psoralene disciolti in 2 cc. di alcool 96° e 3 cc. di soluzione Shen.

La quantità di sostanza somministrata per iniezione, pur non essendo determinata, era equivalente per ogni ♂; infatti era valutata dal grado di rigonfiamento degli addomi durante l'iniezione.

Successivamente i ♂♂ venivano irradiati con luce UV secondo la tecnica di Reuss [8] a livello degli addomi, usando una dose di $2,5 \times 10^6$ ergs/cm². La sorgente della radiazione era costituita da una lampada Philips SP 500, montata su un monocromatore Bausch-Lomb a reticolo di diffrazione con lunghezza focale di 500 mm.

Spermatozoi di ♂♂ così trattati venivano saggiati per la presenza di mutazioni letali recessive legate al sesso con ♀♀ vergini del ceppo M-5 [*Ins* (1) *sc*^{S1L,8R}, S, *sc*^{S1+8} *w*^a B].

RISULTATI.

Usando il metodo M-5, sono stati eseguiti tre esperimenti: nei primi due la sostanza veniva fatta ingerire a ♂♂ adulti che successivamente venivano irradiati con luce UV; nel terzo esperimento, invece, la sostanza veniva iniettata direttamente nell'addome dei ♂♂ che venivano quindi sottoposti all'irradiazione.

I dati del primo esperimento, condotto facendo ingerire lo Psoralene ai ♂♂ adulti di *D.m.* sono riportati in Tabella I.

TABELLA I.

Trattamento	Tot. Cromos. X Esam.	Cromos. X Con Almeno 1 Let. Recessivo	% Letali Recessivi
PS + UV	982	42	4,27
PS	991	11	1,11
UV	827	1	0,12
Senza	3200	6	0,018

Essi mostrano che:

1) l'irradiazione da sola è del tutto inefficace nell'indurre un aumento della frequenza dei letali recessivi legati al sesso negli spermatozoi dei ♂♂ di controllo non trattati;

2) la sostanza al buio presenta di per se un leggero effetto mutageno;

3) la sostanza irradiata si dimostra capace di indurre una discreta quantità di mutazioni letali recessive legate al sesso.

La differenza tra la sostanza al buio e la sostanza irradiata all'analisi statistica eseguita con il metodo del χ^2 si è rivelata altamente significativa ($\chi^2_{(Yates)} = 17.73$ con 1 grado di libertà e $P = 0,001$).

Poiché un esperimento collaterale a questo non aveva dato risultati altrettanto significativi (e una variabilità nei risultati può spiegarsi con la difficoltà di ottenere che nei ♂♂ irradiati sia sempre presente una quantità costante e sufficiente della sostanza ingerita), abbiamo voluto estendere la nostra indagine sull'azione mutagenica dello Psoralene irradiato fino a rivelare la presenza di eventuali mosaici. A tal fine è stato effettuato un secondo esperimento, facendo ingerire la sostanza ai ♂♂ adulti *yw* e saggiando prima in F_2 la presenza di mutazioni letali recessive e quindi in F_3 quella di eventuali mosaici.

In F_2 è rimasta confermata la insufficiente significatività dei dati dell'esperimento collaterale, mentre in F_3 abbiamo ottenuto i dati che riportiamo in Tabella II; la F_3 è stata ottenuta facendo quattro incroci singoli (1 ♀ di costituzione M-5/*yw* × 1 ♂ M-5/*Y*) da ciascun barattolino della F_2 .

TABELLA II.

Trattamento	Tot. Cromos. X Esaminati	Cromos. X con 1 Mosaico	%
PS + UV	775	82	10,58
PS	91	4	4,40
UV	64	—	0,00

Il calcolo del χ^2 tra le due classi di maggior interesse PS + UV e PS ha dato un valore di circa 3, per cui la differenza nei dati, pur non essendo significativa per un grado di libertà del sistema, sembra indicare una certa efficacia nell'induzione di mosaici per mutazioni letali recessive.

Il terzo esperimento è stato condotto sempre utilizzando il metodo M-5 esteso all'analisi dell' F_3 per la presenza di eventuali mosaici, ma non più facendo ingerire lo Psoralene ai ♂♂ adulti yw , bensì iniettando loro una soluzione di PS + alcool + Shen; i dati si riferiscono sempre alla F_3 , in quanto nella F_2 non si è potuta mettere in evidenza alcuna efficacia dei trattamenti.

Questi dati sono riportati in Tabella III:

TABELLA III.

Trattamento	Tot. Cromos. X Esaminati	Cromos. X con 1 Mosaico	%
PS + Alcool + Shen + UV	418	9	2,15
PS + Alcool + Shen . . .	291	4	1,37
Alcool + Shen + UV . . .	189	3	1,58

Le differenze tra i vari trattamenti, come risulta dai dati esposti in Tabella III, non si dimostrano significative e si può pertanto concludere che nel caso dello Psoralene iniettato e successivamente irradiato, questo non presenta la caratteristica di poter indurre mosaici per letali recessivi.

CONCLUSIONI.

Lo Psoralene irradiato si è dimostrato capace di indurre mutazioni letali recessive legate al sesso se ingerito da ♂♂ di *Drosophila*. Per la difficoltà di valutare la quantità di sostanza ingerita e la quantità di radiazione UV capace di raggiungere le cellule germinali attraverso la parete addominale, non è

stato possibile determinare una relazione dose-effetto e si è notata una variabilità nei risultati da esperimento ad esperimento. È stato tuttavia accertato che lo Psoralene irradiato può esplicare la sua azione mutagena, come molte sostanze chimiche, inducendo mosaici per mutazioni recessive legate al sesso, che possono essere messe in evidenza solo in F_3 .

Si è potuto inoltre mettere in evidenza come anche lo Psoralene non irradiato sia capace di indurre mutazioni letali recessive, sia pure con un'efficacia molto minore.

Per quanto riguarda la differenza negli effetti dello psoralene ingerito ed iniettato, i nostri risultati sono simili a quanto riportato da altri AA. [9] che avevano dimostrato una maggiore efficacia mutagena di sostanze somministrate per ingestione rispetto alle stesse somministrate per iniezione. Le ragioni di questa differenza, pur presentando un certo interesse, non sono state ancora chiarite.

Il campione di mutazioni letali recessive legate al sesso ottenuto nel primo esperimento in seguito all'irradiazione dei ♂♂ dopo l'ingestione della sostanza, è stato sottoposto all'analisi citogenetica dei cromosomi salivari secondo la tecnica descritta da Nicoletti [10].

Salivari di ♀♀ eterozigoti per un cromosoma normale X Oregon R e il cromosoma X portatore della mutazione letale sono stati inoltre esaminati per mettere in evidenza eventuali grossi riordinamenti strutturali; un'accurata analisi non ha rivelato alcuna anormalità visibile. Si può pertanto concludere che lo Psoralene irradiato si è dimostrato efficace nell'indurre mutazioni letali non associate a grossi riordinamenti strutturali, e quindi molto probabilmente di tipo genico, al livello del DNA. Questi risultati non sono ancora sufficienti ad indicare quale possa essere il meccanismo d'azione mutageno a livello del DNA delle furocumarine irradiate che presentano tuttavia notevoli analogie con gli effetti delle acridine fotoattivate.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] MUSAJO L., in « Radiation Research », editor G. Silini, 803-812 North-Holland Publ. Co., Amsterdam (1967).
- [2] MUSAJO L. and G. RODIGHIERO, « Atti Acad. Naz. Lincei », 38, 591 (1965).
- [3] OGINSKY E. L., G. S. GREEN, D. G. GRIFFITH and W. L. FOWLS, « J. Bacter. », 78 (1959).
- [4] FOWLS W. L., D. G. GRIFFITH and E. L. OGINSKY, Nature 181, 571 (1958).
- [5] MATHEWS M. M., « J. Bacter. », 85, 322 (1963).
- [6] NICOLETTI B., ANTONELLI A., BACCHETTI S., COLOMBO G. and PAGGINI L., « Book of abstracts », p. 166, 3th Intern. Congr. of Rad. Res. Cortina d'Ampezzo (1966).
- [7] ALTENBURG J., LUOLIN S. and ALTENBURG E., « Genetics » 41, 633 (1956).
- [8] REUSS A., Z.I.A.V. 70, 523 (1935).
- [9] JENKINS J., Annual Drosophila Research Conference, Austin, Texas (1967).
- [10] NICOLETTI B., D.I.S. 33, 181, (1959).

A. ROSSI-FANELLI e B. FINZI