



Facoltà di Medicina e Chirurgia
Dottorato di Ricerca XV Ciclo
Curriculum: SCIENZE BIOMEDICHE

**Ruolo di composti fito-chimici ad azione antiossidante e
antinfiammatoria in colture di fibroblasti del derma
umano nella protezione dal foto-invecchiamento**

Relatore

Prof. Luca Tiano

Tesi di Dottorato di

Fabio Marcheggiani

Co-Relatore/ Tutor aziendale

Dott. ssa Daniela Donelli (Angelini, ACRAF)

Anno Accademico 2013 - 2016

SOMMARIO

INTRODUZIONE	6
APPARATO TEGUMENTARIO	7
EPIDERMIDE	7
DERMA	9
<i>FIBROBLASTI</i>	10
<i>COLLAGENE</i>	11
<i>ELASTINA</i>	11
<i>GAG</i>	12
IPODERMA	13
BIOMECCANICA DELLA PELLE	13
INVECCHIAMENTO DELLA PELLE	15
INVECCHIAMENTO CRONOLOGICO	18
INVECCHIAMENTO ESTRINSECO (FOTOAGING)	21
<i>EFFETTO UVB SULLA PELLE</i>	23
<i>EFFETTO UVA SULLA PELLE</i>	27
<i>UVA E RUGHE</i>	32
<i>MMPS E UV</i>	35
STRESS OSSIDATIVO E INVECCHIAMENTO	38
FOTOSENSITIZZAZIONE	39
ROS	41
ROS EFFETTI SULLA SALUTE	44
MITOCONDRI E ROS	48
ANTIOSSIDANTI ENDOGENI	51
ANTIOSSIDANTI ESOGENI	58

VITAMINAC.....	58
VITAMINA E.....	59
CAROTENOIDI.....	62
POLIFENOLI.....	62
GLUCOSINOLATI.....	68
INFLAMMAGING E MODELLI IN VITRO.....	71
INFLAMMAGING.....	71
MODELLO DI INVECCHIAMENTO IN VITRO.....	74
DIRETTIVA 1229/2013.....	75
SCOPO DELLA TESI.....	77
MATERIALI E METODI.....	79
COLTURE CELLULARI.....	79
PRINCIPI ATTIVI.....	79
CITOFUORIMETRIA A FLUSSO.....	81
SAGGIO DI CITOTOSSICITÀ.....	81
MISURAZIONE ROS INTRACELLULARI.....	83
INDUZIONE DI ROS INTRACELLULARI CON PEROSSIDO DI IDROGENO (STRESS CHIMICO).....	86
SAGGIO FOTODANNO UVA INDOTTO.....	86
<i>SELEZIONE DEL MIGLIOR TEMPO DI ANALISI DOPO LO STIMOLO FOTOSSIDANTE (TIME RECOVERY).....</i>	<i>86</i>
<i>SELEZIONE DOSE DI IRRAGGIAMENTO (TIME COURSE).....</i>	<i>87</i>
<i>FOTOSTABILITÀ</i>	<i>88</i>
<i>Ruolo protettivo dei fotocomposti verso lo stress ossidativo indotto da UVA.....</i>	<i>88</i>
SAGGIO ORAC.....	89
SAGGIO ANTI-IFIAMMATOARIO CON LPS.....	91
CITOTOSSICITÀ LPS.....	91
CITOTOSSICITÀ BISABOLOLO.....	91
RISULTATI.....	94

SAGGIO DI CITOTOSSICITÀ	94
SAGGIO DEL PEROSSIDO DI IDROGENO	96
SAGGIO ORAC	98
SAGGIO FOTODANNO UVA INDOTTO	99
<i>SELEZIONE DEL MIGLIOR TEMPO DI ANALISI DOPO LO STIMOLO FOTOSSIDANTE</i> <i>(TIME RECOVERY)</i>	99
<i>SELEZIONE DOSE DI IRRAGGIAMENTO (TIME COURSE)</i>	100
<i>FOTOSTABILITÀ</i>	102
<i>UV CHALLENGE CON I PRINCIPI ATTIVI</i>	103
SAGGIO ANTI-IFIAMMATORIO CON LPS	105
<i>CITOTOSSICITÀ LPS</i>	105
<i>SELEZIONE MIGLIOR TEMPO DI INCUBAZIONE E</i> <i>CONCENTRAZIONE CON LPS</i>	106
<i>CITOTOSSICITÀ BISABOLOLO</i>	106
<i>POTERE ANTIIFIAMMATORIO DEL BISABOLOLO</i>	107
<i>SCREENING POTERE ANTI-IFIAMMATORIO DELLE MATERIE PRIME</i>	108
EFFETTO MISCELE NEL SAGGIO ORAC	109
TEST DEL FOTOINVECCHIAMENTO IMPIEGANDO MISCELE DEI PRINCIPI A PIU’ ELEVATA AZIONE ANTIOSSIDANTE E ANTIIFIAMMATORIA	110
<i>MINIMA CONCENTRAZIONE EFFICACE DEI MIGLIORI PRINCIPI ATTIVI AD AZIONE</i> <i>ANTIOSSIDANTE E ANTIIFIAMMATORIA</i>	110
<i>EFFICACIA DELLE MISCELE CONTRO IL FOTO-INVECCHIAMENTO</i>	113
DISCUSSIONE	116
BIBLIOGRAFIA	123

INTRODUZIONE

La pelle o apparato tegumentario è un organo indispensabile per la nostra sopravvivenza nell'ambiente circostante.

E' uno degli organi più estesi del nostro corpo con i suoi 1,5-2 metri quadrati, ha un peso che oscilla tra 5 e 10 kg e presenta uno spessore che varia da 0,4 a 3 mm.

Ricopre molte funzioni indispensabili per la nostra vita senza le quali non sarebbe possibile un normale rapporto con l'ambiente esterno.

La funzione principale è quella protettiva, infatti la pelle è considerata una barriera per i nostri tessuti e organi più profondi.

La funzione protettiva riguarda sia stimoli esterni indesiderati, come umidità, raggi UV, batteri, funghi, protozoi, ecc, che il trattenimento di sostanze fondamentali per il nostro corpo, tra cui l'acqua.

La cute è, dunque, un modello molto efficiente e funzionale di membrana che riveste il nostro corpo.(1)

Altra funzione vitale della cute è la funzione secretoria, infatti la pelle permette al nostro corpo di eliminare tossine o sostanze organiche tossiche che si potrebbero accumulare nel nostro organismo.

Vi è poi la funzione termoregolatrice, svolta tramite il fenomeno della *perspiratio insensibilis*, che ci permette di mantenere costante la nostra temperatura corporea.

La cute presenta anche strutture sensoriali innervate con il sistema nervoso simpatico quindi svolge una funzione sensoriale, ne sono un esempio i corpuscoli di Merkel.

Essi sono piccole strutture che fungono da recettori pressori di varia natura, lo stimolo viene propagato dalla fibra afferente con adattamento lento rispetto agli altri meccanorecettori.

Grazie alla natura prolungata della risposta sensoria, questi ci permettono di toccare e venire a contatto in maniera fine con diverse superfici, questa funzione è molto importante per interfacciarsi con l'ambiente circostante.

Ultima funzione della barriera cutanea è quella assorbente, infatti solo alcune sostanze semplici (es. acqua, molecole a basso peso molecolare e lipofile) riescono ad oltrepassare la barriera cutanea.

Lo studio di nuove molecole o di veicolanti per oltrepassare questo ostacolo è oggetto, in ambito cosmetico e farmaceutico, di ricerche che puntano ad aumentare l'effetto assorbente per ottenere una maggiore biodisponibilità di principi attivi.

Il problema dell'assorbimento è strettamente e inevitabilmente connesso alla funzione protettiva della barriera cutanea.

APPARATO TEGUMENTARIO

Per conoscere la funzione protettiva e l'effetto barriera della nostra cute dobbiamo descrivere le diverse componenti di questo sistema dinamico.

La cute è composta principalmente da pelle e annessi cutanei (peli, unghie etc.); la pelle a sua volta è suddivisa in tre strati (Fig. 1):

Epidermide (strato più esterno)

Derma (strato più profondo)

Ipoderma (strato sottocutaneo)

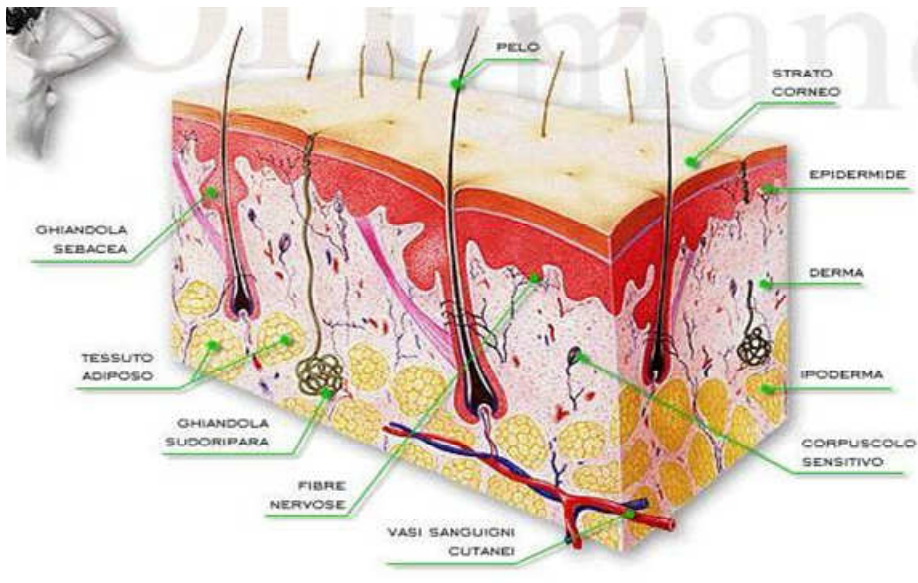


Figura 1 Sezione che mostra la struttura multistrato dell'apparato tegumentario

EPIDERMIDE

Rappresenta lo strato più esterno, quello che si trova a contatto con l'ambiente, ed è diviso a sua volta in ulteriori compartimenti o strati (Fig.2):

- Strato basale: lo strato più profondo, dove sono presenti le cellule con un'alta attività proliferativa. Inizia così la produzione dei cheratinociti

- Strato spinoso: i cheratinociti hanno una forma estesa e sintetizzano la cheratina in forma fibrillare.
- Strato granuloso: è lo strato dove ha luogo le prime fasi del processo di cheratinizzazione, nelle cellule si ha la comparsa di questi granuli, che negli strati superiori si gonfieranno e rilasceranno con la loro rottura cheratina e lipidi.
- Strato lucido: strato presente solo nelle regioni palmo-plantari, le cellule risultano appiattite dai contorni non definiti.
- Strato corneo: strato più esterno composto principalmente da cellule morte cheratinizzate immerse in un film idro-lipidico. Il turn over di queste cellule ha luogo mediante un processo di distacco enzimatico chiamato desquamazione ad elevato tasso proliferativo.

I corneociti, che sono l'evoluzione dei cheratinociti, sono cellule composte soprattutto di cheratina, rivestite di un envelope proteico immerso a sua volta in una fase lipidica caratteristica formata da colesterolo, acidi grassi liberi e ceramidi (sebo).

I ceramidi sono acidi grassi caratteristici del sebo che permettono allo strato corneo di essere flessibile e di intrappolare le molecole di acqua.

Esistono varie forme di ceramidi che differiscono tra loro per la struttura chimica e il tipo di legame(1)

Lo strato corneo in generale ha un contenuto scarso di acqua (max 35%), però svolge un notevole effetto barriera contro la disidratazione, grazie allo strato corneo compatto e alla capacità idrofila molto alta, dovuta alle sostanze fortemente igroscopiche ad alto e basso peso molecolare (NMF, fattore di idratazione naturale).

La funzione protettiva contro stimoli meccanici fisici, chimici o biologici è dovuta alla complessa struttura dei corneociti e alla matrice lipidica in cui sono immersi.

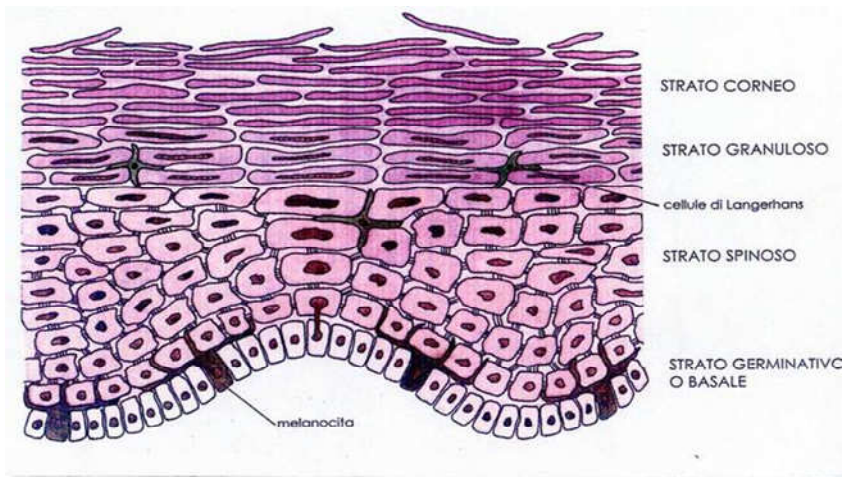


Figura 2 Suddivisione degli strati epidermici

DERMA

È un tipo di tessuto connettivo intermedio fra l'ipoderma e l'epidermide ed è fissato a quest'ultimo grazie alla lamina basale.

Il derma svolge molteplici funzioni di sostegno o scaffold e di nutrizione, infatti, a differenza dello strato superficiale, presenta una ricca vascolarizzazione atta a portare nutrienti ed ossigeno verso la cute.

Esistono due suddivisioni del derma: derma papillare e derma reticolare.

La componente papillare è composta da papille che sono piccole e scarse in quasi tutta la cute, tranne che a livello delle regioni glabre, dove sono numerose e grandi, fittamente stipate e con decorso uguale alle creste epidermiche della superficie.

Il connettivo papillare è meno denso che in profondità, povero di fibre elastiche e ricco di capillari sanguiferi e terminazioni nervose talora complesse come i corpuscoli di Meissner dei polpastrelli delle dita.

È più ricco di cellule rispetto allo strato reticolare, con il quale continua senza limiti.

Lo strato reticolare è formato da robusti fasci di fibre collagene intrecciate, con disposizione per lo più parallela alla superficie libera della cute. L'orientamento dei fasci varia da regione a regione e determina traiettorie di resistenza (linee di Langer).

La componente cellulare presenta diversi tipi di cellule: fibroblasti, monociti, macrofagi, mastociti e linfociti. L'unità fondamentale e indispensabile è il fibroblasto, la cellula caratteristica di questo strato e anche la più abbondante.

Lo strato reticolare è ricco di fibre elastiche, numerose attorno ai follicoli pilosebacei e agli adenomeri delle ghiandole. Abbondanti sono i vasi sanguiferi e le terminazioni nervose insieme a follicoli piliferi e ghiandole tipiche della cute.

FIBROBLASTI

I fibroblasti sono generalmente di aspetto fusiforme, ma esistono anche sottoforma stellata. Sono dispersi nella matrice e sono disposti lungo le fibre. Sono formati da una zona perinucleare, dove si trovano l'apparato di Golgi e i mitocondri che sono lunghi e sottili (Fig. 3).

Il reticolo endoplasmatico presenta cisterne appiattite, i filamenti del citoscheletro sono molto sviluppati, in particolare i microfilamenti actinici concentrati nella zona corticale.

Numerose sono le strutture di adesione quali podosomi e adesioni focali. Quando finisce la loro attività biosintetica, i fibroblasti si trasformano in fibrociti, che hanno citoplasma debolmente acidofilo, al contrario dei fibroblasti che lo hanno basofilo. Fibroblasti e fibrociti rappresentano due stadi della medesima linea cellulare.

Queste cellule caratteristiche del tessuto connettivo secernono collagene, glicosaminoglicani, fibre elastiche, reticolari e le glicoproteine che si trovano nella matrice extracellulare.

Queste sostanze di base vanno a formare la cosiddetta componente extracellulare (amorfa) del derma, un sistema colloidale multifasico, di consistenza gelatinosa, formato da una fase disperdente acquosa, in cui sono disciolti elettroliti, e da una fase dispersa costituita da proteine enzimatiche, glicoproteine e proteoglicani.

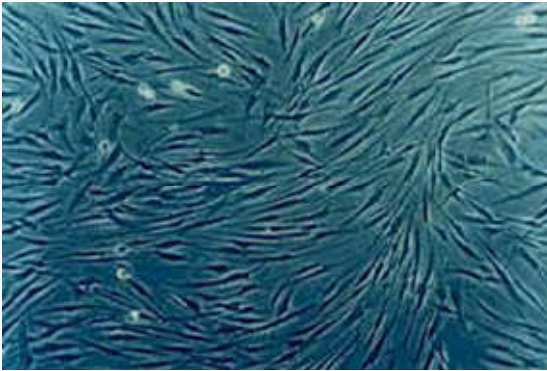


Figura 3 Fibroblasti umani in coltura arrivati alla confluenza

COLLAGENE

È la proteina idrofila più abbondante nel nostro corpo: rappresenta il 25% delle proteine totali. Si presenta nel derma sotto forma di fasci, formati da fibrille disposte in maniera parallela fra di loro. Le fibrille hanno una struttura secondaria a tripla elica e ogni elica è formata da 1400 amminoacidi. Queste sequenze amminoacidiche delle eliche presentano uno schema di ripetizione di tre amminoacidi alla volta (Fig. 4).

Il principale amminoacido che si ripete è la glicina, seguita come numero di ripetizioni dalla prolina e dalla idrossiprolina. Questi ultimi due sono amminoacidi molto caratteristici che si trovano principalmente nel collagene.

Sono stati identificati a seconda della struttura primaria e della struttura secondaria 28 tipi di collagene. Il collagene di tipo I domina sulle altre forme III e IV, rappresentando il 90% delle forme di collagene umano.

Questa forma principale di collagene è codificata dal gene COL1A1 e COL1A2 e si trova principalmente nei tendini, nelle ossa e nelle cornee. La forma di tipo III è presente nella parete dei vasi sanguigni e ricopre una estrema importanza nella costituzione della parete degli stessi.

ELASTINA

È una proteina molto importante, vista la sua presenza in vari tessuti come pelle, polmoni, vasi sanguigni etc.

Grazie alle sue proprietà elastiche, permette di resistere a stimoli di natura estensoria. Essa, infatti, può allungarsi fino a 5 volte in più delle sue normali dimensioni.

Nel derma, come in altri compartimenti cellulari, queste fibre si trovano disposte parallelamente fra loro come fasci intervallati da lunghe fibrille inelastiche di collagene frammiste con le fibre elastiche, così che impediscono ai tessuti di strapparsi.

L'elastina, come il collagene, è inusualmente ricca di prolina e glicina ma, al contrario del collagene, non è glicosilata e contiene poca idrossiprolina e nessuna idrossilisina.

L'elastina è importante per l'integrità ed elasticità dei tessuti, essendo responsabile della loro forza e flessibilità (Fig.4).

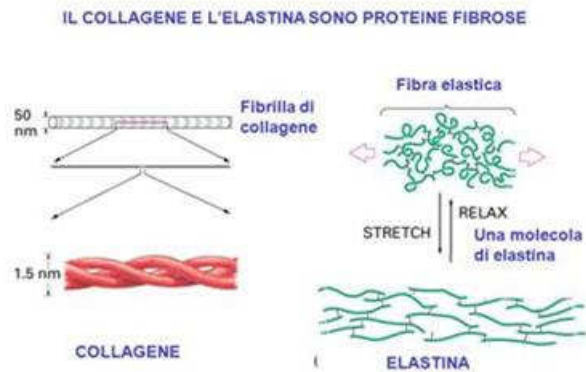


Figura 4 Diverse strutture delle proteine fondamentali costituenti la matrice amorfa del derma

GAG

Sono polimeri derivati da zuccheri semplici; i più importanti sono gli acidi uronici, quali l'acido D-glucuronico, l'acido L-iduronico, e gli aminozuccheri glucosamina e galattosamina

Alcuni glicosaminoglicani di grande importanza biologica contengono nella molecola, oltre agli zuccheri ed acidi uronici, elevate concentrazioni di gruppi solforici. Alcuni tra glicosaminoglicani più noti sono: Condroitin solfato, Dermatan solfato, Eparan solfato, Ialuronato o acido ialuronico (Fig. 5) etc.

La loro funzione consiste nel regolare la quantità di acqua presente nella cute e fungono da sostegno, contribuendo al mantenimento del trofismo, dell'idratazione e dell'elasticità. La sostanza fondamentale è quindi responsabile del turgore del derma e della sua resistenza ed elasticità in seguito alla compressione.

Essendo composti idrofili, i glicosaminoglicani possono legarsi molto facilmente con molecole d'acqua, fino a 1000 volte il loro volume. L'idratazione porta al "rigonfiamento" della molecola dei glicosaminoglicani

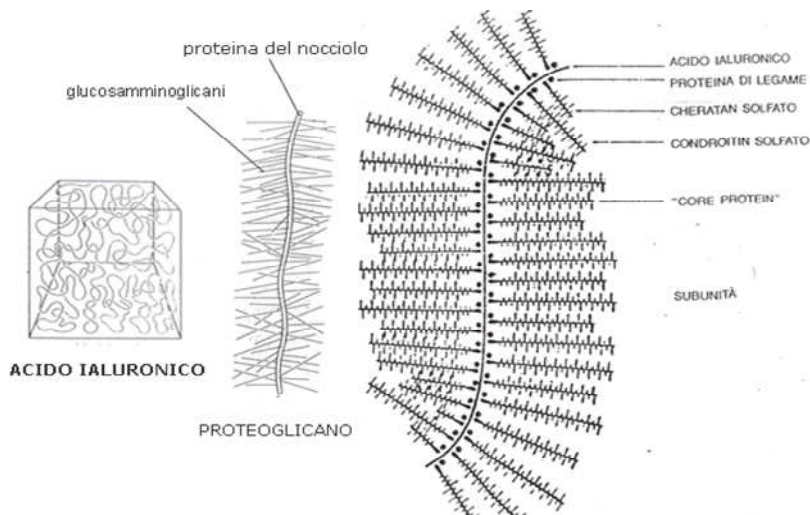


Figura 5 Scaffold dei differenti glicosammnoglucani

IPODERMA

Il livello più profondo dell'apparato tegumentario, è detto tessuto adiposo sottocutaneo o pannicolo adiposo.

L'ipoderma è un connettivo, costituito da una impalcatura di fibre connettivali, tra le cui maglie sono inseriti i lobuli.

I lobuli sono strutture anatomiche costituite da ammassi cellulari, detti adipociti, ricchi di trigliceridi. Tra un adipocita e l'altro è interposta una piccola quantità di sostanza fondamentale.

Il tessuto sottocutaneo, svolge funzione meccaniche di ammortizzazione e di sostegno e, inoltre, costituisce un'ampia riserva energetica (l'adipe di deposito, in un uomo di 70 Kg, equivale a 45-90.000 calorie)

Esso concorre anche al funzionamento dei meccanismi termoregolatorie neurovascolari

BIOMECCANICA DELLA PELLE

A livello fisico la cute, attraverso l'epidermide, il derma e l'ipoderma, resiste a stimoli di natura fisica, grazie alle sue proprietà biomeccaniche (2).

I principali stimoli a cui è sottoposta la pelle sono:

- **Stress pressorio:** inteso come pressione su unità di area di una forza o un agente esterno; un esempio di pressione applicata alla cute è l'estrazione di un comedone.(3)
- **Allungamento (Strain):** rapporto tra la lunghezza iniziale di un oggetto e la lunghezza di questo dopo aver subito una deformazione.
- **Creep:** deformazione lenta ma costante del tessuto, dovuta ad uno stress estensorio
- **Rilassamento:** conseguenza della resistenza allo sforzo: la pelle si rilassa dopo essere stata soggetta ad un' allungamento costante(3)

A fronte di questi stimoli fisici, la cute vanta queste proprietà:

- **Elasticità:** abilità di ritornare dopo uno stimolo estensorio alla posizione originale. L'applicazione di un'estensione prolungata ed eccessiva fa perdere l'abilità del tessuto di ritornare nella posizione originaria (3)
- **Viscosità:** proprietà contraria alla elasticità: la deformazione non viene annullata ma viene mantenuta.
- **Viscoelasticità:** a seconda dello stress e della durata può avere reazioni elastiche o viscosi. (3)

La maggior parte di queste caratteristiche biomeccaniche di una cute giovane e sana si devono attribuire ai suoi costituenti, in particolare collagene, elastina e GAGs.

L'elastina contribuisce a dare elasticità a tutta la pelle, permettendo di recuperare la forma originale della cute dopo una deformazione. Non tutta la capacità elastica dipende dalla presenza di elastina: se la deformazione è importante, le fibre elastiche si possono frammentare perdendo la caratteristica di retrabilità. (4 , 5)

La componente GAGs, compresi i proteoglicani, assieme alle suddette proteine, svolge un ruolo molto importante.

Molecole come acido ialuronico, dermatan solfato, condroitin solfato sono, infatti, i costituenti di un liquido che circonda l'elastina e il collagene durante il movimento, svolgendo un effetto lubrificante(3).

Il collagene ha un ruolo centrale nel sostenere la struttura del derma, è una proteina rigida e manca di capacità retrabile. Esso, essendo molto presente sotto forma di fasci nel derma, permette alla pelle di essere integra e tonica; nello specifico, tiene costante lo spessore della pelle.

La biomeccanica e la funzionalità della pelle variano a seconda di sesso, razza ed età

Riguardo l'età, la cute, come tutti gli organi, è direttamente o indirettamente interessata dal fenomeno dell'invecchiamento (aging). Infatti, la stessa biomeccanica e l'aspetto visibile della pelle cambiano a seconda dell'età anagrafica della persona.

INVECCHIAMENTO DELLA PELLE (*Aging*)



Figura 6 Effetto dell'invecchiamento cutaneo visibile su diversi soggetti a diverse età

A livello macroscopico, il processo di senescenza accompagna la cute con cambiamenti sempre più evidenti al progredire dell'età, tant'è vero che riusciamo facilmente a distinguere, anche grazie all'aspetto della pelle, un giovane da un anziano (Fig. 6).

La cute invecchiata è una pelle che, a livello molecolare e biochimico, subisce dei cambiamenti che si ripercuotono nel trofismo e nella crescita dell'apparato tegumentario stesso.

A livello fenotipico e visivo, la pelle invecchiata è un tessuto lasso asfittico riccoda macchie di varia natura; lo spessore della cute risulta diminuito, l'umidità, e di conseguenza il turgore della pelle, sono in netta diminuzione (Fig. 6).

Il tessuto risulta quindi meno solido, meno spesso e meno elastico.

La perdita di spessore di questa barriera cutanea diminuisce, secondo alcuni studi, del 6% ogni dieci anni (3).

Questi cambiamenti più esterni e visibili sono dovuti ad un rimodellamento profondo dello strato del derma.

Nel derma diminuisce la presenza di proteine strutturali ed elastiche come il collagene e l'elastina, quest'ultima, costituita da network di fibre, presenta un'alterazione complessiva della loro distribuzione (3).

Anche la viscoelasticità, altra proprietà biomeccanica caratterizzante, risulta alterata nel tempo; più precisamente l'effetto biomeccanico aumenta il tempo di ripresa della cute da uno specifico stress pressorio. La causa è il cambiamento dei GAGs presenti nella matrice del derma(3).

Sia il collagene che i GAGs presenti sottoforma di microfibrille in una cute invecchiata subiscono dei rimodellamenti strutturali passando da un network di microfibrille ordinate a degli agglomerati. Il collagene, proteina fondamentale nel derma, a causa dell'invecchiamento, diminuisce, infatti con il tempo diminuiscono i fibroblasti, principali elementi cellulari del derma.(6)

I fasci di collagene sottoposti ad invecchiamento sono i target di enzimi specifici che aumentano in questo particolare tipo di condizione. Gli enzimi presi in considerazione sono le MMPs matrici metallo proteasi che degradano selettivamente i fasci di collagene(6) suddividendo la loro struttura in catene più piccole e corte meno adatte a sostenere la struttura del derma.

Esistono diverse forme di metallo proteasi presenti nel derma; quella specifica e selettiva per il collagene è la MMP-1, la quale inizia il processo di degradazione proteica del collagene per poi collaborare con altre metalloproteasi che la scinderanno in catene più piccole polipeptidiche(6). Caratteristiche del fenomeno di invecchiamento sono l'attivazione delle MMPs e l'inibizione dei TIMPs (Inibitori delle metallo proteasi) (6,7, 8).

Ulteriore aspetto fenotipico della pelle invecchiata è la sua rigidità e perdita di elasticità, altra caratteristica biomeccanica essenziale.

Il fenomeno è dovuto ad una modificazione e rimodellamento delle principali molecole presenti nella matrice extracellulare del derma: elastina e fibrillina.

Queste proteine subiscono un rimodellamento generale e radicale. La loro stessa presenza nel derma diminuisce in maniera notevole dal momento che si riducono i fibroblasti, i principali produttori di queste proteine(5)

A livello biochimico aumenta la fase catabolica di queste proteine, che sono degradate in maniera maggiore rispetto alle situazioni fisiologiche. I fasci di elastina sono infatti processati da altri enzimi che aumentano la loro attività nei fenomeni di invecchiamento: un esempio può essere l'elastasi neutrofila che aumenta con il tempo la degradazione della suddetta proteina.

Altre proteine comuni che sembrano aumentare la degradazione dell' elastina sono le stesse MMP, anche se non è ancora chiaro il meccanismo di azione

Le fibre di elastina a livello spaziale, una volta degradate, subiscono un arrangiamento anomalo nella pelle invecchiata facendo perdere la capacità elastica alla cute.

Queste modificazioni aging-correlate riguardanti le proteine principali del derma per abbondanza e capacità, causano la comparsa dei classici segni cutanei visibili in una cute non più giovane: le rughe. (9,7,8)

Altro segno distintivo di un tessuto cutaneo invecchiato dal punto di vista fenotipico è la comparsa di macchie di colore scuro o bruno chiamate *lentigo senilis*.

La cute anziana, infatti, presenta anche queste pigmentazioni irregolari e anomale, che sono legate ad un fenomeno degradativo accelerato e non più ordinato.

I prodotti di scarto metabolici derivanti dai pigmenti e dalle normali proteine presenti nella cute non sono più processati e degradati dalle strutture apposite (proteasoma, ubiquitinazione, etc.).

L'effetto è un accumulo di queste sostanze biologiche di rifiuto che finiscono col presentarsi come degli aggregati composti da molecole o metaboliti di varia natura, che sedimentano nell'epidermide o nel derma formando così fenomeni di iperpigmentazioni irregolari.

Gli aggregati responsabili delle macchie dell'invecchiamento sono costituiti da lipofuscina.

La lipofuscina è essenzialmente composta da residui di ossidazione lipidica e proteica. I lipidi sono per la maggior parte trigliceridi, acidi grassi liberi, colesterolo e fosfolipidi. Gli scarti proteici sono tipicamente caratterizzati dalla presenza di amminoacidi.

Questo composto è un prodotto di un alterato meccanismo di degradazione proteica e autofagia(10,11). Questo agglomerato di proteine non degradate, ossidate e ubiquitinate non è causa solo della comparsa di pigmentazioni tipiche dell'invecchiamento, ma presenta un'attività di interferenza con i normali meccanismi di turn over proteico fondamentali per la proteostasi della cellula. La lipofuscina non è una molecola di scarto inerte, ma un suo accumulo ha un effetto citotossico per la cellula.(11)

Il suo deposito, infatti, blocca e influenza molti pathways biochimici e molecolari che contribuiscono al processo di aging (11).

Nello specifico il proteosoma è un multiorganello proteico consistente in un assemblamento del core 20 S con due subunità 19S; una volta unite il proteosoma 26 S è attivo e può degradare i prodotti di scarto del normale turn over proteico.

Durante l'invecchiamento si può creare un errato turn over proteico, cioè si accumulano le proteine ossidate nel compartimento cellulare. Queste possono disassemblare la corretta conformazione del proteosoma rilasciando il core 20 s nel citoplasma(11).

Lo scorretto funzionamento del proteosoma e l'accumulo di proteine ossidate o ubiquitinate porta all'attivazione del segnale c-Jun fosforilato che tramite AP-1 attiva le MMPs, enzimi degradativi del derma tipici dell'invecchiamento(11).

Un corretto funzionamento delle subunità proteasomiche può bloccare l'attivazione di Nfk-B, fattore di trascrizione essenziale nella regolazione dei segnali e fattori di trascrizione che regolano il processo pro infiammatorio e il conseguente invecchiamento in vari distretti cellulari.(11)

In questa prima parte abbiamo descritto in maniera generale gli effetti che l'invecchiamento comporta nella cute, accennando ai fenomeni biochimici e molecolari che vengono alterati durante questo fenomeno.

L'invecchiamento dell'apparato tegumentario presenta vari aspetti biochimici e molecolari, e può essere causato da agenti esogeni o endogeni, a seconda degli agenti responsabili, in letteratura si classificano questi due tipi di invecchiamento:

- Invecchiamento intrinseco (cronologico)
- Invecchiamento estrinseco (fotoaging)

INVECCHIAMENTO CRONOLOGICO (INVECCHIAMENTO PROGRAMMATO)

È un fenomeno che colpisce ogni distretto corporeo ed ha come componente fissa il ciclo cellulare. Le cellule di ciascun distretto corporeo, comprese le cellule dei vari strati cutanei, sono caratterizzate da un numero fisso di divisioni cellulari, determinate dal codice genetico e da alcuni geni deputati a regolare le suddivisioni cellulari.

L'informazione genetica e in particolare la modulazione della espressione sono influenzate dall'orologio biologico della cellula che controlla e permette un corretto funzionamento del metabolismo cellulare.

Il ciclo cellulare, infatti, è un delicato meccanismo di segnali e fattori di trascrizioni molecolari che influenzano e permettono alla cellula di passare in tutte e quattro le fasi: G1, S, G2, M.

All'inizio del Novecento si riteneva che in vitro le linee cellulari dei vertebrati in genere potessero crescere e suddividersi in maniera illimitata.

Negli anni 50 però, si è osservato per la prima volta che le cellule possono raggiungere un numero limitato di divisioni.(12). Il meccanismo molecolare alla base è il progressivo accorciamento delle estremità cromosomiali (telomeri). Queste estremità sono costituite da 10000 coppie di basi, che contengono sequenze nucleotidiche ripetute in tandem (5'-TTAGGG-3' nell'uomo)(13). Queste sequenze vengono riconosciute dalle ribonucleoproteine chiamate Telomerasi che ad ogni divisione cellulare riescono ad allungare i filamenti di DNA tronchi alle estremità cromosomiali.

Questo meccanismo permette alle cellule di dividersi evitando un accorciamento eccessivo dei filamenti di DNA che compongono i cromosomi.

Quando questi enzimi non sono più efficaci o attivi i telomeri si accorciano sempre di più fino ad arrivare ad un livello di perdita di materiale genetico che compromette la mitosi cellulare stessa.

Le cellule, infatti, diminuiscono gradualmente il numero di divisioni, fino a quando entrano in una fase G1 prolungata irreversibile chiamata senescenza.

Le stesse cellule dell'apparato tegumentario vanno incontro al fenomeno della senescenza: cheratinociti, melanociti e fibroblasti.

E' stato osservato in numerosi studi che i fibroblasti con l'invecchiamento mutano il loro metabolismo esprimono attivamente metallo proteasi e secernono meno collagene.

Queste conseguenze metaboliche invecchiamento-correlate prevedono il rilascio di determinati segnali e mediatori biochimici o molecolari. p21, p16 e p53 rappresentano i tre fattori di trascrizione più importanti attivati durante l'aging cellulare.

In particolare, il gene caratteristico dell'invecchiamento p16 è coinvolto nel pathway p16/Rb.

In condizione fisiologiche il fattore ribosomiale Rb viene fosforilato dalle chinasi-ciclina dipendente (Cdk2 /4) (Fig.7), le quali permettono il legame con il fattore di trascrizione E2F; una volta avvenuto, la cellula è pronta per il passaggio dalla fase G1 alla fase S (6)

In condizioni di aging e alterata omeostasi (aumento di radicali ROS) la cellula aumenta l'espressione del gene p16, tramite le chinasi p38 e ERK1/2. Questo gene è capace di bloccare la fosforilazione della proteina Rb e le reazioni a valle che permettono un corretto svolgimento del ciclo cellulare.

Altro gene fondamentale per l'innescò della senescenza cellulare è il gene oncosoppressore p53, attivato in caso di danno al DNA o di aumentato stress ossidativo.

In particolare, questo gene codifica per la proteina TP 53 fattore di trascrizione coinvolto in molteplici meccanismi molecolari riguardanti il ciclo cellulare, l'apoptosi, la senescenza.

Questi meccanismi cellulari sono stimolati, come detto in precedenza, in situazione di danno genomico. Per le sue molteplici funzioni protettive, p53 è chiamato il "gene guardiano del genoma"(14).

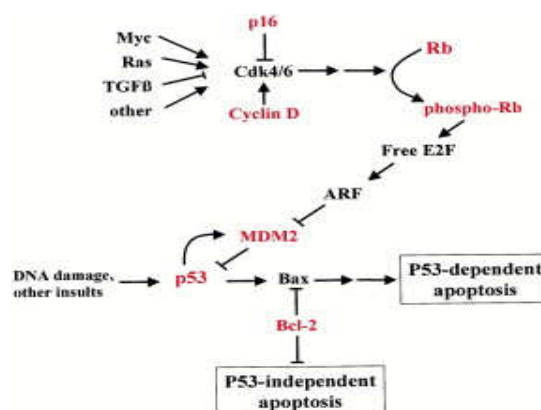


Figura 7 Pathways di p16 e p53 interconnessi fra di loro che mediano

Esso regolando importanti meccanismi di azione che riguardano la stabilità del genoma e la staminalità cellulare, possiede importanti funzioni antineoplastiche (15).

La rete di segnali e di pathways dove p53 è coinvolto è molto ampia. A livello di interazione su modelli animali è stato visto come topi knock out per p53 e trattati con inibitori di mTOR non erano soggetti allo sviluppo di fenomeni metastatici. Questo suggeriva che l'effetto di p53 anti cancro si attuava inibendo il segnale mTOR(15).

In molti tumori cutanei o lesioni cancerose il gene p53 risulta mutato, inoltre differenti tipi di mutazione di TP53 sono stati rilevati in differenti tumori cutanei (16,17).

La funzione fondamentale di p53 nel prevenire la formazione e la trasformazione tumorale deriva dalla sua funzione e dalle interazioni con altri fattori di crescita coinvolti nella proliferazione cellulare. La letteratura scientifica supporta le innumerevoli interazioni con noti agenti oncogeni come RAS, proteine Rb, p16, la sovra espressione di Snail (17, 18,19)

In condizioni fisiologiche p53 ha un'emivita molto breve, una volta portato nel nucleo viene degradato. In condizioni nocive per l'ambiente cellulare si attivano una serie di chinasi (p38, ATM e ATR a seconda della causa e del pathway) che modificano il gene fosforilandolo.

Una volta attivato, p53 attiva a sua volta la trascrizione di geni specifici coinvolti nei fenomeni di apoptosi e di senescenza (17,18,19).

Infine l'espressione del gene p21 indotto durante la senescenza cellulare, codifica per una proteina chiave che controlla numerose chinasi coinvolte nelle fasi cellulari (Fig. 8).

Questo gene è un inibitore delle cicline chinasi dipendenti, fra cui, come target, risultano anche le CDK2/4, che possono essere attivate anche interagendo con il p53 fosforilato.

In quest'ultimo l'attivazione e il mancato rispetto dell'omeostasi sono causati dalla produzione di radicali liberi che agiscono come mediatori. Dal punto di vista biochimico e metabolico la cellula senescente acquisisce diverse caratteristiche aging-correlate.

Gli studi effettuati su colture di fibroblasti di diversa natura, hanno dimostrato come i fibroblasti di pazienti anziani erano morfologicamente simili ai fibroblasti invecchiati in vitro. La forma risultava non più quella caratteristica affusolata, ma appiattita con abbondante volume occupato dal citoplasma.

A livello metabolico, secernono anche tipiche molecole di varia natura: citochine, (IL-6, IL1alfa, TNFalfa,etc.) agglomerati di proteine ossidate o carbonilate. Questo profilo metabolico è definito dalla letteratura come SASP profilo fenotipico secretorio indotto dalla senescenza (20,21).

Questo fenotipo senescente viene attivato e riscontrato anche nello sviluppo di tumori, infatti, queste cellule senescenti possono interagire tramite i loro metaboliti e fattori biochimici e possono

fungere da veri e propri ligandi che attivano differenti risposte cellulari a seconda del distretto in cui si trovano (22)

Questa reazione escretoria indotta dalla senescenza ha molte implicazioni nella ricerca oncologica, infatti queste sostanze escrete permettono alle cellule di sopravvivere a determinati trattamenti farmacologici mirati. (22).

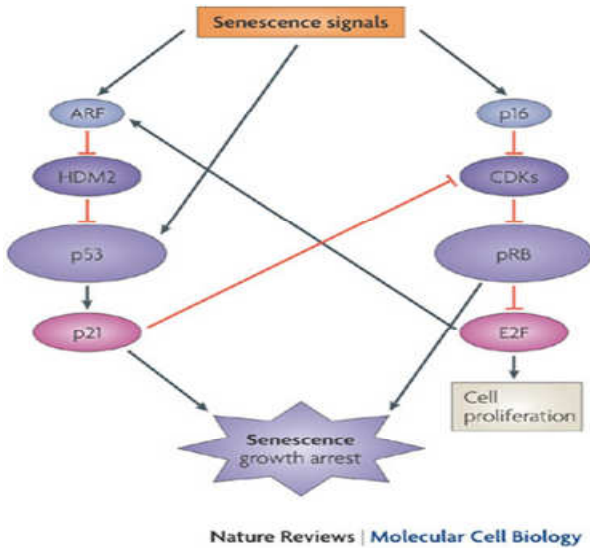


Figura 8 Segnali coinvolti nel fenomeno di senescenza cellulare

INVECCHIAMENTO ESTRINSECO (FOTOINVECCHIAMENTO)



Figura 9 Inestetismi cutanei causati da fotoinvecchiamento

Il fenotipo senescente si può riscontrare anche in cellule che non abbiano raggiunto la normale scadenza delle suddivisioni cellulari.

I fenomeni cellulari a livello metabolico e molecolare in alcuni casi sono gli stessi; quello che cambia è la causa, non più imputabile ad un normale passare del tempo e deteriorarsi delle funzioni metaboliche e di equilibrio omeostatiche, ma ad un evento o ad un agente esterno.

Questo agente esogeno amplifica e attiva dei meccanismi molecolari e biochimici che turbano il normale equilibrio intracellulare.

La cellula, in questa condizione di immediata tossicità sub-letale, risponde attivando dei meccanismi di difesa che contengono segnali e fattori di trascrizione tipici dell'invecchiamento.

Questi fattori esterni o stressanti che modulano l'invecchiamento estrinseco possono essere di varia natura: malnutrizione e scorretta dieta, fumo, radiazione UV, infrarosso, inquinamento etc.

Uno dei fattori con un effetto maggiore per l'invecchiamento cutaneo è la radiazione UV, suddivisa nelle due regioni UVB e UVA.

Questo tipo di invecchiamento è chiamato fotoinvecchiamento o photo aging

Ormai da molto tempo si conoscono gli effetti della radiazione UV sul nostro apparato tegumentario: gli studi in campo dermatologico attribuiscono alla radiazione UV, in particolare UVA, la causa dell'80% delle rughe e degli inestetismi cutanei (23,24)

La pelle fotoinvecchiata appare a livello morfologico molto diversa rispetto ad una pelle affetta da crono-aging. (25)

Essa appare lassa, con una superficie rugosa e presenta pigmentazioni irregolari (Fig.9).

Le rughe profonde e accentuate sono dovute ad un rimodellamento strutturale della matrice del derma. Infatti, come tratto distintivo la pelle, foto-invecchiata ha un accumulo di materiale amorfo contenente elastina e, a causa di questi prodotti, si danneggia lo scaffold fibrillare composto da elastina e collagene.(26,25)

Il livello di foto-danno negli strati più profondi varia a seconda tipo di pelle, (più sensibile negli individui di carnagione chiara) e alla dose della radiazione UV che si riceve (26)

Questo accumulo a livello esteriore aumenta lo spessore cutaneo della pelle, altro carattere rilevabile in una pelle sottoposta a radiazione UV.(25)

Sebbene il foto-aging e l'invecchiamento cronologico presentino degli aspetti esteriori differenti, condividono i meccanismi molecolari e biochimici, se si paragonano alla cute di un soggetto giovane.

La causa principale del foto-aging, come si intuisce, è la radiazione UV.

Questo tipo di radiazione rappresenta meno del 5% di tutta la luce solare che penetra in atmosfera. Tale radiazione UV si suddivide in: UVA, UVB e UVC.

- U.V-A (98%) : lunghezza d'onda: 315 - 400 nm.

Vista la loro elevata lunghezza d'onda sono in grado di penetrare in profondità nel derma, eccitando e danneggiando collagene ed elastina, provocando eritemi e danneggiando la pelle (Fig.10).

- U.V-B (2%): lunghezza d'onda: 280 - 320 nm

I raggi U.V-B, hanno una capacità di penetrazione inferiore e non riescono a superare le strutture più superficiali della pelle (Fig.10). Gli effetti deleteri sono comunque importanti poiché i raggi U.V-B sono in grado di alterare il materiale genetico contenuto nel DNA, aumentando il rischio di comparsa di tumori cutanei. La radiazione UV-B è molto più efficace della radiazione UV-A nel provocare l'eritema.

- U.V-C: lunghezza d'onda: 100 - 280 nm

I raggi UV-C sono particolarmente reattivi e nocivi per la salute, ma l'ossigeno biatomico dell'ozonosfera per formare e scindere l'ozono, in questo modo si schermano i raggi a bassa lunghezza d'onda.

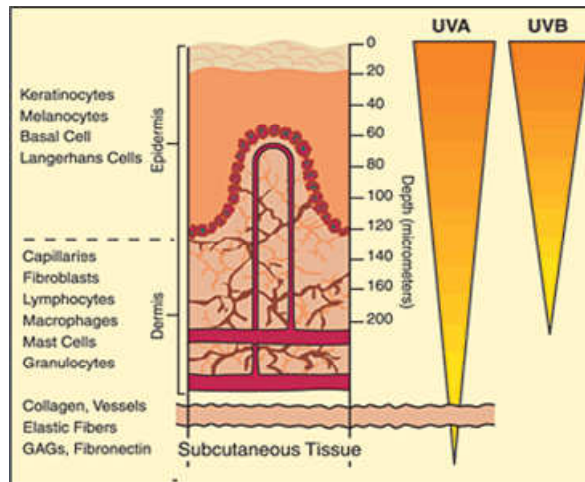


Figura 10 Penetratazione delle radiazioni UVA e UVB

EFFETTO UVB SULLA PELLE

È la radiazione, fra quelle eccitanti la cute, a lunghezza d'onda più bassa (280-320 nm), quindi la più energetica e capace di avere effetti biochimici e molecolari più deleteri. Questo tipo di radiazione colpisce gli strati più superficiali sensibili, come lo strato cheratinico composto da cheratinociti, film idrolipidici e complessi proteici che assorbono maggiormente la radiazione.

Sono la causa scatenante di lesioni e patologie che affliggono l'apparato cutaneo come scottature, eritemi solari (Fig. 11), cheratosi attiniche, carcinomi basocellulari e carcinomi spinocellulari etc..

L'eritema presenta una zona con forte arrossamento e stimolo nocicettivo aumentato, accompagnata da infiammazione.



Figura 11 Evidente eritema cutaneo dovuto ad una eccessiva esposizione solare

Il carcinoma basocellulare (Fig. 12), noto anche come epitelioma basocellulare o basalioma, è un tumore maligno della pelle, che affligge le cellule basali dell'epidermide.

Si manifesta con un segno sulla pelle visibile a occhio nudo e con particolari caratteristiche.



Figura 12 Carcinoma basocellulare

Il carcinoma spinocellulare è un tumore maligno della pelle, che colpisce le cellule squamose dell'epidermide (Fig.13). La sua insorgenza determina la comparsa di una ferita cutanea, con un'elevata variabilità di manifestazioni a livello del paziente.



Figura 13 Carcinoma spinocellulare

Questi tipi di tumori cutanei sono fortemente correlati ai danni indotti da esposizione a raggi UVB, soprattutto per le loro conseguenze a livello di mutazioni genomiche.

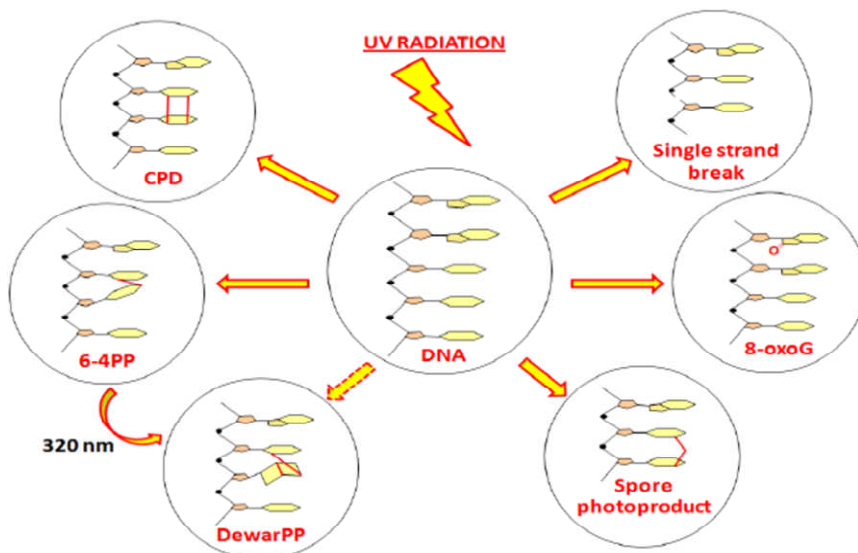


Figura 14 Possibili fotoaddotti del DNA dopo eccitazione con radiazione UV.

Gli UVB, infatti, eccitano selettivamente la sequenza nucleotidica composta dalle basi azotate pirimidiniche e puriniche: causando la fusione tra le basi pirimidiniche, come ciclo butano dimeri pirimidina e 6-4 pirimidina pirimidone fotoprodotto (PPD)(Fig. 14).

Questi fotoaddotti e la loro induzione dipendono dalla lunghezza d'onda della radiazione e la loro comparsa è favorita dal picco di assorbimento che il DNA presenta a 260 nm (27)

Il fotoaddotto CPD è responsabile dell'attivazione di diversi pathway cellulari coinvolti in meccanismi di tipo infiammatorio e pro-ossidante.

Le cellule eucariotiche, come i fibroblasti, hanno come meccanismo difensivo complessi proteici capaci di individuare e rimuovere queste lesioni (NER, nucleotide excision repair) nel DNA. Il meccanismo di azione è complesso e prevede una concertazione organica fra le varie componenti del complesso (6).

In alternativa enzimi litici chiamati fotoliasi, che utilizzando l'energia assorbita dalla luce blu, la utilizzano per rimuovere i siti con CPD. (30)

Alcuni studi affermano che la dose di UVB sufficiente per far apparire un lieve comparsa di eritema cutaneo coincide, a livello molecolare, con la presenza di 10^5 CPD.(30)

Altri studi condotti su topi transgenici hanno rilevato come la disattivazione di sistemi di difesa specifici contro il danno ossidativo aumentino la sensibilità al fenomeno edematoso e eritematoso(28)

A livello biochimico si attivano dei segnali molecolari, che rilasciano citochine ad effetto pro infiammatorio (IL6, IL10 TNF alfa). Questa regolazione è stata dimostrata essere fortemente connessa alla comparsa di CPD a livello genomico.

Si è osservato come l'attivazione di meccanismi di riparo contro questi fotoaddotti abbassi il rilascio di tali segnali proinfiammatori .

Oltre all'effetto visivo indesiderato della scottatura, la presenza di mutazioni CPD, ha un effetto positivo sull'aumento della pigmentazione cutanea, aumentando la via della melanogenesi. Questo processo è dovuto ad un meccanismo indiretto, infatti i complessi proteici di riparo contro le CPD favoriscono la melanogenesi.

Questo risultato esteticamente positivo è controbilanciato dalla soppressione concomitante dell'oncosoppressore p53, effetto negativo a livello di prevenzione tumorale. (30)

La radiazione UVB, oltre a partecipare alla pigmentazione diretta della pelle insieme alla radiazione UVA, attiva sempre in concomitanza con la radiazione meno energetica la formazione di specie radicaliche dell'ossigeno ROS (29, 30).

I ROS, a loro volta, contribuiscono alla formazione di altri metaboliti intermedi come endoperossidasi a residui zwitterionici, aromatici e solforati.

Questi ultimi attivano a loro volta la formazione di radicali e contribuiscono a alterare la struttura secondaria proteica tramite fenomeni di cross linking proteico (ossidazione con rottura di anelli epossidici). (29, 31)

A livello del DNA, i ROS sono in grado di reagire e denaturarla struttura del DNA portando a mutazioni geniche e fenomeni di frammentazione.

All'origine della produzione di ROS-fotoindotti ci sono due modi differenti di dissipare l'energia del DNA e delle proteine

Queste due molecole biologiche, una volta assorbite le radiazioni UV, subiscono processi fotobiologici ben definiti che descriveremo successivamente.

EFFETTO UVA SULLA PELLE

La radiazione con una lunghezza d'onda elevata (315-400nm) e con effetto energizzante minore, rappresenta il 95% della radiazione UV totale.

L'UVA si divide a sua volta in due sottogruppi: UVA corti e UVA lunghi. Essa è assorbita dagli strati più profondi della cute e ha un alto potere penetrante, arrivando ad eccitare gli strati più profondi del derma. Target principale ,come anche per gli UVB, sono le proteine, intese come le loro sequenze amminoacidiche. A livello fenotipico cutaneo, contribuiscono anche loro alla formazione di eritemi e fenomeni infiammatori grazie all'attivazione di vari pathways infiammatori e pro-ossidanti.

Essendo meno energizzante rispetto agli UVB, l'UVA non riesce ad eccitare e a provocare direttamente effetti molecolari quali la rottura o la comparsa di lesioni genomiche come quelle tipiche della radiazione UVB (CPD, 6-4PP, etc.), quindi non partecipano in maniera rilevante alle scottature solari.

Da non sottovalutare però l'effetto che la radiazione UVA ha a lungo termine sul sistema cutaneo e sugli strati più profondi. In dosi ripetute, infatti, la radiazione UVA è la principale artefice del fotoinvecchiamento (photoaging o fotoaging).

Le radiazioni UVA modificano e attivano meccanismi degradativi, disordini biochimici e molecolari che nel tempo portano alla comparsa di inestetismi cutanei: rughe, perdita di compattezza cutanea, lassità della cute, fino a manifestazioni neoplastiche come il melanoma cutaneo.

Quest'ultimo è un tumore del derma che interessa i melanociti, cellule deputate alla pigmentazione della cute.

I melanomi cutanei (Fig. 15) originano su una cute integra o da nevi presenti fin dalla nascita o dalla prima infanzia (congeniti) o che compaiono durante il corso della vita (acquisiti).

Dal punto di vista clinico si distinguono 4 tipi di melanoma cutaneo: melanoma a diffusione superficiale (il più comune, rappresenta circa 70% di tutti i melanomi cutanei), lentigo maligna melanoma, melanoma lentiginoso acrale e melanoma nodulare (il più aggressivo, rappresenta circa il 10-15% dei melanomi cutanei).



Figura 15 Melanoma cutaneo

La causa principale dei melanomi è la radiazione UV, intesa come regione UVA e UVB.

Gli UVA, però, provocano danni alle molecole target fondamentali (DNA e proteine), innescando meccanismi infiammatori e di produzione di ROS.

La radiazione UVA, infatti, è capace di inattivare o attivare specifici meccanismi biochimici fondamentali nel lungo periodo per la formazione della lesione cancerosa.

Una delle vie comprende l'aumento del contenuto delle specie reattive dell'ossigeno ROS.

Tramite meccanismi fotobiologici questo innesco di produzione e di propagazione di specie radicaliche inizia nei compartimenti più esterni della membrana cellulare, colpendo specifiche proteine UVA sensibili che poi attiveranno dei pathways UVA indotti in maniera diretta o indiretta. Questi ultimi arriveranno a compromettere ed a mutare il codice genetico interno. Uno di questi esempi è la tipica presenza della 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua). Questa base alterata è il principale marker di stress ossidativo a livello genomico (32).

I metaboliti e le molecole reattive e che generano alterazioni e rotture nella struttura del DNA (8-oxoGua) sono riconducibili a due ROS ben specifici: il radicale perossile ($\cdot\text{OH}$) e l'ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$).

Queste due molecole sono altamente reattive e capaci di reagire con l'acido desossiribonucleico e indurre mutazioni strutturali. Oltre alla 8-oxoGua, il DNA sottoposto a radiazione UVA presenta: rotture a singolo filamento (SSB), rotture più profonde che riguardano ambedue i filamenti (DSB) e l'ossidazione di basi pirimidiniche. Queste ultime tre lesioni genomiche sono indotte in misura minore rispetto alla 8-oxoGua (33).

Questo prodotto di degradazione è stato collegato all'effetto indiretto dei raggi UVA, infatti si è visto come il radicale perossile e l'ossigeno singoletto siano i mediatori e le principali cause della formazione di 8-oxoGua nella sequenza nucleotidica.

In alcuni esperimenti fotobiologici si è visto come molecole sensibili alla radiazione UV quali chinoni, porfirine e flavine, attraverso meccanismi di fotosensitizzazione, producessero la formazione di 8-oxoGua. (32)

Tecniche specifiche per rilevare la presenza di danni e mutazioni nel DNA nucleare come il saggio COMET in ambiente alcalino, hanno consentito di stabilire interessanti correlazioni tra mutazioni e dose di radiazioni UVA.

Monociti trattati con UVA e sottoposti al suddetto saggio, presentavano rotture a singolo filamento tanto più alte quanto più nei filamenti si presentavano pirimidine e purine ossidate. (40)

Le rotture di tipo DSB (double strand break) presentavano una frequenza 25 volte minore rispetto alle lesioni a singolo filamento SSB (single strand break).

In compenso anche l'ossigeno singoletto, al contrario del radicale idrossile riesce a convertire direttamente la base guanina in 8-oxo-guanina. Questo meccanismo che coinvolge processi di fotosensitizzazione II attribuisce alla specie non radicalica l'elevato potere ossidante nei confronti del genoma, esaltando così la genotossicità dell'ossidazione UVA indotta.

In aggiunta a questereazioni indirette che inficiano la corretta replicazione e stabilità del genoma, la radiazione UVA è stata anche associata, in alcuni studi, ad effetti mutagenici diretti nel DNA.

Recenti studi condotti con biopsie cutanee di pazienti con diversi fototipi II e IV, quindi con diversa fotosensibilità, dimostrano il contributo diretto della radiazione UVA nella formazione di dimeri di pirimidine come le già citate CPDs (34)

Nello specifico i dati dimostravano come la maggior parte dei CPD riguardasse i dimeri TT in entrambe le lunghezze d'onda. Anzi, i campioni sottoposti ad UVA presentavano percentuali di TT CPDs molto più elevate rispetto a quelle indotte tramite UVB. (34)

Altri studi precedenti avevano rivelato come colture cellulari sottoposte ad UVA rilevassero con frequenza maggiore dimeri di pirimidine nel DNA rispetto alle normali mutazioni UVA-indotte come la 8-oxoGua.

La radiazione UVA coinvolge e interferisce anche in maniera diretta con il normale meccanismo di riparo genomico presente nei mammiferi, il complesso NER (Fig 16).

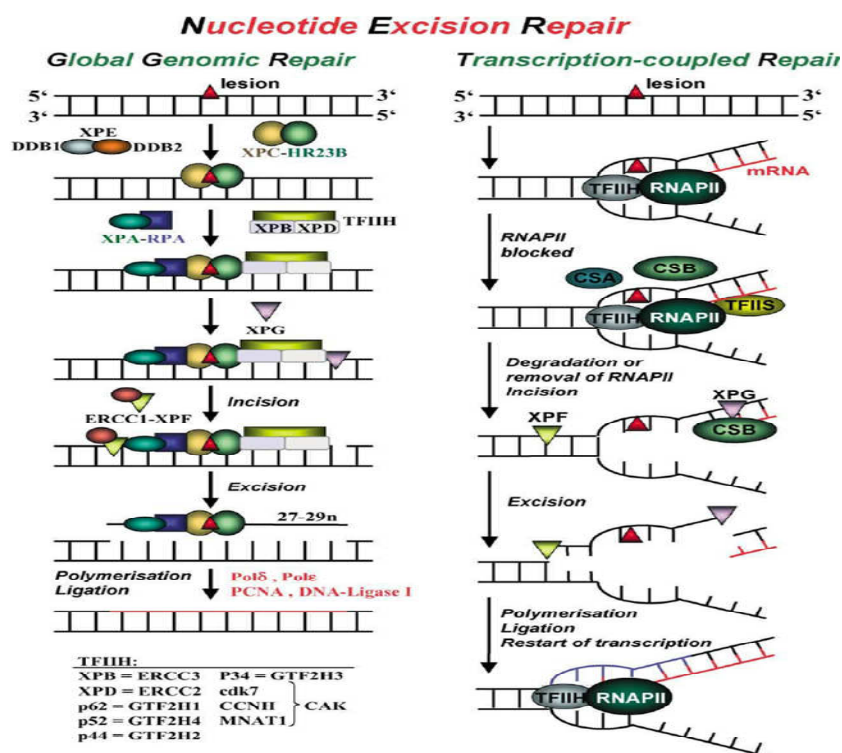


Figura 16 Diversi processazioni del sistema NER nell' eliminare la mutazione genomica

Analizzando gli studi condotti in vitro su melanociti e cellule di melanoma, si vedeva che l'effetto di una massiccia dose di UVA (100kJ/m²) provocava danni genomici, come le già citate CPDs, che venivano riparate in maniera differente dalle due linee cellulari

Nello specifico i melanociti wild type, dopo l'irradiazione UVA, erano in grado di riparare il 50 % dei dimeri di pirimidina già dopo 1h e dopo 4h le lesioni genomiche risultavano totalmente riparate. Nelle colture di melanoma la maggior parte dei meccanismi di riparo si attiva dopo 24 h, ma dopo ulteriori 24 h di tempo permanevano ancora il 40% delle lesioni CPDs (34).

La causa a livello molecolare era dovuta ai tre trascritti principali coinvolti nella riparazione molecolare svolta dal NER: XPC, DDB1, DDB2.

Questi trascritti sono coinvolti nel processo di riparazione globale del genoma chiamato GGR, global genome repair (Fig. 16). Essi sono già stati studiati per comprendere i meccanismi molecolari sensibili agli UVA in soggetti con malattie genetiche rare, quali la Xeroderma Pigmentosa, le mutazioni trovate in questi trascritti incrementavano notevolmente l'incidenza di melanoma e sensibilità agli UV. (34)

In questo studio si analizzavano, inoltre, i livelli di espressione dopo il danno UVA indotto; i picchi di trascrizione erano alti dopo 4 e 48 h dal fotodanno, per DDB1 e DDB2 nei melanociti e nelle cellule di melanoma. L'unico a subire una variazione di trascrizione era XPC-1 che ha 48h risultava notevolmente diminuito. Questo risultato attribuiva la causa del ritardo nella riparazione delle mutazioni all'espressione di XPC.

Altro scopo di questo studio era quello di correlare l'attività del complesso di riparazione all'espressione di p53. A livello di trascrizione, dopo il trattamento con UVA, il meccanismo GGR di riparo non risentiva della modulazione e dello stato di trascrizione di p53.

Si concludeva da questi interessanti risultati che la radiazione UVA induceva un ritardo evidente nei meccanismi protettivi e di riparo delle lesioni CPDs, mediante un pathway indipendente da p53.

Il gene p53 rimane però sempre un master gene fondamentale nella comprensione dei vari tipi di tumori. I dati odierni consolidati confermano che mutazioni a carico di p53 si riscontrano nella metà delle manifestazioni tumorali umane. Le percentuali variano a seconda dei tumori: nella prostata si riscontra nel 10% dei casi, nel polmone e nel colon si arriva al 50% fino ad arrivare ad un massimo del 95% di tumori ovarici.

Il melanoma cutaneo in questione è stato visto essere uno dei pochi tumori che presenta un carico di mutazioni nel gene p53 minimo, infatti si manifesta solo nel 10 -20% dei melanomi. (35)

Questo è da attribuire alle differenti vie di inibizione del suddetto gene oncosoppressore.

Talvolta questo gene non è influenzato direttamente con lesioni genomiche o altri meccanismi di instabilità genomica riguardanti le regioni che coinvolgono la sua trascrizione e traduzione, ma talvolta è il bersaglio di altri fattori e molecole segnale che riescono a silenziarlo.

Esempio principale è il melanoma cutaneo, dove si ritrovano un'alta sovraespressione di specifici soppressori di p53 come MDM2 e MDM4.

Questi due geni sono altamente omologhi fra loro, riescono a legare l'estremità N-terminale di p53 bloccandone l'espressione; in aggiunta MDM2 è anche capace di fungere da ubiquitina ligasi marcando p53 e indirizzandolo verso una degradazione tramite proteosoma.(35)

Nella maggior parte dei melanomi si trova un'alta percentuale di espressione dei due geni p53-soppressori (35).

Queste reazioni UVA-indotte riguardano nel dettaglio gli effetti molecolari sul genoma, le mutazioni e i segnali intracellulari e nucleari capaci di essere modulati e attivati per ottenere neoplasie maligne.

UVA E RUGHE

Altro effetto di minore gravità per l'uomo, ma di sicuro interesse per la ricerca farmaceutica e dermocosmetica, è il contributo degli UVA alla comparsa di fenomeni degradativi e di rimodellamento che colpiscono il derma.

Questi processi negli strati più profondi della cute originano a livello del derma: rughe, lassità e elastosi dell'apparato tegumentario in toto.

Queste conseguenze rientrano tutte nel campo del fotoinvecchiamento. La caratteristica principale di una pelle fotoinvecchiata è la comparsa delle rughe.

La ruga dal punto di vista istologico è un accumulo di elastina e collagene, disposte in fasci di fibre degradate e disordinate non più capaci di mantenere la giusta elasticità agli strati più profondi della cute (7).

Il meccanismo biochimico e biomeccanico per cui si forma questa depressione profonda nella cute è ancora oggi oggetto di studio (Fig. 17).

È stato appurato da numerosi studi che la comparsa delle rughe e di inestetismi cutanei quali perdita di tono e cute lassa dipende anche dai distretti corporei presi in considerazione.

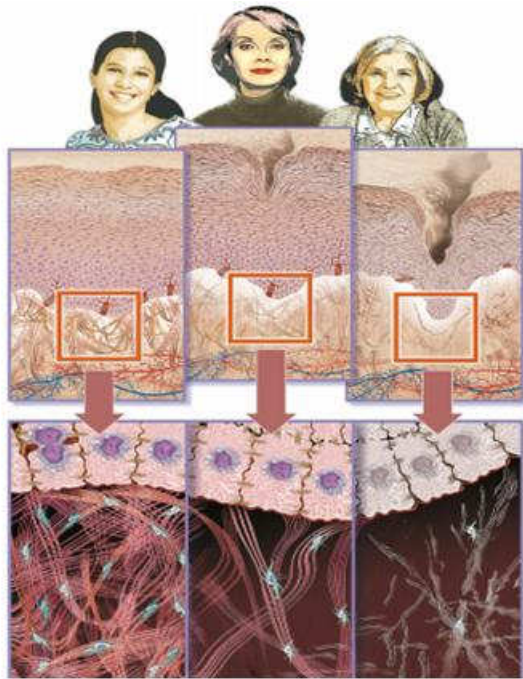


Figura 17 Differenti stadi di formazione della ruga cutanea, dovuta ad un rimodellamento delle fibre di collagene ed elastina. Questo rimodellamento ne causa una depressione negli strati cutanei superiori, dovuti a fenomeni di invecchiamento cronologico e foto invecchiamento.

A livello biomeccanico la pelle con la presenza di rughe presenta dei parametri di elasticità (U_r/U_f) e spessore alterati. In un recente studio si osservava che le misure di spessore e elasticità di cute proveniente da diversi distretti corporei variavano notevolmente.

In questo studio a 170 volontari venivano analizzati, tramite appositi macchinari (Cutometer SEM 474, Courage and Khazaka), lo spessore e l'elasticità della cute.

Si ricavavano interessanti dati: la pelle proveniente dal contorno occhi presentava un aumentato spessore della cute con una ridotta elasticità mentre la cute posteriore dell'avambraccio era più elastica e meno spessa. Tale differenza era legata alla diversa foto-esposizione della zona prese in considerazione: la cute del viso e del contorno occhi era molto più soggetta alla radiazione UV rispetto a quella dell'avambraccio. Se ne deduceva un primo effetto biomeccanico foto indotto: la perdita di elasticità e l'aumento dello spessore. (7)

Questa caratteristica era stata notata in un altro studio su modello murino in cui si irradiava cronicamente per 8 settimane la cute di topi con dosi sub-eritematose; poi si procedeva alla misura in maniera non invasiva del potere elastico della cute.

Il risultato era una netta diminuzione della proprietà elastica della cute con entrambe le lunghezze d'onda UV. (36)

Questi ultimi studi confermano di nuovo come il problema dell'inetetismo cutaneo sia ascrivibile specificatamente alla biomeccanica della pelle intesa come elasticità.

Sappiamo infatti dagli studi effettuati in letteratura che la ruga prodotta per effetto della radiazione UVA è una depressione più marcata a livello biomeccanico e le regioni più foto-esposte sono regioni con una minore elasticità.

Per meglio spiegare questo effetto si deve capire dove la radiazione UVA ha il suo massimo effetto e su quali target ha la sua massima efficacia.

I raggi UVA, come detto precedentemente, sono una radiazione più penetrante che agisce nello strato dermico della cute. In questo strato troviamo i fibroblasti immersi in una matrice extracellulare composta da proteine fondamentali collagene e elastina. Queste sono disposte in fasci ordinati e orientati che danno compattezza e svolgono ruolo di sostegno allo strato epidermico (funzione di scaffold). In modelli murini; è stata analizzata la struttura e la composizione dermica di arti cronicamente irradiati nei quali si riscontravano danni a livello strutturale(37).

In particolare l'analisi strutturale in microscopia elettronica a scansione (SEM) indicava alterazioni importanti dell'orientamento delle fibre elastiche dopo radiazione UVA. Di fatto i fasci non risultavano più in tensione ma risultano deformati, dall'andamento tortuoso e sfilacciato.(37)

Questo effetto sullo scaffold dei fasci di fibre elastiche è dovuto all'attivazione di enzimi degradativi come l'elastasi dermica o elastase, che si trova a stretto contatto con la ECM e i fibroblasti.

Misurando l'attività dell'elastasi nei campioni dermici emerge come l'enzima sia significativamente aumentato nei campioni irradiati.

La sua attivazione allo stimolo UVA è molto specifica nei campioni murini: dopo varie settimane di trattamento con UVA solo l'elastase aumenta in maniera significativa la sua espressione rispetto alle attività di altre metallo proteasi come le collagenasi I e IV (37).

Parallelamente, per correlare il danno cutaneo dell'enzima, sono stati misurati in vivo i valori di elasticità (Uv) e viscosità cutanea (Ue), e il risultato conferma che il rapporto fra Uv/Ue diminuiva.

A fronte di questi dati l'elastase dermica ha un ruolo determinante nella comparsa di rughe e di cute meno tonica (37).

Studi ulteriori hanno caratterizzato l'elastase dermica indotta dai fibroblasti, dal punto di vista strutturale, come una metallo proteasi dal nome Neprilisina.

Il meccanismo di attivazione enzimatica può essere dovuto al momentaneo rilascio di fattori pro-infiammatori come citochine IL6, GM-CSF, IL8, TNF-alfa a livello epidermico.

Studi condotti su cheratinociti dimostrano come la radiazione UVA è capace di stimolare i livelli di questi fattori proinfiammatori due dei quali in particolare: GM-CSF e IL-6. Il primo soprattutto ha

un ruolo fondamentale nello stimolare l'attività della Neprilisina, che a sua volta degraderà le fibre elastiche. (38)

Oltre a questo enzima ci sono studi di comparazione tra biopsie cutanee foto-trattate e di controllo che a livello istologico mostrano e confermano un notevole effetto degradativo degli UVA.

Nello specifico la radiazione UVA aumenta i livelli del lisozima, enzima noto per alterare la struttura e tagliare in siti specifici le proteine elastiche che danno sostegno allo strato dermico. Si nota infatti con specifiche colorazioni istochimiche come nella matrice elastica dei campioni UVA esposti, a dosi ripetute nel tempo e sub-eritematose, la concentrazione di lisozima sia molto maggiore vicino alle fasce elastiche del derma.

Non si conosce quale sia la vera causa, se sia dovuta al lisozima rilasciato dai macrofagi, che durante il fotodanno riesce ad ancorarsi in siti specifici di proteine elastiche rese disponibile dalla degradazione proteica UVA-indotta (39); o alternativamente in seguito ad un effetto diretto della radiazione UVA sulle fibre elastiche direttamente alterate e rese sensibili al lisozima (39).

La radiazione UVA espleta anche la sua azione dannosa inficiando e modulando l'espressione e l'attività di altri enzimi sempre facenti parte al gruppo delle metalloproteasi.

MMPS E UV

Le metallo proteasi sono classificate in cinque gruppi, che includono: le metalloproteinasi, serina, cisteina, treonina e aspartato proteinasi; la classe più rilevante è quella delle metalloproteinasi o metalloproteasi.

Le metalloproteasi (MMPs) sono una classe di enzimi, attive nel tessuto connettivo e secrete nella matrice extracellulare. Esse sono suddivise, in base alla loro processività e alla struttura dei domini catalitici: gelatinasi (MMP-2, MMP-9), collagenasi (MMP-1, MMP-8, MMP-13), stromelisine (MMP-3, MMP-10, MMP-12) e metalloproteasi di membrana (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP).

La metallo proteinasi MMP1 è una endopeptidasi zinco dipendente. Essa fa parte, insieme alle altre MMPs -8 -13, delle metallo proteasi dermospecifiche.

La MMP-1 o collagenasi interstiziale ha come suo target principale il collagene di tipo I, quello più abbondante nel derma e gioca un ruolo cruciale nella degradazione e degenerazione della sostanza amorfa (40). La MMP-3 ha anche un'affinità verso il collagene di tipo 3.

Il meccanismo degradativo della MMP1 inizia con il primo taglio delle fibre di collagene, per poi completare la completa degradazione con il supporto delle MMPs -2-9.

In colture di fibroblasti in vitro si è visto che la radiazione UV attiva l'espressione di diverse MMPs e non solo MMP-1; tuttavia questa però si è rivelata l'unica, che, inibita con specifici anticorpi, permetteva al collagene di rimanere integro (41).

La MMP-1 è quindi una delle principali artefici del rimodellamento e del processo degradativo della componente amorfa del derma.

Queste attività sono regolate da inibitori interni secreti per via endogena; questi sono piccole proteine a basso peso molecolare, chiamati Timps (inibitori delle metalloproteasi tessuto specifiche). Nel derma il rapporto Timps:MMPs è 1:1; Tale rapporto può variare a seconda delle condizioni in cui si trova la cute infatti, in una pelle invecchiata, la presenza degli inibitori diminuisce. La radiazione UVA influisce in maniera significativa permettendo un aumento delle MMPs. È stato visto che questo esacerba la situazione di invecchiamento cronologico in cui l'ammontare delle MMPs è maggiore ma non in misura notevole rispetto ai Timps (41).

Questo rapporto in condizioni fisiologiche è rispettato perché permette un regolare turn over proteico nel derma. (41)

Una volta illustrati e descritti il ruolo delle metalloproteasi nel fotoinvecchiamento e la loro funzione degradativa nel derma, si vogliono analizzare i fattori e i meccanismi a livello molecolare e biochimico che innescano l'attività delle metalloproteasi UVA indotte.

I meccanismi di attivazione delle MMPs sono meccanismi complessi che coinvolgono più effettori e che riguardano diversi pathway cellulari.

In primo luogo come effettore e innesco principale c'è la radiazione UV (sia UVA che UVB), che induce la trascrizione delle MMPs di cinque volte.

Il pathway di attivazione delle proteasi ha come causa scatenante gli UV e come molecole mediatori della cascata di segnali i ROS (42). Tramite questa via si attivano a cascata una serie di protein-chinasi che possono stimolare l'espressione delle proteasi.

Nello specifico i ROS stessi possono tagliare e attivare il sito catalitico delle MMPs. Il meccanismo agisce sulla struttura della proteinasi, stimolando così l'attività zimogena delle MMPs (41)

Tra questa cascata di segnali e fattori di trascrizione si individuano i più importanti e più studiati come: NF- κ B, AP-1 etcc (Fig. 18). (41)

A livello di messaggero le MMPs presentano un sito regolatorio nella regione 5' che contiene un elemento AP-1 regolato.

L'attivazione di AP-1 porta alla formazione di un dimero delle subunità Jun e Fos, capace di riconoscere e legare il sito regolatorio nel Gene MMPs e portare all'attivazione della loro espressione.

Il fattore AP-1 può essere attivato, a sua volta, da molti segnali o citochine infiammatorie coinvolti in diversi pathways. Fra questi pathways ci sono anche le vie TGF B e NFK-b dipendente.

Questi sistemi che modulano Jun e Fos si dividono fondamentalmente in tre classi di protein chinasi:

- Protein chinasi attivate durante la mitosi (MAPK)
- Chinasi regolate da stimoli extracellulari (ERKs)
- Protein chinasi indotte da stress cellulare (SAPK/JNKs)

La via di segnali più importante e studiata è sicuramente il pathway che coinvolge NF-kb. Questo fattore di trascrizione è fondamentale quando si parla di MMPs- UV e ROS indotte, infatti la trascrizione di NF-kb è attivata dalla presenza di ROS. Questo consente l'attivazione di un meccanismo coinvolto nella risposta infiammatoria della cellula in condizione di stress.(43)

Numerose ricerche riportano come l'induzione di NF-kbsia attivata da stimoli di natura pro-ossidante come accumulo di ROS o RNS e successive molecole segnali che inducono il rilascio della forma attiva di NF-kb, come IL-1, TNFalfa,iNOS etc.(43).

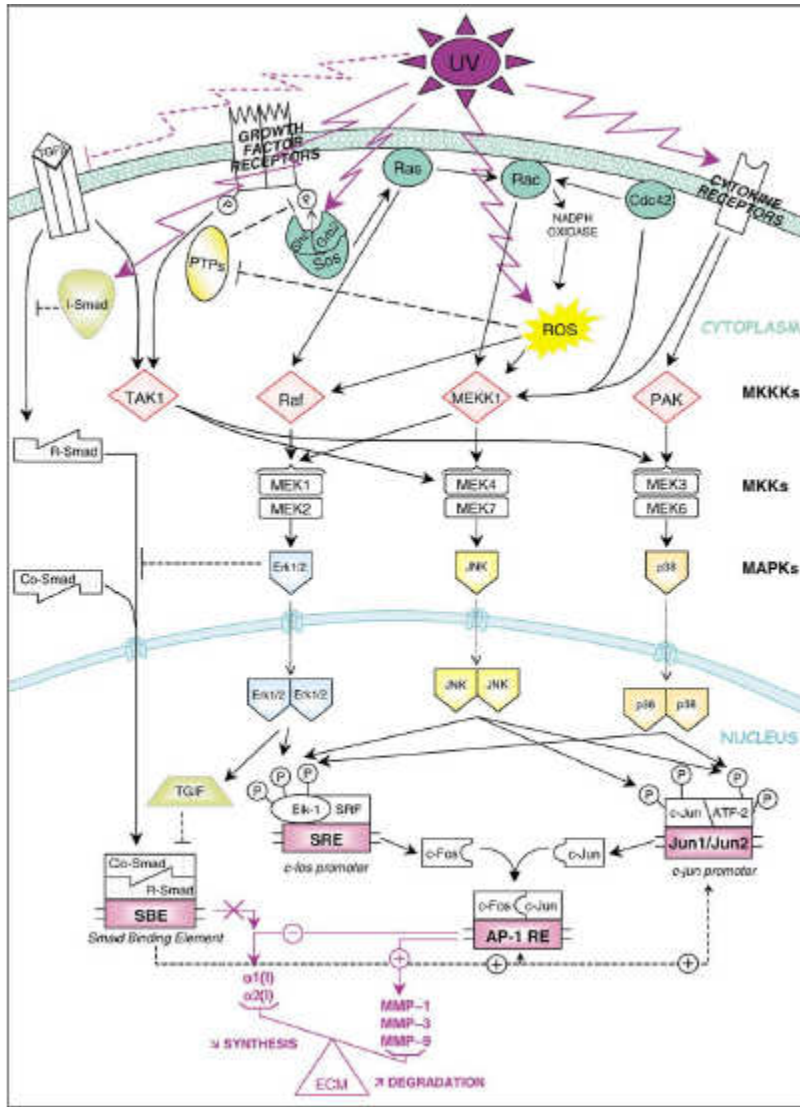


Figura 18 Pathways UV-dipendenti con conseguente attivazione di segnali intermedi come MKK, MAPKs, i quali attivano AP-1, un fattore di promozione delle MMPs.

STRESS OSSIDATIVO E INVECCHIAMENTO

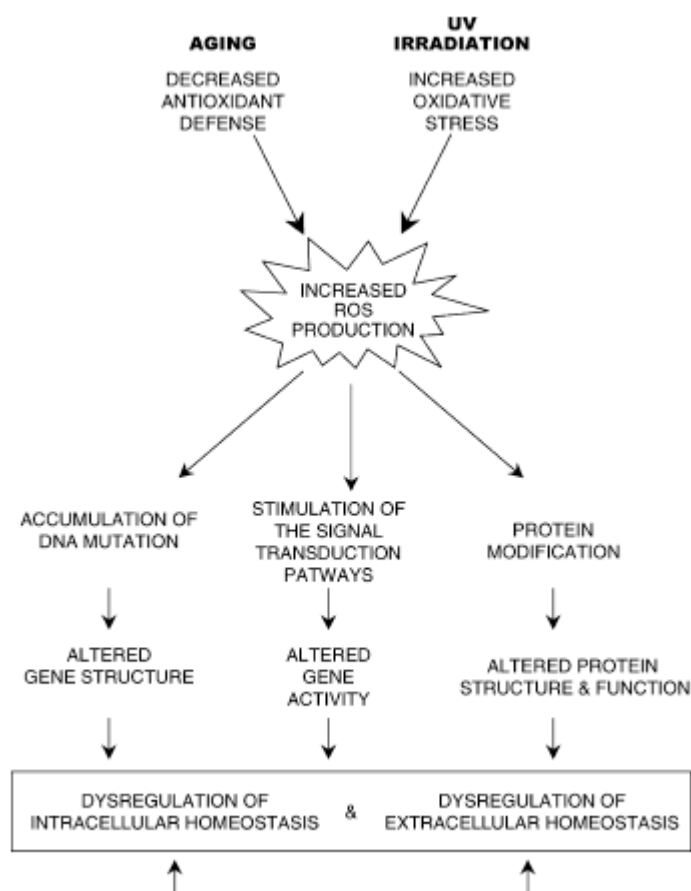


Figura 19 Schema degli effetti dell'incremento cellulare di ROS, provocati da fenomeni come l'invecchiamento e la radiazione UV

Lo stress ossidativo rappresenta un disequilibrio fra componenti pro-ossidanti e componenti antiossidanti della cellula, a favore dei primi. Tale disequilibrio determina un accumulo di specie reattive dell'ossigeno, in gran parte molecole radicali che ossia che presentano nell'orbitale più esterno un elettrone spaiato e, conseguentemente inclini a reagire con altre molecole ossidandole per ristabilire l'equilibrio elettronico. Questa caratteristica li rende molecole instabili e altamente reattive, producendo reazioni aspecifiche di idrogeno estrazione per stabilizzare la propria conformazione.

Questo meccanismo dà origine a nuove molecole instabili, innescando una reazione a catena che, se non viene arrestata in tempo, finisce col danneggiare le strutture cellulari (Fig. 19).

Nei sistemi biologici gran parte dei radicali sono, o si originano a partire da, specie reattive dell'ossigeno (ROS) nel loro complesso stati di riduzione incompleta di una molecola di

ossigeno, quali l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$), il perossido d'idrogeno (H_2O_2) e l'ossigeno singoletto. In presenza di metalli di transizione liberi (soprattutto ferro e rame) questi danno origine al radicale ossidrilico ($\cdot OH$), particolarmente tossico e responsabile della perossidazione lipidica.

Altre specie reattive comuni nei sistemi biologici sono quelle derivate dall'azoto e dall'ossigeno (RONS), come l'ossido nitrico e il perossinitrito ($NO, ONOO^{\cdot}$).

Le fonti principali di radicali liberi sono molteplici; esse possono essere di natura esogena: radiazione UV, raggi gamma, fumo di sigaretta, xenobiotici presenti nell'ambiente, stress, farmaci, stili di vita scorretti etc.

I radicali possono anche essere originati in maniera endogena nella cellula, infatti organelli come i mitocondri rappresentano una notevole fonte di produzione di ROS e altri organelli, quali perossisomi, sono fonti essi stessi di ROS e RNS. Il sistema immunitario stesso, per eradicare infezioni dovute a batteri e parassiti, usa come substrato i ROS per generare radicali più citotossici(44).

La generazione di ROS, nello strato cutaneo, è largamente indotta anche dalla radiazione UV, tramite il fenomeno della fotosensitizzazione.

FOTOSENSITIZZAZIONE

La fotosensitizzazione è una branca della fotobiologia che studia le interazioni della luce, composta da fotoni, sulla materia. La luce e i fotoni che la compongono, vengono assorbiti da una molecola chiamata fotosensitizzatore, provocando cambiamenti molecolari dal punto di vista elettronico.

Una volta che il fotosensitizzatore è eccitato dalla radiazione passa ad uno stato di energia superiore (Sen^*), da qui in poi può agire secondo due reazioni diverse:

Reazione di tipo I: Il fotosensitizzatore interagisce con un substrato sottraendo un elettrone, si formano così due specie radicaliche cationiche e anioniche (Fig. 20). In presenza di ossigeno queste reagiscono formando prodotti ossidati. Un'altra via può essere la reazione diretta del fotosensitizzatore radicalico con l'ossigeno atmosferico, dando luogo alla comparsa dell'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$),

Reazione di tipo II: Il fotosensitizzatore eccitato reagisce direttamente con l'ossigeno atmosferico, portando alla formazione dell'ossigeno singoletto (1O_2) (Fig. 20).

Questo è uno stato eccitato dell'ossigeno molecolare che si forma quando l'energia assorbita dall'ossigeno attua un'inversione di spin di uno degli elettroni spaiati, accompagnata da uno spostamento in un diverso orbitale.

L'ossigeno singoletto a sua volta interagirà con il substrato vicino producendo molecole ossidate o altre specie radicaliche.

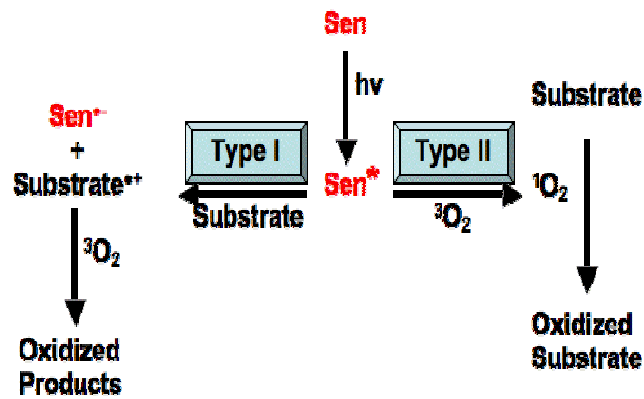


Figura 20 Schema che riporta le due diverse vie di fotosensibilizzazione della radiazione UV nei confronti di molecole organiche capace di assorbire la radiazione (Sensitizzatori, Sen).

Questi fenomeni ossido riduttivi tra le molecole biologiche circostanti e le specie radicaliche, come l'ossigeno singoletto, si originano da cambiamenti nello stato elettronico dell'ossigeno molecolare. La causa di questi cambiamenti è lo stato del fotosensitizzatore che, dopo aver assorbito i fotoni, passa da uno stato di bassa ad uno stato di alta energia.

Il decadimento di energia per ritornare allo stato fondamentale può avvenire tramite fenomeni di varia natura (fluorescenza, calore etc.) oppure tramite un fenomeno di incrocio di intersistema (IC), nel quale si ha un decadimento di energia a lento rilascio nel tempo (fosforescenza). In questo ultimo stato di eccitazione IC-derivato, l'ossigeno atmosferico (3O_2) assorbe l'energia per passare ad uno stato singolo eccitato (ossigeno singoletto) (Fig.21).

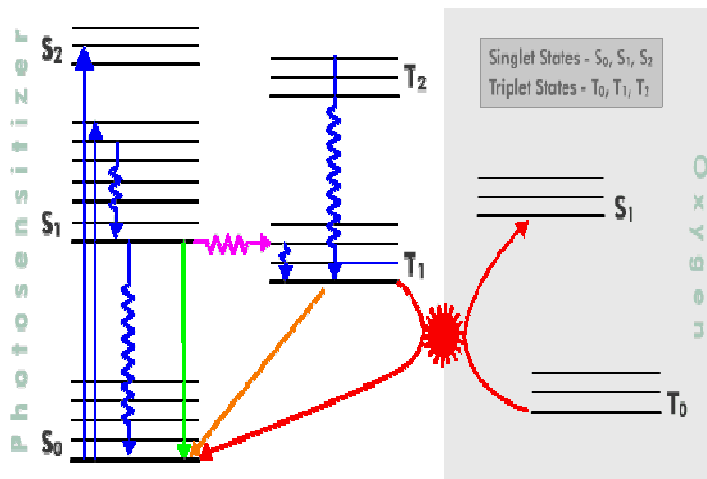


Figura 21 Diagramma di Jablonski, riguardante le transizioni elettroniche di un fotosensitizzatore dopo assorbimento di energia e il trasferimento di energia all'ossigeno con formazione di ossigeno singoletto. I livelli di elettronici più energetici sono nella parte superiore del grafico. Le transizioni riportate sono: Assorbimento energia da stato fondamentale S₀ a stati eccitati S₂ o S₃(frecce blu), Conversione interna di energia transizione di una molecola tra due stati aventi lo stesso spin (freccia blu ondulata), emissione di energia di eccitazione sottoforma di fotone (Fluorescenza, freccia verde), Incrocio di intersistema:transizione di una molecola tra stati elettronici con differenti spin (IC, freccia ondulata viola), fosforescenza emissione energia di eccitazione sottoforma di fotone, diversamente dalla fluorescenza l'emissione agli stati finali hanno differenti spin elettronici (freccia oro), trasferimento di energia (freccia rossa), l'energia si trasmette da un fotosensitizzatore ad un'altra molecola (Ossigeno, parte grigia destra).

La reazione di tipo II è molto favorita nei sistemi biologici rispetto a quella di tipo I; da ciò si capisce come la presenza di ossigeno singoletto sia favorita in ambienti cellulari in cui le condizioni sono favorevoli: bassa concentrazioni di substrato e alta tensione di ossigeno.

Questa è una delle spiegazioni di come la radiazione UV sia capace di produrre specie radicaliche e non radicaliche pro-ossidanti. Infatti nella nostra cute, come nelle cellule, sono presenti molte molecole capaci di essere eccitate dai fotoni e di rilasciare energia secondo queste due reazioni. A queste molecole capace di essere fotosensitizzate appartengono alcune molecole cosiddette cromofore (portatori di colore): porfirine, melanina, bilirubina, eme, riboflavine, etc.

ROS

Tra le specie reattive (radicaliche e non) che hanno un ruolo a livello biochimico e molecolare in condizioni di stress ossidativo troviamo

- **Anione superossido (O₂^{•-}),**

Questo radicale può essere prodotto accidentalmente, a livello della catena di trasferimento elettronica mitocondriale e microsomiale per trasferimento di un elettrone

dai trasportatori di elettroni direttamente all'ossigeno (Fig. 22) che quindi viene ridotto a radicale superossido. Il radicale superossido è prodotto nelle reazioni di enzimi ossidativi, tra cui l'aldeide ossidasi, la NADH ossigenasi e la xantina ossidasi.

Nelle nostre cellule viene rapidamente reso inerte attraverso la SOD, un enzima ossido reductivo, che si presenta in varie isoforme a seconda dello ione metallico presente nel sito catalitico.

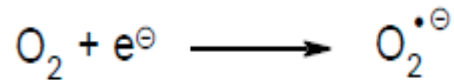


Figura 22 Reazione di formazione dell'anione superossido

- **Acqua ossigenata**

Ulteriore prodotto della riduzione dell'ossigeno, è rappresentato dall'acqua ossigenata o perossido d'idrogeno (H_2O_2), la forma protonata del dianione perossido (Fig. 23).

Essa è una specie non radicalica, che può essere ottenuta mediante riduzione bivalente dell'ossigeno.

Alternativamente si può attuare la via indiretta di formazione mediante riduzione univalente dell' O_2 a superossido, seguita da dismutazione. Nelle cellule l' H_2O_2 si forma come prodotto primario della riduzione dell'ossigeno da parte di numerose ossidasi, la maggior parte delle quali è localizzata a livello dei perossisomi. L'acqua ossigenata è una specie dannosa a causa della capacità di reagire con i composti sulfidrici presenti nei residui di metionina delle proteine e, a concentrazioni basse, può portare alla lisi degli eritrociti umani.

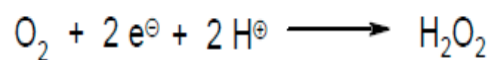


Figura 23 Reazione di formazione dell'acqua ossigenata

- **Radicale idrossile($\cdot\text{OH}$):**

L'idrossile radicale è estremamente ossidante, come dimostra la coppia redox, $\text{HO}/\text{HO}^{\ominus}$ con potenziale $E^{\circ} = 1.9 \text{ V}$ in acqua, e risulta notevolmente dannoso a livello dei sistemi

biologici in quanto reagisce con moltissime molecole di interesse biologico (come ad esempio carboidrati, lipidi, proteine, DNA).

Questo radicale si forma in conseguenza della degradazione dell'acqua ossigenata, quindi è un sottoprodotto delle reazioni finali causate dall'anione superossido. Inoltre può anche svilupparsi per via fotochimica tramite fotolisi dell'acqua.

- **Ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$)**

forma reattiva dell'ossigeno che però non è un radicale. L'ossigeno singoletto viene considerato un forte ossidante in quanto possiede un potenziale redox di 0.34 V in DMF o 0.79 V in H₂O.

Esso è in grado di ossidare le basi puriniche e pirimidiniche provocando quindi danni anche al DNA (40).

Nei sistemi biologici, l'ossigeno singoletto può formarsi per dismutazione spontanea del superossido radicale oppure per interazione di quest'ultimo con il radicale idrossile o con l'acqua ossigenata. La tossicità del superossido radicale deve quindi anche essere riferita alla possibilità di agire da precursore di ossigeno singoletto.

Esso si può anche formare durante il processo di perossidazione lipidica in cui sono presenti dei radicali perossilici intermedi, che reagendo fra di loro, formano un tetrossido che, a sua volta degradandosi, rilascia ossigeno in questa forma.

L'ossigeno singoletto viene inoltre prodotto durante la reazione fra lo ione ipoclorito e l'acqua ossigenata attraverso l'enzima mieloperossidasi.

- **Radicali perossilici ROO•**

Sono il prodotto della reazione di radicali centrati al carbonio con ossigeno molecolare. Queste specie radicaliche sono la causa principale della propagazione delle catene di autoossidazione (come la perossidazione lipidica) e reagiscono per idrogeno estrazione, portando alla formazione di alchilidroperossidi e un altro radicale che propaga la catena. La decomposizione del tetrossido porta alla formazione di ossigeno che in parte può essere ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$), e di dialchilperossido. Quest'ultimo poi si degrada dando luogo alla formazione di alcossi radicali.

Gli alcossi radicali, che richiamano molto da vicino l'idrossi radicale, a causa della notevole notevole capacità di addizionarsi ad un doppio legame, originando un radicale centrato al carbonio che, come è stato detto precedentemente, può essere l'origine di un nuovo perossi radicale quando reagisce con l'ossigeno.

ROS EFFETTI SULLA SALUTE

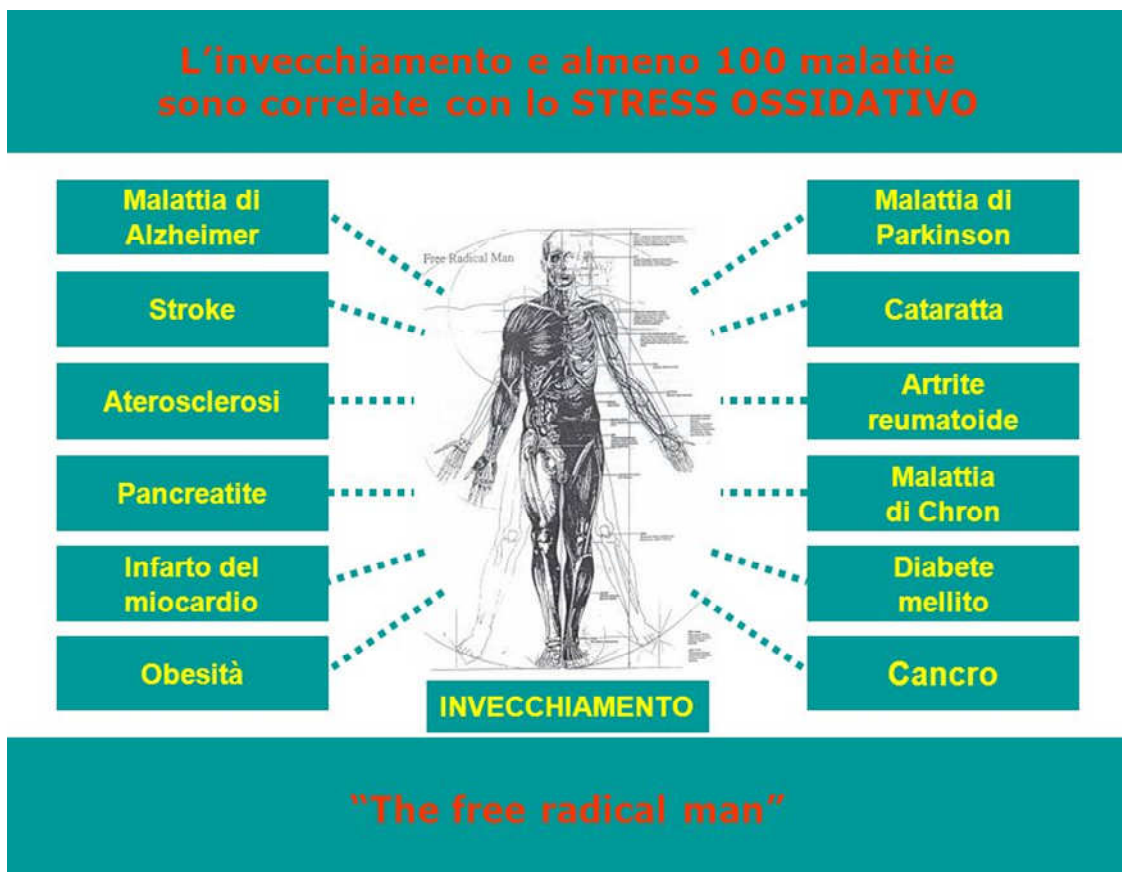


Figura 24 Free radical man, coinvolgimento delle specie reattive dell'ossigeno ROS in diverse patologie cronico degenerative

La presenza di alti livelli di stress ossidativo e quindi elevate concentrazioni di ROS nel nostro organismo porta ad effetti deleteri e dannosi nel medio e lungo termine.

I ROS sono le principali molecole che partecipano alla comparsa delle svariate sindromi o malattie che inficiano la salute dell'uomo.

La presenza di ROS è la causa o la concausa di uno squilibrio ossidativo nelle componenti cellulari e nei distretti corporei, ove si riscontra in vari quadri clinici: diabete, aterosclerosi, Parkinson, Alzheimer, ictus, cancro, malattie neurodegenerative, invecchiamento etc. (Fig. 24).

I ROS, essendo molecole molto reattivi, sono capaci di reagire con molti target biologici come proteine, lipidi e DNA e si ritrovano in questi particolari quadri clinici.

Nei confronti dei lipidi, che nella forma fosfogliceridesono il principale costituente delle nostre membrane cellulari, i ROS hanno un'elevata affinità.

La causa di questa spiccata interazione risiede nella struttura tipica dei fosfogliceridi, costituiti da una parte polare e da una parte apolare. In quest'ultima i componenti si dividono in acidi grassi saturi e polinsaturi (PUFA) (Fig. 25).

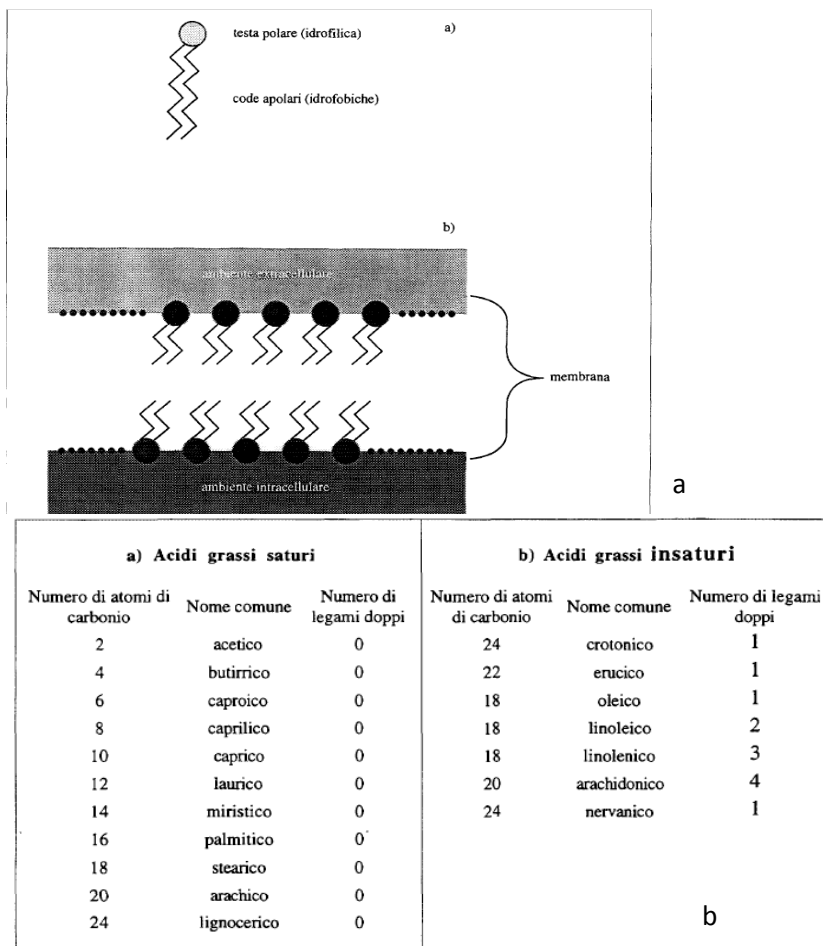


Figura 25 Struttura di un fosfolipide formato da una testa polare ed una parte apolare (a). Classificazione acidi grassi a seconda del numero di atomi di carbonio e della presenza di doppi legami (b).

Questi doppi legami presenti negli acidi grassi insaturi sono il principale target di azione dei ROS: agendo su di essi ne modificano la struttura, iniziando una serie di reazioni che porteranno alla loro decomposizione chiamata perossidazione lipidica.

L'iniziazione avviene quando una specie radicalica (ROS) reagisce con un acido grasso polinsaturo, perché i doppi legami consentono un'idrogeno-estrazione facilitata, formando un radicale lipidico. Questo a sua volta reagisce con l'ossigeno atmosferico, formando dei radicali perossilici, che propagheranno il danno agli altri acidi grassi (fase di propagazione). Questa reazione a cascata porterà alla produzione di altre specie radicaliche che continueranno il fenomeno a catena.

Un incremento nella formazione dei radicali liberi è coinvolto in numerose situazioni cliniche (fibrosi cistica, tumori, patologie epatiche e polmonari) e nell'invecchiamento; esso determina un incremento del numero delle perossidazioni che avvengono nell'organismo.

La decomposizione finale degli acidi grassi insaturi conduce alla formazione di idrocarburi essenziali, aldeidi e chetoni.

Durante la perossidazione si formano intermedi, come malondialdeide, dieni coniugati e idroperossidi, marker tipici della perossidazione lipidica (Fig. 26).

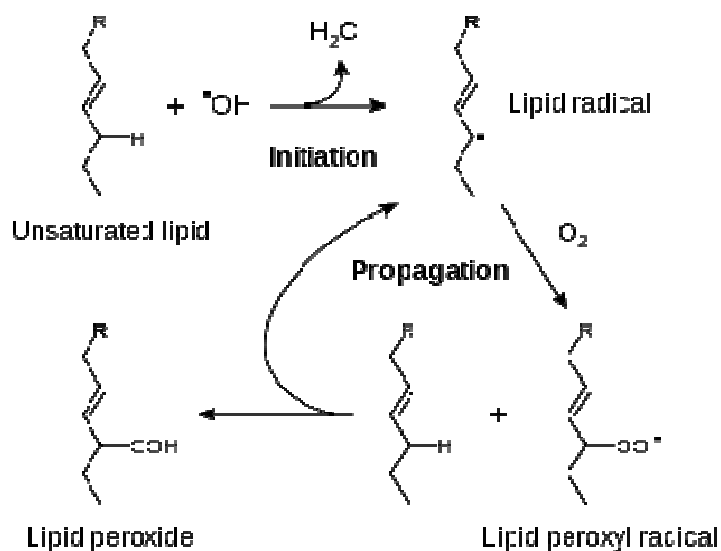


Figura 26 Perossidazione lipidica di un acido grasso insaturo nelle sue diverse fasi: iniziazione ad opera di un radicale, propagazione radicalica, formazione di radicali perossilici e formazione finale di lipoperossidi.

A livello molecolare, a causa della loro capacità di danneggiare le membrane cellulari e di propagare le specie radicaliche, i ROS possono reagire con le basi azotate del DNA.

Queste interazioni provocano alterazioni nelle strutture pirimidiniche e puriniche, indebolendo i meccanismi endogeni di riparo.

Queste alterazioni porteranno a rotture nel filamento di DNA, le quali a loro volta porteranno a mutazioni nella codificazioni di alcuni geni fondamentali, come quelli responsabili del ciclo cellulare e capaci di reprimere la comparsa di tumori e la loro proliferazione.

Le anomalie strutturali, nelle sequenze di DNA, sono diventate ormai il target fondamentale per determinare la gravità dello stress ossidativo delle cellule e la predisposizione cellulare a mutare in forma cancerosa.

La mutazione 8oxo guanina (8oxoGua), infatti, è usata come marker genomico per individuare il livello di danno ossidativo e soprattutto per studiare i rischi di insorgenza di una lesione tumorale.

A conferma di ciò, in molte neoplasie si ritrova un'alta percentuale di basi 8oxoGua presente nel genoma (45).

Il DNA rappresenta quindi una molecola molto sensibile all'azione dei ROS, un esempio è la tossicità del radicale idrossile.

L'idrossile radicale può effettuare reazioni di addizione a doppi legami come quelli presenti nelle strutture aromatiche di purine e pirimidine, che troviamo a livello di RNA e DNA, e può attaccare gli zuccheri, come il deossiribosio presente anche esso nel DNA. Quindi il radicale idrossile può portare a diversi tipi di danni a livello del DNA, che in ultima analisi si traducono in mutazioni, rottura della doppia elica e cancerogenesi (40,45).

A livello proteico i ROS esercitano un'alta reattività che porta a modificazioni strutturali compromettendo così l'efficienza e la funzione delle proteine, favorendo la loro denaturazione prima, e successivamente la loro scissione proteolitica e degradazione.

In molti lavori si osserva come il perossido di idrogeno sia molto reattivo con i gruppi tiolici delle cisteine, formando acido sulfenico. A sua volta questo gruppo reagisce con l'enzima glutatione GSH ossidandolo a GSSG, oppure può reagire con dei gruppi ammidici formando dei sulfenilammidi o reagire con altri gruppi tiolici (46).

Le modificazioni post traduzionali causate e innescate dai ROS sono molteplici e interessano la salute dell'uomo quando riguardano diverse proteine che possono fungere da segnale per diverse vie metaboliche riguardanti relative alla predisposizione a sindromi e malattie.

Altri lavori riguardo la reattività dei ROS nei confronti delle proteine coinvolgono segnali fondamentali come p53, JUN e cFOS. Queste tre proteine descritte in precedenza sono fondamentali nella comparsa e progressione di una lesione tumorale, visto il loro ruolo nel controllare il ciclo cellulare, la senescenza e l'apoptosi.

Il fattore p53 presenta una stretta correlazione con l'azione dei ROS, ma i meccanismi non sono del tutto chiari, e sono ancora da approfondire. Esperimenti tramite array evidenziano come in un panel di 48 geni attivati dall'azione ossidante del perossido di idrogeno ben un terzo erano marcati da p53.(47)

Studi recenti riportano che i diversi livelli di trascrizione di p53, esercitano degli effetti modulatori su geni proossidanti o antiossidanti.(47)

A supporto di tale evidenza uno studio dimostra come le proteine redox (Reg/1 e TRR) siano reciprocamente regolate dai livelli di p53. (47)

L'apparato tegumentario è la principale sede di questi fenomeni di natura biochimica e molecolare. Infatti nella cute troviamo un'elevata presenza di enzimi iniziatori e produttori di specie reattive dell'ossigeno quali NADPH ossidasi, xantina ossidasi, diverse ossidasi perossisomiche, enzimi appartenenti alla famiglia dei citocromi p 450, ciclossigenasi e lipoossigenasi. Queste serie di enzimi produttori di ROS sono distribuiti fra epidermide e derma. Nella cute invecchiata o fotoinvecchiata questo forte sbilancio pro-ossidativo determina l'attivazione nei fibroblasti senescenti, di pathways mediati da p16/Rb e p53/p21 che conducono all'arresto del ciclo cellulare (senescenza).

Il fotoinvecchiamento è anche uno dei principali meccanismi degenerativi che si sviluppano nella cute, intesa come epidermide, derma. Le radiazioni UV sono in grado, tramite meccanismi di fotosensibilizzazione e la presenza di cromofori come: NADH/NADPH, triptofano, riboflavine etc., di aumentare la produzione di perossidi, radicali idrossili. Questi composti hanno la capacità di attivare pathways a valle riguardanti Raf, protein tirosina fosfatasi e MEKK 1, i quali promuovono la traslocazione di altri mediatori chimici che attiveranno l'azione degradativa delle metallo proteasi AP-1 indotte (48).

MITOCONDRI E ROS

A livello endogeno la cellula stessa produce un ammontare fisiologico di radicali e specie pro-ossidanti, visto che il nostro corpo e le nostre cellule sono immerse in un' atmosfera composta da ossigeno.

La centrale di produzione di energia cellulare è il mitocondrio. Questo organello sub cellulare è in grado di estrarre energia da diversi substrati (proteine, grassi, zuccheri) attraverso la respirazione cellulare, tramite il ciclo di Krebs e la fosforilazione ossidativa. La molecola finale prodotta

è l'adenosina trifosfato (ATP), fondamentale per i maggiori processi metabolici intracellulari vitali per la corretta fisiologia cellulare.

Il mitocondrio per produrre ATP ha bisogno dell'ossigeno come accettore di elettroni. Questa molecola entra tramite la respirazione polmonare e, attraverso il torrente circolatorio, si diffonde in tutti i tessuti. La maggior parte dell'ossigeno cellulare è consumato dal mitocondrio (circa il 95% dell'ossigeno disponibile negli animali aerobici) (49).

Per queste caratteristiche, infatti, il mitocondrio, insieme ad alcuni enzimi, rappresenta la principale fonte di produzione di specie reattive dell'ossigeno nell'organismo (Fig. 27). (49, 50)

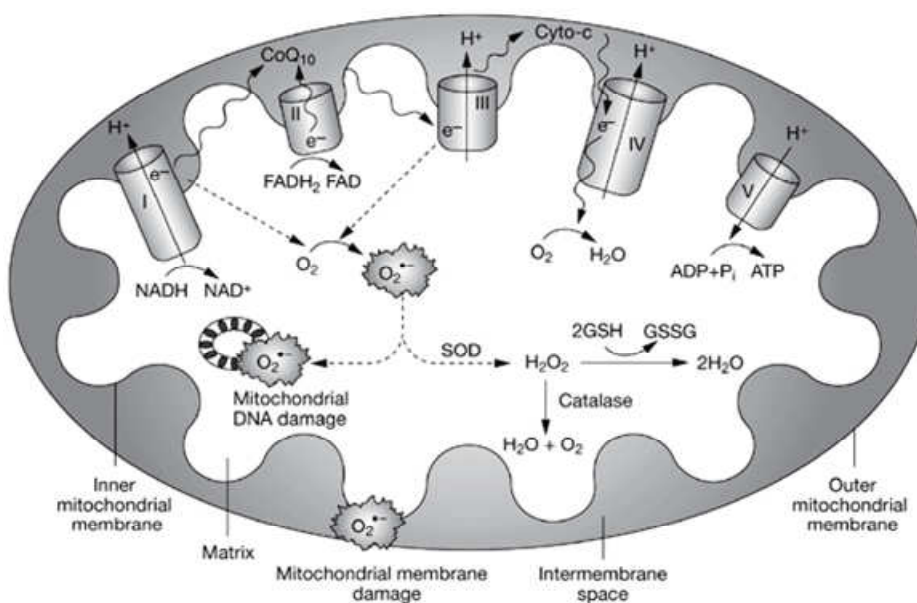


Figura 27 Struttura del mitocondrio, si visualizzano i complessi respiratori coinvolti nell'ossidazione fosforilativa. Si rappresentano anche i punti di produzione delle specie radicaliche e le difese endogene che le inibiscono.

In letteratura si è visto che durante la respirazione mitocondriale, con ossigeno come accettore di elettroni, si ha contemporaneamente la sintesi di perossido di idrogeno (49).

Questo è dovuto ad una prima autoossidazione che porta nel complesso respiratorio I ad una produzione di anione superossido, il quale viene processato dalla MnSOD per produrre perossido di idrogeno. A sua volta il perossido tramite la reazione di Fenton catalizzata dallo ione Fe^{+} produrrà il radical idrossile (Fig 28).

reazione di Fenton:



Figura 28 Reazione di Fenton catalizzata dal rame

In generale, a livello di complessi respiratori, quelli che danno il maggior contributo nella produzione di ROS sono il complesso I e il complesso III, situati nella matrice e nello spazio intermembrana. Boveris et al riportano che la percentuale di perossido di idrogeno prodotto a fronte del consumo di ossigeno è del 2%. (51)

In condizioni patologiche, quando la produzione di radicali aumenta, si genera un circolo vizioso, poichè le specie reattive dell'ossigeno hanno come target i complessi respiratori e le proteine mitocondriali; quindi ad un aumento di ROS corrisponde un maggior danno mitocondriale.

I mitocondri maggiormente danneggiati respireranno sempre meno efficientemente e sempre più ROS si formeranno dai complessi di trasporto elettronici.

Questo loop a livello ossidativo con danni del mitocondrio si interromperà quando i ROS mitocondriali raggiungeranno un' elevata percentuale attivando l'apertura del poro di transizione mitocondriale MPT, rigonfiando il mitocondrio e danneggiando irreparabilmente la struttura dell'organello. (52)

Una volta avviato questo processo, il mitocondrio è indirizzato verso un meccanismo degradativo di morte programmata, la mitoptosi. Questa è una delle ultime strategie per bloccare la propagazione del danno ossidativo.

A livello cutaneo i mitocondri presenti nei fibroblasti sono sottoposti quotidianamente a dosi più o meno elevate di radiazione UV. La radiazione è fonte di produzione di ROS mitocondriali con successive modificazioni delle proteine mitocondriali, come i complessi respiratori che contribuiscono ancora all'aumento dei ROS mitocondriali. Il principale artefice dello sbilanciamento pro-ossidativo è il complesso II, infatti Anderson et al; dimostrano come irraggiando cellule della pelle, epidermiche e dermiche, in concomitanza con un inibitore del complesso II, si ha un significativo aumento dei ROS UVA indotti (100). Gli altri complessi I e III in entrambi i tipi cellulari cutanei non contribuiscono in maniera significativa all'amplificazione dei ROS UVA-indotti (53). Il complesso II è anche analizzato a livello di attività enzimatica, dimostrando che la sua processività diminuisce con l'invecchiamento (53).

Il primo target dei ROS mitocondriali è il mtDNA. L'effetto è l'aumento di mutazioni nel mtDNA che porterà ad una diminuzione della massa mitocondriale e alla produzione di mitocondri aberranti non più efficaci nel produrre ATP e nel detossificare i prodotti di scarto dell'ossidazione

fosforilativa. Queste mutazioni a carico dell' mtDNA secondo alcuni dati possono essere considerati come marker di stress ossidativo UV-indotto (54)

ANTIOSSIDANTI ENDOGENI

In letteratura secondo la definizione classica per antiossidante si intende: "qualsiasi sostanza che, presente in concentrazione molto bassa rispetto a quella di un substrato ossidabile, è in grado di ritardare o inibire significativamente l'ossidazione di quel substrato" (Halliwell & Gutteridge, 1989). (55)

Gli antiossidanti sono quindi molecole deputate a ristabilire l'equilibrio redox nella cellula: per loro natura sono capaci di neutralizzare i ROS prodotti dal nostro organismo in condizioni fisiologiche.

A livello chimico si possono dividere a seconda del meccanismo di azione usato:

Tipo I: "Chain breaker". Agiscono da inattivatori di radicali liberi donando idrogeno o trasferendo un singolo elettrone alle specie radicaliche (Fig.29). Sono composti che, grazie al potenziale di riduzione negativo, sono in grado di fornire ai radicali liberi gli 8 elettroni di cui sono privi, stabilizzandoli.

La loro efficacia dipende dalla stabilità dei radicali nei quali si trasformano; pertanto, più efficiente è la delocalizzazione degli elettroni spaiati prodotti nella reazione con i radicali liberi, più il potere antiossidante è elevato.

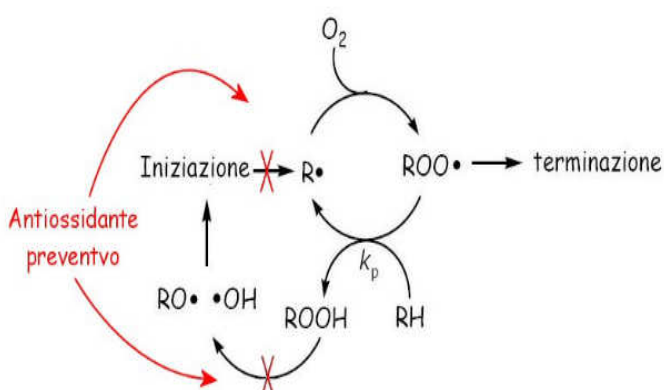


Figura 29 Meccanismo di azione di un antiossidante chain breaker.

Tipo II: "Metal scavenger". Prevengono la formazione di radicali liberi agendo da chelanti dei metalli (Fig.30). Appartengono a questi elementi il ferro o il rame, potenti pro-ossidanti

che accelerano le reazioni di iniziazione dell'ossidazione lipidica, generando radicali alchilici a partire da acidi grassi.

Nella cellula possiamo distinguere in antiossidanti non enzimatici e enzimatici.

I primi, più studiati e rappresentativi, sono:

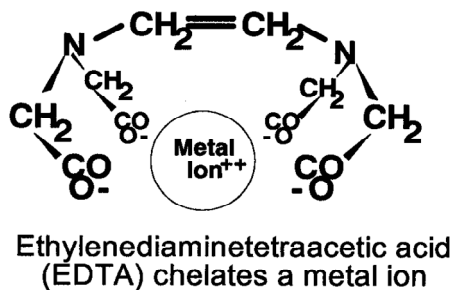


Figura 30 Esempio di antiossidante chelante verso gli ioni metallici, EDTA

- **GSH**

Tripeptide che si trova sottoforma ridotta GSH, ha la capacità di rimuovere metalli, perossidi e lipidi per ossidati (Fig. 31). Può essere riformato tramite l'enzima glutatione reduttasi GR.

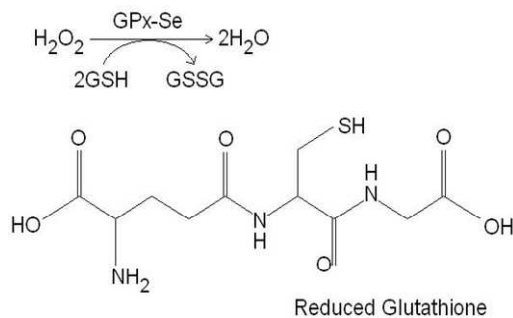


Figura 31 Struttura del glutatione in forma ridotta e meccanismo di azione verso il perossido di idrogeno

- **Ubiquinone (Q10)**

Cofattore lipofilico, che svolge la funzione di trasportatore di elettroni tra il complesso I, II e III (Fig. 32).. È un antiossidante ubiquitario presente soprattutto nelle membrane mitocondriali. A livello di concentrazione come antiossidante lipofilico è secondo solo al tocoferolo, ma esercita un'attività più elevata rispetto a quest'ultimo nel reagire con le lipoproteine.

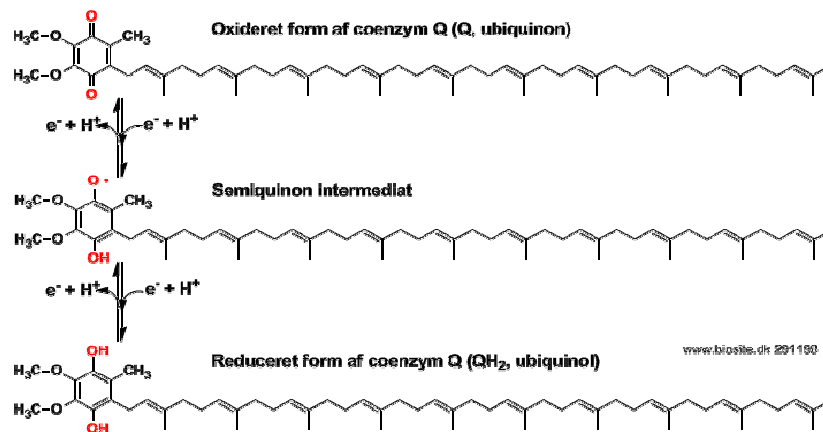


Figura 32 Ubichinone (Q10) nelle sue diverse forme: ossidato, intermedio e ridotto

Altri antiossidanti non enzimatici notissimo: ferritina, ceruloplasmina, transferrina, metallotioneina. Il loro meccanismo antiossidante è determinato dalla loro capacità chelante rispetto ai metalli presenti in circolo, che devono sempre avere dei livelli fisiologici tollerabili.

Per quanto riguarda le difese antiossidanti enzimatiche che si trovano nel nostro organismo, le più conosciute sono: superossido dismutasi, catalasi, glutazione perossidasi, sistemi tireodossina ecc..

- **Superossido dismutasi (SOD)**

Enzima fondamentale per relazionarci in un ambiente ossidante come l'atmosfera circostante, la quale presenta livelli O_2 di circa il 20%.

La dismutazione è un particolare tipo di reazione nella quale avvengono contemporaneamente due reazioni opposte, un'ossidazione e una riduzione, su due molecole uguali (Fig. 33). L'enzima SOD prende due radicali superossido, sottrae l'elettrone in più dal primo e lo trasferisce al secondo. In questo modo una delle due molecole perde l'elettrone in più e diventa ossigeno molecolare O_2 , l'altra si ritrova con un elettrone in più e, dopo aver legato due ioni H^+ , forma acqua ossigenata H_2O_2 .

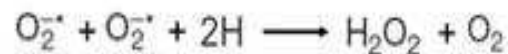


Figura 33 Formula generale della reazione chimica (dismutazione) con l'anione superossido

La superossido dismutasi nel nostro organismo si trova in tre diverse isoforme che differiscono fra loro a seconda dell'atomo metallico che si trova nel sito catalitico:

- **SOD 1**

Contiene nel sito catalitico atomi di Cu o Mn, localizzata nel citosol, nei perossisomi, nei lisosomi, nel nucleo e nello spazio intermembrana del mitocondrio, è presente in forma di enzima omodimerico di circa 32 KDa contenente in ogni subunità un atomo di Cu^{2+} e uno di Zn^{2+} .

- **SOD2**

Contiene nel sito catalitico l'atomo manganese, ed è localizzata nei mitocondri. I legami degli ioni manganese sono con 3 catene laterali di istidina, una catena laterale all'aspartato e una molecola d'acqua o legame ossidrilico a seconda dello stato di ossidazione del Mn (rispettivamente II e III).

Rappresenta un enzima fondamentale nel bilanciamento redox cellulare, detossificando in maniera efficiente i ROS prodotti come effetto collaterale alla fosforilazione ossidativa.

- **SOD3o EC-SOD**

Altamente espressa nei vasi sanguigni, in particolare nelle pareti delle arterie, è la forma predominante nell'aorta di babbuino e uomo. Più del 90% dell'EC-SOD è localizzata nello spazio extracellulare della tonaca muscolare dei vasi, proteggendo la parete delle arterie dallo stress ossidativo. Una piccola quantità è localizzata sulla superficie delle cellule endoteliali legata ai proteoglicani e ai parani-solfati ed, infine, una porzione ancora minore può essere localizzata in equilibrio tra superficie cellulare/matrice e plasma.

L'importanza fisiologica della SOD è evidente dalle gravi patologie osservate nei topi modificati geneticamente per la mancanza di tali enzimi. Essi muoiono pochi giorni dopo la nascita, a causa del forte stress ossidativo; in assenza di SOD1 sviluppano una gran varietà di patologie, tra cui il carcinoma epatocellulare, una grave perdita di massa muscolare, un'incidenza precoce della cataratta ed una speranza di vita minore.

Quelli che mancano di SOD3 non mostrano invece nessun difetto evidente ed hanno una normale aspettativa di vita. È stato ipotizzato che i ROS possano prendere parte a meccanismi quali necrosi ed alterazioni della perfusione che portano all'infarto acuto del miocardio.

Queste descrizioni riguardano le caratteristiche e le distribuzioni, a livello di corpo umano, degli enzimi detossificanti appartenenti alla famiglia delle SOD. Questi enzimi svolgono un ruolo fondamentale nell'inattivare i ROS, anche grazie alla collaborazione con altri enzimi come la catalasi e la glutazione perossidasi che scindono ulteriormente i loro prodotti di degradazione, come i perossidi.

- **CATALASI**

Enzima appartenente alla classe delle ossido reduttasi, fondamentale è un' emoproteina molto conservata nell' evoluzione degli organismi.

La catalasi è un tetramero di 4 catene polipeptidiche di lunghezza minima di 500 amminoacidi. All'interno del tetramero vi sono 4 gruppi ferrosi che permettono all'enzima di reagire con il perossido di idrogeno.

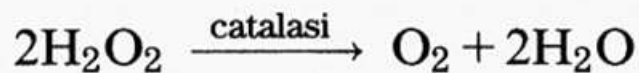


Figura 34 Reazione chimica della catalasi

Permette di degradare e produrre delle molecole totalmente inerti e non tossici per il nostro organismo come l'acqua e l'ossigeno (Fig. 34).

- **GLUTATIONE PEROSSIDASI**

Enzima che vanta la capacità di degradare e rendere inattivi i perossidi e di ridurre la presenza degli idroperossidi lipidici .

Appartiene alla famiglia delle ossido reduttasi, consiste in una seleno proteina.

Esistono diversi isoenzimi a seconda del tessuto preso in considerazione, la glutazione perossidasi 1 (Gpx 1) è quella più presente nel citoplasma di tutti i tessuti dei mammiferi.

Il meccanismo catalitico comprende: l'ossidazione, in presenza di un idroperossido, del selenolato nel dominio catalitico a derivato dell'acido selenenico; la riduzione di questo da parte del glutathione (GSH) porta alla formazione di un addotto seleno-zolfo (Fig. 35). L'enzima viene quindi rigenerato grazie ad un'altra molecola di glutathione ridotto che viene ossidata (GSSG) dall'intermedio formato.

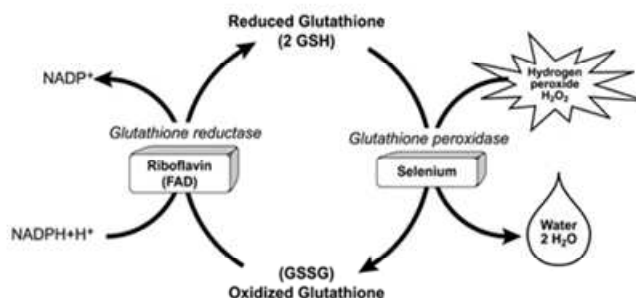


Figura 35 Reazione accoppiata della glutathione perossidasi e della glutathione reduttasi

Queste molecole o complessi enzimatici hanno un ruolo primario nel mantenimento dell'equilibrio redox in condizioni fisiologiche.

Quando questo equilibrio viene perturbato, questi sistemi di difesa sono modulati in maniera positiva e negativa.

La loro modulazione può essere la causa nel tempo dell'insorgenza di alcuni tipi di sindromi o malattie come diabete, Alzheimer, infarti, problemi cardiocircolatori, malattie autoimmuni e invecchiamento.

Riporteremo alcuni esempi della moltitudine di ripercussioni dei sistemi antiossidanti negli stati patologici.

Altro antiossidante endogeno che ha effetti sulla salute, è il coenzima Q10, accettore di elettroni e cofattore lipofilico fondamentale per il corretto funzionamento della catena di trasporto elettronica nella membrana mitocondriale interna. Altra funzione secondaria importante svolta all'interno del mitocondrio è la sua elevata capacità di inibire e bloccare i ROS, i quali possono essere anche formati come scarti della respirazione mitocondriale. Per la sua natura lipofila può contribuire ad evitare la perossidazione lipidica delle lipoproteine. In topi transgenici, privati del gene ApoE, nutriti con una dieta iperlipidica, la supplementazione con coenzima Q10 diminuiva i livelli di perossidi e le lesioni aterosclerotiche nei campioni di aorta murini, suggerendo un effetto anti-aterogenico diretto del cofattore lipofilo (56,57).

Il suo effetto è stato dimostrato in alcuni studi condotti in doppio cieco, in cui si osservava una motilità del ventricolo sinistro leggermente migliorata (58).

Nella cute è ubiquitario presente anche sulla membrane mitocondriali dei cheratinociti e dei fibroblasti. Questo cofattore lipofilo espleta una robusta attività antiossidante contro lo stress ossidativo cutaneo, grazie anche al contributo diretto della sua forma ridotta l'ubichinolo che è capace di agire come interferente e quindi chain breaker della propagazione ossidativa lipidica durante la perossidazione (59)

La SOD, che grazie alla sua elevata reattività verso l'anione superossido, è strettamente correlata alle patologie cardiovascolari ROS indotte.

A livello degli endoteli murini l'espressione della SOD 3 extracellulare (ecSOD) è regolata dal rilascio di NO. L'enzima, infatti, grazie alla capacità di inibire i ROS, consente all'ossido nitrico di agire come agente rilassante dei vasi sanguigni, evitando eventuali accumuli di ROS che potrebbero predisporre a fenomeni aterosclerotici.

Nelle lesioni aterosclerotiche si rileva come i globuli bianchi esprimano sulla loro superficie, quando sono adesi all'ateroma, una forma di ecSOD tronca e inattiva, rafforzando ancora di più il ruolo della SOD nell'insorgenza dell'ateroma (60).

La sua isoforma è quella più abbondante nella matrice extracellulare di vari tessuti, tra questi anche la cute. Infatti è altamente espressa nei cheratinociti e nella matrice extracellulare che avvolge i fibroblasti. Nel derma espleta il suo effetto antiossidante contro i ROS UV indotti, questo è stato dimostrato in alcuni studi in cui sono irraggiati campioni cutanei dorsali di topi balb-3 condotti di 25 kJ/m². Nello specifico si è registrato un picco di espressione di SOD 3 dopo 6 h dalla esposizione.(61)

A livello infiammatorio anche la SOD 3 è stata vista in vivo attenuare il rilascio dei segnali pro-infiammatori, infatti in modelli murini che esprimevano il gene SOD 3 trans-genico, dopo trattamento con aptene TCP, si sono trovate meno infiltrazione di cellule di Lagherans e citochine infiammatorie nei tessuti profondi cutanei (61).

ANTIOSSIDANTI ESOGENI

L'equilibrio redox cellulare rappresenta uno stato omeodinamico che può essere influenzato anche dall'assunzione o dall'assorbimento di composti o molecole esogene ad attività antiossidante. Il corpo può, con il cibo o con altri prodotti, supportare la componente antiossidante cellulare.

Il nostro organismo assume anche con la dieta antiossidanti che non è in grado per natura di sintetizzare.

I vegetali sono ricchi di composti di varia natura ad elevato effetto antiossidante, per i quali sono state riscontrate attività antinvecchiamento, generalmente compresi nella categoria fitochimici.

Tali composti sono metaboliti secondari prodotti dalle piante, i quali permettono al vegetale di crescere e proteggersi da elementi dannosi per il ciclo vitale come insetti e parassiti.

Hanno un'efficacia bioattiva minore rispetto ai principi attivi farmaceutici, ma essendo assunti in maniera quotidiana tramite la dieta possono avere degli effetti a lungo termine.

Essi possono agire interferendo o bloccando vari pathways metabolici, dimostrando di avere un effetto positivo nel prevenire processi associati allo sviluppo di patologie cronico degenerative come: diabete, Alzheimer, Parkinson, aterosclerosi etc.

I fitochimici presenti in natura secondo alcune stime ammonterebbero a 100 mila molecole dei quali ad oggi ne sono stati caratterizzati circa 10 mila. Tra i più noti, largamente studiati, e di rilevanza per la prevenzione dell'invecchiamento cutaneo troviamo:

VITAMINA C

La vitamina C è il più potente antiossidante idrosolubile presente nel plasma sanguigno e agisce anche come rigeneratore di vitamina E (Niki et al., 1995) (62)

Esiste in natura in due forme enantiomeriche, grazie al suo alto potere riducente è in grado di agire in sinergia con il tocoferolo (Fig. 36).

Viene assorbita nell'intestino tenue e eliminata tramite l'apparato emuntore.

La vitamina C possiede una forte azione riducente per la presenza di un gruppo enediolico. Grazie a questa capacità può donare un elettrone, formando un intermedio chiamato "acido semiidroascorbico" questa molecola è altamente stabile e inerte.

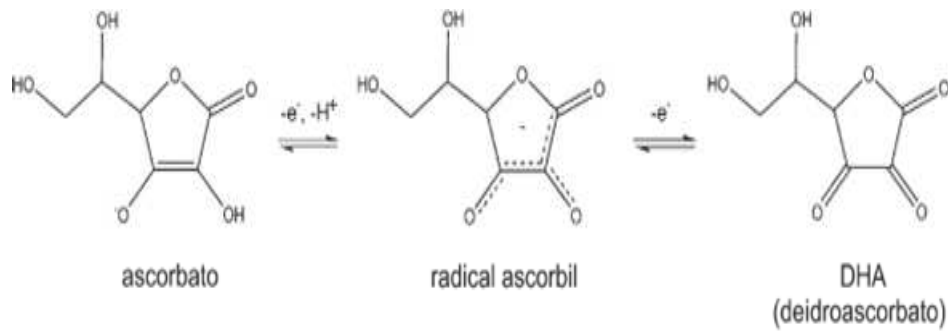
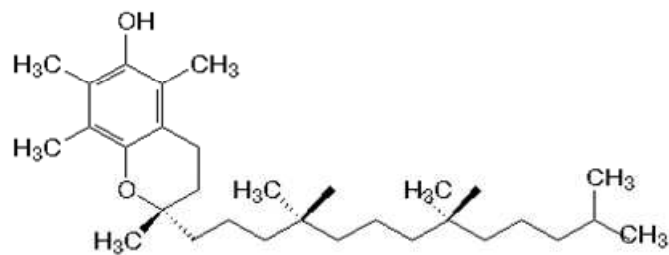


Figura 36 Diverse forme dell'ascorbato

VITAMINA E (tocoferolo)

Appartiene al gruppo tocoferoli, molecole liposolubili prodotte dagli organismi fotosintetizzanti, appartenenti alla classe dei tocoli. Chimicamente, sono derivati del benzodidropirano (Fig. 37). I tocoli sono distinti in tocoferoli (catena isoprenoide satura) e tocotrienoli (catena isoprenoide insatura).



Vitamin E (α -tocoferolo)

Figura 37 Tocoferolo forma alfa struttura chimica

Tra gli antiossidanti non enzimatici l'acido ascorbico è coinvolto in molti stati patologici, grazie alle sue funzioni antiossidanti. Esso è un forte agente riducente che però non viene sintetizzato dai primati e perciò deve essere assunto per via esogena (alimentazione, prodotti cosmetici o farmaceutici).

Altra funzione fondamentale in concomitanza con l'attività antiossidante del tocoferolo, è la capacità di agire in maniera sinergica ed aumentare in maniera notevole l'effetto antiossidante di quest'ultimo.

Studi condotti in campo cardiovascolare portano alla luce ormai come l'effetto sinergico delle due vitamine mitighi l'ossidazione delle LDL e inibisca l'adesione dei leucociti al tessuto endoteliale

(83). Il meccanismo si attua tramite l'alta capacita antiossidante dell'ascorbato che è capace di agire come co-antiossidante nei confronti del tocoferolo, permettendo la rigenerazione della sua forma ridotta e aumentandone così il potere antiossidante nel tempo. (63)

Il potente effetto antiossidante è noto anche in vitro su vari campioni di liquidi biologici, come il liquido seminale. *Donnelly et al.* misurando i danni indotti da perossido di idrogeno e l'integrità genomica, tramite saggio Comet, su spermatozoi, hanno dimostrato che la supplementazione con ascorbato e tocoferolo diminuiva solo i danni indotti da perossido in modo evidente. A livello di Comet non si ottenevano differenze significative (64).

Nel tessuto endoteliale, grazie alla sua elevata reattività, l'ascorbato reagisce con il cofattore BH3 riducendolo a BH4, la sua forma attiva, che permette all'enzima eNOS una corretta sintesi della citrullina e rilascio di ossido nitrico nel torrente sanguigno. (65)

Inoltre l'ascorbato partecipa come coenzima alla processività di alcuni enzimi rendendo indispensabile la sua presenza per una corretta funzionalità. A conferma di ciò l'ascorbato coadiuva l'enzima prolina idrosilasi, la vitamina sembra, infatti, fungere da attivatore per la produzione di idrossiprolina componente fondamentale del pro-collagene (65).

Il collagene è anche una delle proteina più abbondanti e fondamentali del derma, l'ascorbato funge da cofattore nella sintesi enzimatica dei componenti amminoacidici del collagene (idrossiprolina). Nello specifico l'ascorbato partecipa indirettamente alla corretta idrosilazione della prolina, che ne permette un corretto fenomeno di crossi-linking con l'elastina indispensabile per supportare e dare sostegno allo strato dermico (41).

L'effetto positivo sulla sintesi del collagene è dimostrato in vitro anche su fibroblasti trattati con antagonisti dei canali Ca, i quali hanno ridotto notevolmente la sintesi del collagene I. Questo effetto è stato inibito con la somministrazione di acido ascorbico (66)

Altra caratteristica importante è la sua alta reattività contro i ROS in generale, grazie alla sua capacità antiossidante è capace di sequestrare e di rendere inerti molecole reattive dell'ossigeno come anione superossido, radicale idrossile etc., qualunque sia l'origine di queste specie reattive.

Nella cute, per il suo effetto barriera, sono presenti diverse specie reattive dell'ossigeno ad esempio quelli indotti da radiazione UV, riguardo queste specie l'uso di ascorbato su cute fotoinvecchiata ha un effetto efficace nel diminuire i ROS (41)

D'altra parte anche il tocoferolo ha un'elevata capacità detossificante contro i ROS di varia natura. I tocoferoli sono una classe di antiossidanti lipofili presenti in 8 forme diverse (alfa,beta, tocotrienoli, etc.), la forma più abbondante nei nostri tessuti e liquidi biologici è al forma alfa.

Questa forma è anche quella più efficace dal punto di vista antiossidante.

La vitamina E agisce sulla perossidazione lipidica, inibendo la propagazione radicalica, grazie alla sua capacità di donare un elettrone ai radicali perossilici; a sua volta il tocoferolo si tramuta nel radicale alfa.tocoferossolico. Questa forma radicalica grazie a fenomeni di risonanza rimane stabile e può reagire con altre molecole e enzimi come l'ascorbato, coenzima Q10 e il glutatione in modo da rigenerare la forma attiva (Fig. 38).

Nella cute la maggior parte del tocoferolo è presente nella forma gamma e svolge molteplici funzioni protettive come la detossificazione di ROS indotti da agenti stressogeni esterni (UV, inquinamento, calore). L'uso più frequente a livello di protezione e riparazione riguarda il fenomeno delle ustioni solari.

Le funzioni protettive nella pelle riguardano anche fenomeni come il blocco della sintesi di PGE2 e NO(67). Le innumerevoli proprietà riparatrici e detossificanti sulla cute permettono di introdurla in molte preparazioni dermocosmetiche sotto differenti forme come il tocoferol palmitato. Queste forme sono meno reattive rispetto al tocoferolo, ma sono più stabili nella formulazione di un prodotto cosmetico o farmaceutico.(67)

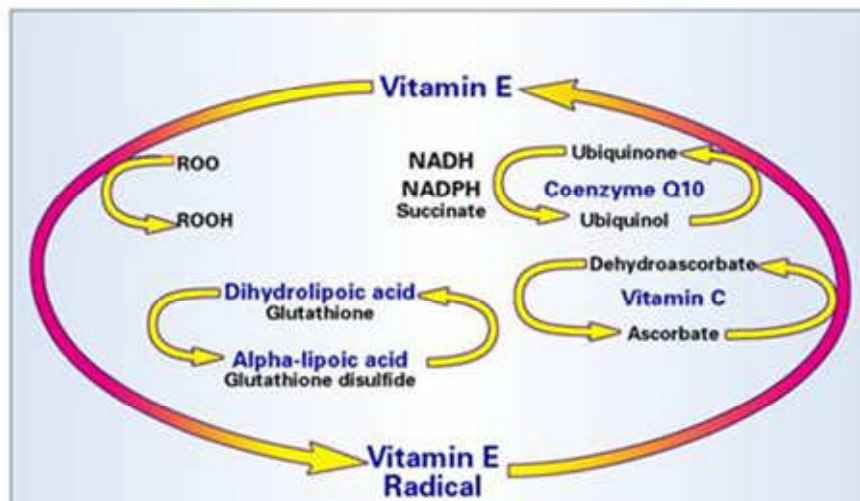


Figura 38 Le reazioni accoppiate e sinergiche della vitamina E con i diversi cofattori, e antiossidanti presenti nel microambiente cellulare

CAROTENOIDI

Gruppo di fitochimici responsabili del colore della frutta e degli ortaggi, di solito sono presenti negli alimenti di colore giallo, rosso o arancione.

Esistono diverse varianti di carotene: alfa, beta carotene, licopene, luteina, criptoxantina.etc.

Il licopene è il fitochimico più noto a livello di protezione dalle malattie cardiovascolari e migliora la funzionalità endoteliale dei vasi sanguigni (68).

A livello oncologico, diversi studi, tra cui quello di Giovannucci et al, hanno dimostrato una correlazione tra consumo di pomodoro, alimento ricco di licopene, e minor incidenza di neoplasie prostatiche.(69)

Esperimenti condotti, trattando linfociti, con perossido di idrogeno, che inducevano rotture a singolo filamento nel DNA, dimostravano l'effetto protettivo di un pretrattamento con estratto di pomodoro.(69)

L'uso dei carotenoidi in applicazioni cutanee è usato soprattutto in formulazioni con filtri solari. In alcuni studi, si è valutato l'effetto foto-protettivo di alcuni di essi, quali l'apigenina e il beta carotene(70).

Il betacarotene è risultato fotostabile verso la radiazione UVA e Visibile, inoltre ha mostrato una bassa fotoreattività. Un altro studio riguardante la dermatite atopica sottolinea come l'assunzione orale di betacarotene, migliora l'ispessimento e il rilascio infiammatorio cutaneo in topi HR-1 con sintomi da dermatite atopica, Infatti gli animali trattati con il beta carotene hanno meno accumulo e infiltrazioni di chemochine a spiccata tendenza pro-infiammatoria (71)

POLIFENOLI

I polifenoli costituiscono un gruppo eterogeneo di sostanze naturali, particolarmente note per la loro azione positiva sulla salute.

In natura essi sono metaboliti secondari con diverse capacità: difesa dagli animali erbivori e dai microorganismi patogeni.

Più di 8 000 composti polifenolici sono stati caratterizzati in varie specie vegetali (Fig. 40).

Questi possono essere classificati in differenti gruppi a seconda del numero di anelli polifenolici presenti in struttura o a seconda dei gruppi funzionali che legano questi anelli.

La maggior parte delle classi di polifenoli viene raggruppata in: acidi polifenolici, stilbeni, flavonoidi e lignani (Fig. 39).

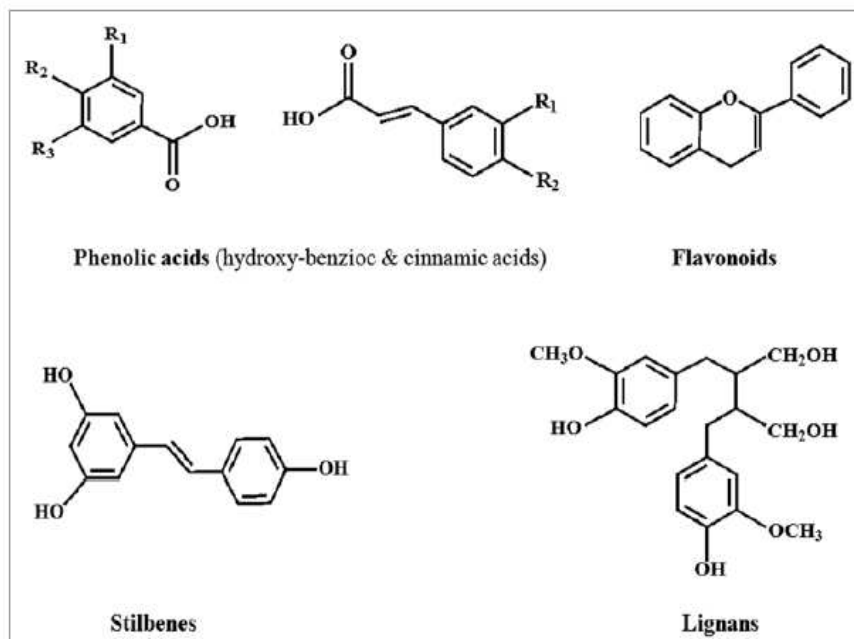


Figura 39 Suddivisioni dei polifenoli nelle principali classi

Acidi fenolici

Si trovano in maniera rilevante negli alimenti e si dividono essenzialmente in due sottoclassi: quelli derivati dall'acido benzoico e i derivati dell'acido cinnamico.

L'acido idrossibenzoico ha concentrazioni molto basse nelle piante commestibili eccetto per i frutti rossi, cipolle, ravanelli. Gli acidi idrossicinnamici sono più comuni rispetto a questi ultimi, si possono trovare come acido: p-cumarico, cinnamico, ferulico, caffeico etc.

Flavonoidi

Per questo gruppo sono state identificate più di 4000 varietà e si dividono in base al tipo di anello eterociclico si dividono in 6 sottoclassi: flavonoli, flavoni, flavanoni, flavanoli, antocianine e isoflavoni.

Stilbeni

Presentano due anelli fenolici connessi da un ponte di metilene. Il più studiato e caratterizzato dal punto di vista nutrizionale per le sue proprietà sulla salute umana, è il resveratrolo (3,4,5-triidrossistilbene), molecola largamente presente nell'uva e suoi derivati (vino).

Lignani

Composti difenolici che formano con due residui di acido cinnamico dei polimeri. Diversi lignani come secoisolariciresinolo sono anche fitoestrogeni.

Il contenuto e la qualità di queste classi di polifenoli varia a seconda della fonte o cibo che prendiamo in considerazione.

Una volta ingeriti, il loro effetto biologico sul nostro organismo è legato alla sua biodisponibilità.

Questa caratteristica varia a seconda della loro struttura chimica.

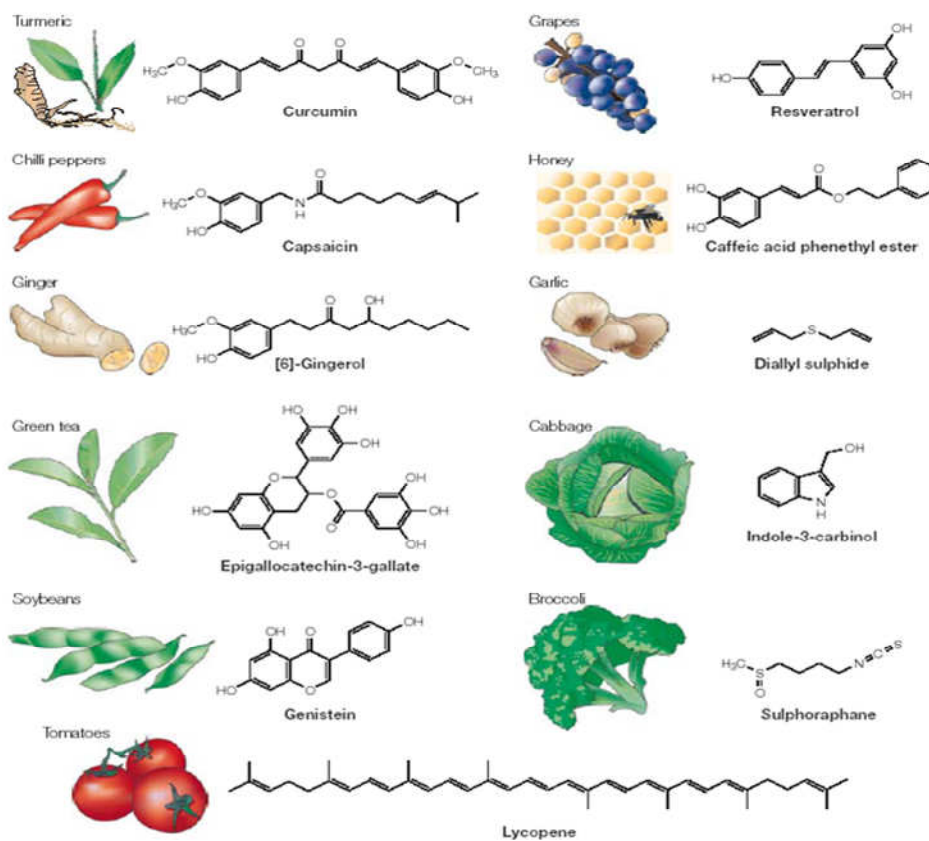


Figura 40 Principali fitochimici associati agli alimenti con maggior presenza.

Il flavonoide più conosciuto e studiato è sicuramente il resveratrolo, il quale ha un effetto preventivo contro malattie croniche cardiovascolari, obesità, cancro, diabete, alzheimer etc.

A livello di malattie cardiovascolari croniche previene l'aggregazione piastrinica inibendo l'attività della COX 1, che attiva la sintesi del tromboxano A2, a sua volta forte induttore dell'aggregazione

piatrinica (72). Il resveratrolo influenza in maniera positiva il tono dei vasi sanguigni agendo sulle pompe Na^+/K^+ e inducendo il rilascio di ossido nitrico, confermandosi un notevole vaso-rilassante (72)

A livello oncologico il resveratrolo vanta effetti regolatori su numerosi fattori di trascrizione e proteine come: NfκB, Bcl2, ciloossigenasi, MMP9, idrossiperossidasi, ed altri messaggeri coinvolti nella proliferazione cellulare.

Di recente si è scoperto che i polifenoli dell'uva e soprattutto il resveratrolo hanno degli effetti anti-aging. Infatti, studi in vitro hanno dimostrato come il resveratrolo sia in grado di modulare SIRT-1, gene che codifica per un istone deacetilasi NAD dipendente. (72)

Gli innumerevoli effetti detossificanti e anti-aging ne fanno un principio attivo di sicuro interesse nel mercato cosmetico o farmaceutico. A livello di apparato tegumentario, infatti entrambi i fenomeni di invecchiamento estrinseco o intrinseco possono essere rallentati o mitigati dall'azione del resveratrolo.

Le specie reattive dell'ossigeno prodotte da differenti stimoli ambientali sono efficacemente inibite dal resveratrolo, ad esempio, in studi invitro l'efficacia antiossidante del resveratrolo è notevole, anche se il meccanismo alla base della risposta non è ben chiaro.

In colture di cheratinociti si osserva come il resveratrolo sia in grado a concentrazioni tra 20 e 100 μM di attivare la via Nrf2 dipendente, infatti si sono trovati livelli di espressione aumentati di geni indotti da Nrf2 come: glutamicilcisteinil ligasi e glutatione perossidasi 2. L'effetto è confermato anche sul modello di pelle ricostruita in vitro dove il pretrattamento con resveratrolo aumentava la resistenza allo stress indotto da CHP (cumene idroperossido), intesa come livello di glutatione rimasti costanti e non diminuiti come quelli dei campioni di controllo.(73)

Altro esperimento eseguito da *Lyu et al*, ha dimostrato su colture HaCaT come l'effetto antiossidante rispetto alla radiazione UVA, è rappresentato da una diminuzione della mortalità cellulare e da una diminuzione di ROS (74). Questo ultimo dato è analizzato dal punto di vista molecolare studiando l'espressione di Nrf 2 e del suo inibitore Keap 1, i dati hanno dimostrato come il fitocomposto ha aumentato i livelli di espressione di Nrf2 e Keap1, ma nel citoplasma si sono riscontrati alti livelli solo di Nrf-2. Le difese antiossidanti sono state attivate tramite l'effetto del resveratrolo sul pathways Nrf 2 dipendente.(74)

Altre classi di polifenoli largamente studiati, di cui se ne possiede un'ampia letteratura sui vari effetti biochimici e molecolari sono: catechine, epicatechine, e i fitochimici più complessi come i derivati dell'acido gallico: EC, EGCG etc (Fig. 41).

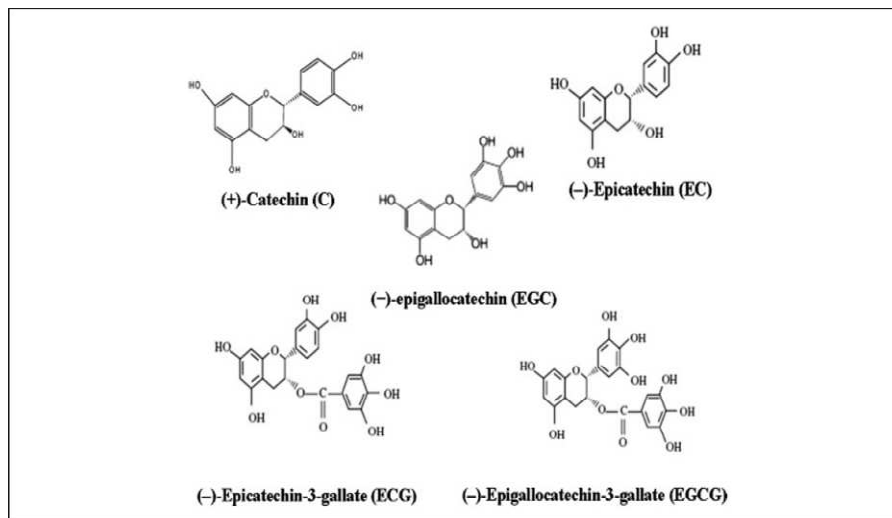


Figura 41 Principali polifenoli del tè verde (GTP, green tea polyphenols)

Questi composti sono molto studiati nel tè verde e the nero. Per quanto riguarda il tè il composto più studiato è l'epigallocatechin gallato o epigallo catechin3-gallato (EGCG) (Fig. 41).

Esso vanta un alto potere antiossidante, i suoi effetti comprendono anche l'attivazione di geni antiossidanti come: SOD, glutazione perossidasi in vivo(75)

A livello molecolare EGCG modula diversi fattori di trascrizione NF-kB, STAT-1, STAT 3, AP-1, etc.

In cellule di ratto è dimostrato cheEGCG inibisce NF-kB e AP-1 dopo ischemia indotta da ri-perfusione. Numerosi studi dimostrano come EGCG diminuisca l'attivazione dei processi infiammatori agendo come antiossidante verso i ROS, anche se ancora non è chiaro se questo sia il maggior meccanismo di azione contro il fenomeno infiammatorio.

A supporto di ciò, alcuni studi rilevano come EGCG aumenti la produzione di ROS, che innescano, così, la trascrizione di NF-kB, ma anche di Nrf2, il quale attiva le difese antiossidanti contro il processo antiinfiammatorio (emossigenasi 1 oHO-1 e glutazione).

Conferma di questo duplice meccanismo si ottiene se si pretrattano le cellule con antiossidanti.In questo caso non si attiva la trascrizione di Nrf2, mentre se le cellule vengono pretrattate con EGCG, si osservano effetti protettivi contro i danni indotti da superossido, grazie ala stimolazione di Nrf2 .

Questi dati ottenuti in vitro sulle proprietà antiossidanti, e di conseguenza antinfiammatorie, sono ancora oggetto di studio, visto che in vivo sono molto difficili da ricreare, causa gli elevati dosaggi usati in vitro e difficilmente riproducibili in vivo.

Altro beneficio apportato da EGCG al nostro organismo è una spiccata protezione del mitocondrio contro i danni ossidativi. Studi disponibili dimostrano che su tessuto cardiaco di topi Wistar la somministrazione di EGCG preveniva il danno mitocondriale indotto da isoproterenolo, farmaco simpatico mimetico.

In definitiva in vitro, pretrattando con EGCG, si sono visti degli effetti anti-apoptotici, indotti da danno mitocondriale, senza influire sull'espressione di geni antiossidanti come SOD, Nrf2, perossidasi e altri fattori coinvolti nello stress ossidativo(75).

Questi fitocomposti del tè verde, grazie alle loro spiccate capacità antiossidanti, sono testati in numerosi studi riguardanti componenti della cute come fibroblasti e cheratinociti per confermare e riportare l'efficacia detossificante anche in relazione a questo apparato.

Tra questi composti, l'acido ellagico risulta fotoprotettivo contro i ROS indotti da irraggiamento UVA su colture HaCaT (76). Il fitochimico è riuscito a diminuire la mortalità cellulare e l'accumulo di MDA indotti dalla radiazione UVA. Altri parametri molecolari e biochimici in questo studio hanno confermato l'effetto foto-protettivo del composto, inteso come diminuzione della frammentazione del DNA, dell'attivazione di caspasi 3 e della disfunzione mitocondriale. Parallelamente si ha l'attivazione delle difese endogene rappresentate da HO-1 e SOD, dovuta alla incrementata traslocazione nucleare e trascrizione di Nrf-2 (76).

Altro fitochimico del tè verde, precedentemente trattato, di sicuro interesse nella difesa antiossidante della pelle è EGCG. Uno studio ha riportato come l'assunzione EGCG aumenta la tolleranza in vivo della cute alla radiazione UVB, aumentando il livelli di MED nei pazienti.

In modelli murini si è riscontrato come l'applicazione topica di EGCG inibisce l'ossidazione delle proteine in condizioni di radiazione UVB a dose acuta o cronica. (77). Il pretrattamento su pelle murina con EGCG ha dimostrato, in un altro esperimento, come diminuivano le infiltrazioni di leucociti CD⁺11b indotte da radiazione UVB. Queste infiltrazioni aumentavano i livelli cutanei di perossido di idrogeno e NO, aumentando lo stress ossidativo cutaneo (77).

Questa serie di effetti inibitori contro i ROS UVB indotti nella cute dei vari fitochimici del tè verde hanno come effetto una diminuzione della cascata pro-infiammatoria nella cute e un'adeguata diminuzione della fotocarcinogenesi. A conferma di ciò, nello studio di *Afaq et al*, si è osservato che il trattamento topico con EGCG diminuisce i metaboliti delle prostaglandine, principalmente PGE₂, principale marker pro-infiammatorio e proliferativo nelle sindromi della cute.(78)

GLUCOSINOLATI

Ultima classe di fitochimici molto nota per le capacità antiossidante, antinfiammatorio e anti cancro.

Sono presenti nelle piante della famiglia crucifere, verdure alle quali appartengono: broccoli, cavoli, cavolini di Bruxelles etc.

I glucosinolati hanno una struttura composta da uno scaffold di β -D-tioglucozio con un gruppo sulfonato (Fig. 42), un gruppo ossima e catene laterali derivanti da amminoacidi come metionina, triptofano, etc.

La loro presenza sotto questa forma nelle specie vegetali precedentemente riportate è inattiva: essi hanno bisogno di essere processati da enzimi vegetali come la mirosinasi per ottenere le molecole bioattive, i sulforafani (SFR).

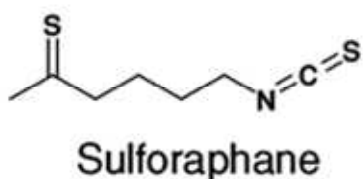


Figura 42 Struttura chimica caratteristica della molecola sulforafano

Questi ultimi composti sono oggetto di studio e pubblicazioni riguardo i suddetti effetti e i meccanismi coinvolti.

Numerosi studi ne esaltano l'effetto antiossidante, questo effetto però non è esercitato direttamente dalla capacità intrinseca della molecola stessa di disattivare e di inibire i ROS prodotti durante particolari stati patologici (cancro, infiammazione).

In vitro si nota come i SFR aumentino lo stress ossidativo e la produzione di radicali soprattutto ad alto dosaggio.

Questo effetto, al contrario, svolge un ruolo ormetico sulle nostre difese antiossidanti. L'ormesi infatti è quel fenomeno che alcune molecole o agenti stressanti hanno sui nostri sistemi di difesa endogeni. Infatti con piccole dosi di molecole ormetiche si ottiene un effetto di stimolazione e aumento dei sistemi detossificanti. (79)

Questo fenomeno approfondito negli ultimi anni è dipendente dalla concentrazione delle molecole utilizzate. Grazie a questo fenomeno, i SFR, attraverso un aumento di specie ROS espletano il loro effetto antiossidante e antitumorale in vitro e in vivo. Come vedremo in seguito il ruolo centrale è l'accumulo di ROS, che non sempre funge da agente dannoso e favorisce lo squilibrio redox cellulare.

A livello di difese antiossidanti i SFR promuovono l'espressione di enzimi di fase II ad alto potere detossificante, invece per quegli enzimi in fase I si registra una diminuzione di espressione. Questo favorirebbe come conseguenza la rimozione di cellule neoplastiche dall'organismo (Fig. 43).

Altra applicazione del sulforafano ha riguardato lo studio dello stress ossidativo fotoindotto in vitro, in questo studio si sono sensibilizzate le cellule trattandole con 6 tioguanato (immunosoppressore), un composto fotosensibilizzante (con radiazione UVA). La somministrazione del fitochimico isotiocianato ha permesso l'inibizione dello stress ossidativo UVA-stimolato. Nello specifico si è individuato una netta diminuzione dei ROS fotoprodotti, con aumento dell'espressione di Nrf2 senza blocco dell' assorbimento del composto fotosensibilizzante(80).

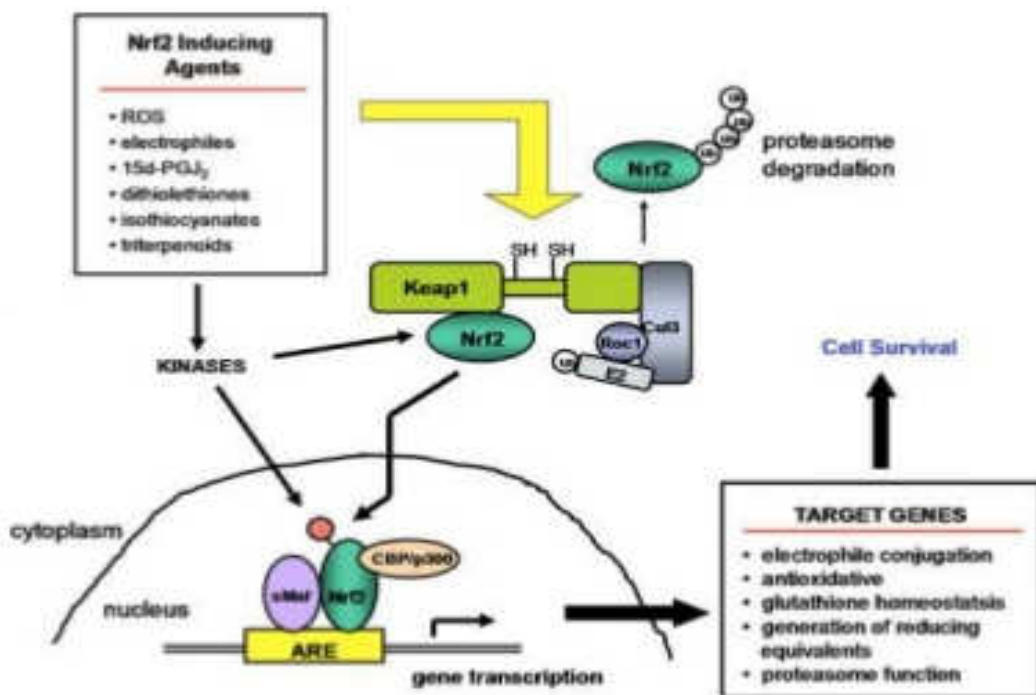


Figura 43 Grafico di come il sulforafano (Agente attivatore di Nrf2) influenzi l'attivazione di Nrf2, il quale nella sua forma attiva può traslocare nel nucleo e iniziare la trascrizione dei geni (fase II) per l'espressione di enzimi detossificanti.

Altro studio a supporto dell'attività fotoprotettiva del sulforafano ha testato l'attività fotoprotettiva del sulforafano e di un altro fitochimico isotiocianato (PEITC) su campioni di pelle ex vivo combinata con cellule HaCaT.

I campioni sono stati irraggiati con una dose di UVR (300 mJ/cm^2), poi sono analizzati rispetto ai livelli di espressione di Nrf2 e degli enzimi da esso modulati HO-1, NQO-1, γ GCS. Il trattamento con i due fitochimici appartenenti agli isotiocianati ha dimostrato come l'effetto antiossidante contro la radiazione UV, da loro espletato ha coinciso con un'aumentata attività di Nrf2 e espressione dei suddetti enzimi (78)

Altro esperimento a supporto dell'attività fotoprotettiva dei sulforafani ha dimostrato in vivo su modelli murini sottoposti a radiazioni UV ripetute nel tempo, come l'applicazione di preparati topici a base di estratti di broccoli, ricchi di SFR, permettesse l'induzione di enzimi detossificanti come la NQO1 (NADPH-quinone ossidoreduttasi 1) e l'inibizione della MPO cutanea (mieloperossidasi) rilasciati dalle difese immunitarie UV sensibilizzate. Nello stesso studio si è rilevato anche l'effetto fotoprotettivo in vivo su volontari umani sottoposti a diverso range di UVR (300 a 800 mJ/cm^2) su appositi spot cutanei di controllo e trattati con differenti concentrazioni di estratto e solo solvente (200, 400, 600, 800 nM di estratto). In questo test clinico si è confermato come il sulforafano nell'estratto di broccoli inibisse l'eritema solare mediamente del 37,7%. (80)

INFLAMMAGING E MODELLI IN VITRO

INFLAMMAGING

Uno dei meccanismi alla base dello stress ossidativo è il declino delle difese antiossidanti e l'accumulo di ROS che a loro volta possono fungere loro stessi da mediatori e segnali per alcuni pathways o risposte cellulari che attivano fenomeni degenerativi nel tempo.

Queste risposte o meccanismi indotti dai ROS possono essere la causa nel tempo di sindromi o malattie croniche.

Questo calo degli elementi antiossidanti è collegato al fenomeno dell'invecchiamento (aging), che sia di natura intrinseco o estrinseco, infatti con questa condizione assistiamo al declino funzionale cellulare dei suoi meccanismi di difesa e di crescita cellulare.

Fin dai tempi della teoria dell'invecchiamento ROS-dipendente proposta da Harman si è focalizzata l'attenzione dei ricercatori sul ruolo dei radicali liberi nell'omeostasi cellulare.

Harman, infatti, per primo ha riconosciuto ai ROS prodotti dai mitocondri durante la il processo di respirazione e produzione di ATP, l'indiziato principale come causa scatenante dell'invecchiamento cellulare.

Riprendendo la teoria di Harman, la produzione di ROS mitocondriali non più controllata dai normali sistemi detossificanti è così capace di alterare proteine, lipidi e DNA nelle loro vicinanze.

I ROS eccedentialterano i complessi enzimatici presenti nel mitocondrio, inoltre i radicali reagendo con il DNA mitocondriale (mtDNA) lo modificano, dando luogo a espressioni di proteine mitocondriali difettosi. Esse, a loro volta, non operando più in condizioni fisiologiche nella respirazione mitocondriale producono sempre più ROS.(81)

Questo fenomeno, come affermava Harman, crea un circolo vizioso nella respirazione mitocondriale, inteso come alterazione del sistema di trasporto elettronico ETC.

L'accumulo di ROS non detossificati è strettamente correlato all'attivazione della cascata pro-infiammatoria.

I principali elementi di questo network infiammatorio ROS-indotto sono: gli elementi corpuscolati del sistema immunitario macrofagi, cellule del complemento etc., le citochine infiammatorie quali IL-1, IL6, IL8, TNF-alfa, e i fattori di trascrizione come NF-kB.(82)

Questi livelli di molecole pro-infiammatorie, stimolate nel tempo, possono portare in vari distretti corporei al progredire dei fenomeni degenerativi tipici dell'invecchiamento.

Per questa stretta correlazione fra risposta infiammatoria e invecchiamento, che sia intrinseco o estrinseco, viene coniato il termine di Inflammaging

Questa condizione è stata introdotta da una decina di anni, viene definita, da Franceschi et al, come un basso grado di infiammazione cronica, dovuto ad uno squilibrio fra le componenti anti-infiammatorie e quelle pro-infiammatorie.(81)

Questo complesso fenomeno metabolico e molecolare è stato visto avere numerosi stimoli e cause dovute alla condivisione di alcuni segnali infiammatori presenti in vari pathways.

Una di queste cause del rilascio cronico di segnali e messaggeri pro-infiammatori è l'invecchiamento inteso come senescenza cellulare.

La cellula senescente, a causa anche di un accumulo di ROS, attiva nel suo interno dei mediatori caratteristici, quali p21, p16, p53 etc. per l'arresto del ciclo cellulare e l'inizio di una fase di quiescenza prolungata.

Essa però modifica il suo metabolismo attivando segnali molecolari come NF-κB che grazie al suo vasto network inducono il rilascio di citochine infiammatorie come IL-1, IL6, IL-8, IL10, COX 2 etc. Questo fenotipo escretorio tipico della senescenza è detto SASP.

Questi segnali pro-infiammatori se non controbilanciati da pathways anti infiammatori possono predisporre verso una infiammazione cronica che porta patologie degenerative.

In tutti i tessuti possiamo avere fenomeni di inflammaging come accumulo di materiale degradato dovuto ad agenti stressanti esterni come radiazioni UV o ROS indotti, oppure l'accumulo di cellule senescenti SASP.

Un esempio di tessuto che risente del meccanismo di inflammaging è il sistema cute, infatti in ogni suo compartimento si possono avere dei fenomeni infiammatori cronici mediati e causati da diverse vie. Il processo di inflammaging nell'apparato tegumentario può avvenire, ad esempio, attraverso la radiazione UV, che scatena una serie di meccanismi e mediatori biochimici vari. Nello specifico, gli UV attivano la produzione di ROS, di citochine infiammatorie e inducono la morte cellulare o l'entrata in apoptosi. Questi ultimi effetti possono essere l'inizio del fenomeno infiammatorio cronico, infatti le cellule del complemento riconoscono i lipidi ossidati delle membrane danneggiate come ligandi. A fronte di questa interazione, il complemento attivato continua la cascata infiammatoria, richiamando i macrofagi i quali attivano a loro volta la produzione di ROS, citochine infiammatorie e MMPs degradanti il collagene. Questo meccanismo pro-infiammatorio UV indotto può diventare cronico a seconda della durata e intensità della radiazione UV o a seconda dell'

invecchiamento cellulare di fibroblasti e cheratinociti, i quali subiscono i danni da radiazione (90). Questo effetto degli UV viene più volte supportato da esperimenti in vitro in cui si sono trovati aumenti di infiltrazioni di cellule del complemento e macrofagi su giunzioni desmosomiali epidermiche (83)

Quello riportato è solo un esempio delle svariate vie di induzione che possono portare alla comparsa di un fenotipo caratteristico per una pelle sottoposta ad infiammazione aging-indotta.

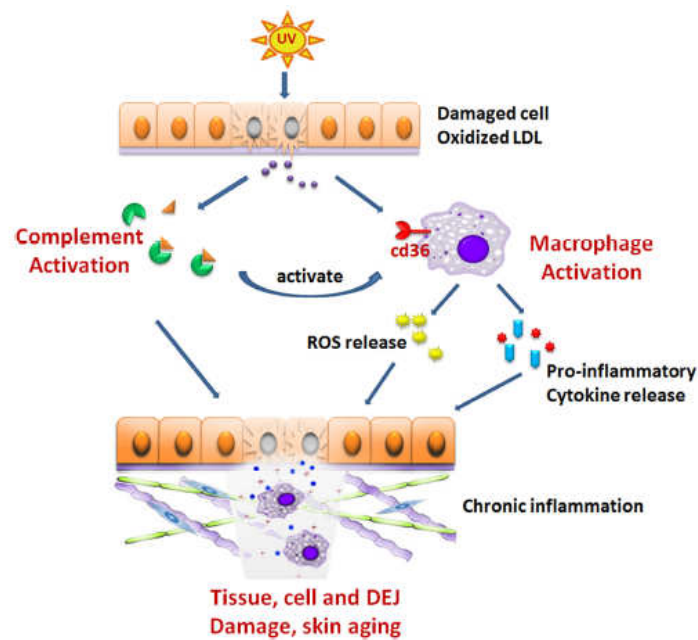


Figura 44 Schema dell'induzione di infiammazione cronica ,scatenata dalla radiazione UV, nella cute. In questo pathway sono coinvolte cellule del sistema immunitario (complemento C e macrofagi) che rilasciano citochine infiammatorie, ROS e si infiltrano negli strati dermici alterando lo scaffold della matrice amorfa.

MODELLO DI INVECCHIAMENTO IN VITRO

Una volta avviata la fitta rete di segnali e messaggi pro-infiammatori il nostro organismo a livello fenotipico presenterà delle caratteristiche peculiari.

A livello di tessuti ci focalizzeremo sul sistema pelle inteso come studio su colture di fibroblasti di derma umano (HuDe). Infatti la pelle è un ottimo modello per caratterizzare e studiare lo stress ossidativo e l'infiammazione da esso indotta.

I processi descritti si riscontrano normalmente sul sistema cute. Infatti la pelle rappresenta un microambiente, sottoposta a insulti esterni quali radiazioni, xenobiotici ambientali capaci di indurre specie formazione di ROS e RNS che possono danneggiare le biomolecole cellulari presenti nell'epidermide e nel derma, provocando un accumulo di prodotti ossidati a livello di DNA, lipidi e proteine.

L'esempio fondamentale è il fotodanno indotto dalle componenti della radiazione UV, questo stimolo esterno danneggia la barriera biologica costituita dalla cute, alterando le proteine e le molecole biologiche degli strati epidermici e dermici. Questa alterazione dovuta alla fotosensibilizzazione di alcune molecole determina la produzione di un'ingente quantità di ROS-fotoindotti negli strati più profondi che attiveranno meccanismi molecolari come NF- κ B, AP-1, che a loro volta innescheranno il rilascio di citochine pro-infiammatorie nella cute. Questo si ripercuoterà a livello fenotipico con la comparsa dei classici segni o inestetismi cutanei dovuti all'invecchiamento foto-indotto: rughe, pigmentazione irregolare, macchie senili e fenomeni di tipo infiammatorio come eritemi o scottature.

Al fine di valutare i meccanismi alla base di questi effetti biochimici ed il potenziale effetto protettivo di principi attivi naturali, abbiamo impiegato un modello in vitro di fibroblasti del derma umano sottoposto a radiazione UVA, in alternativa a test in vivo su modelli animali. Questo fornisce dei vantaggi metodologici, ma è soprattutto in linea con la ultime direttiva in tema di sperimentazione cosmetica, che bandiscono la sperimentazione animale per i prodotti cosmetici. Le conseguenze di questa direttiva sono nell'immediato l'impossibilità di testare composti di nuova sintesi, in quanto non è possibile accertarne in maniera dettagliata la sicurezza per l'utilizzo nell'uomo; inoltre si rendono necessari degli strumenti di indagine validati con metodi alternativi. A questo fine sono stati proposti metodi che prevedono l'impiego di colture cellulari che tuttavia stanno muovendo i primi passi verso l'accreditamento e la loro implementazione nelle misure di routine. Il presente lavoro di tesi di Dottorato, si inserisce in questo contesto proponendo

un'impianto sperimentale basato su un modello in vitro di foto invecchiamento impiegato per lo screening di molecole naturali ad attività antiossidante e antiinfiammatoria.

DIRETTIVA 1229/2013

Come accennato nel sotto capitolo precedente i fibroblasti in vitro sono un ottimo modello di invecchiamento in vitro dove studiare i meccanismi pro ossidanti e pro-infiammatori.

Questi fenomeni riguardano anche l'effetto citotossico e la biocompatibilità di alcune materie prime in ambito cosmetico e farmaceutico. In questi campi per molte sostanze , si sono utilizzati modelli in vitro per dimostrare effetti anti-aging e protettivi riguardanti la diminuzione della profondità delle rughe, diminuzione fenomeniinfiammatori, miglioramento dello stato di idratazione e diminuzione dello stress ossidativo cutaneo.

Questi test sono parallelamente condotti a test di sicurezza e tolleranza delle materie prime o dei prodotti finiti. I test validati in vivo, tramite modello animale hanno riguardato:

Test corrosione cutanea

Test fototossicità acuta

Test irritazione cutanea

Test mutagenicità e genotossicità

Test tossicità acuta

Test irritazione oculare

Test tossicità a dosi ripetute per: sensibilizzazione cutanea, tossicità sub-cronica, tossicità sub-acuta, tossicità cronica e carcinogenesi

Tossicità riproduttiva

Tossicocinetica

Si riportano quelli più utilizzati, prima che il nuovo regolamento varato dal parlamento Europeo (CEE 1223/2009), ne vietasse e ne eliminasse la maggior parte. Infatti la normativa europea 1223/2009 vieta di usare modelli animali per testare prodotti finiti e ingredienti singoli, questo fin dal 2004 nel mondo della ricerca cosmetica (Fig. 45). La normativa, ormai definitiva (dall' 11 Marzo 2013), sempre per il mondo cosmetico, vieta addirittura la commercializzazione dei prodotti finiti contenenti ingredienti testati su animali.

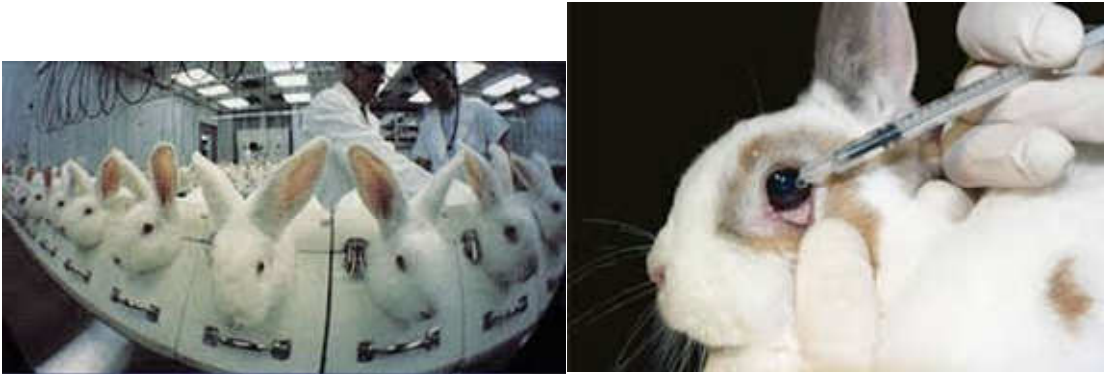


Figura 45 Immagini di cavie animali, impiegate per i test di sicurezza su materiali e prodotti cosmetici.

Questa direttiva UE ha aperto la strada alla validazione di test alternativi in vitro, che non prevedano l'uso di modelli animali. La maggior parte degli studi oggi vengono condotti mediante l'impiego di cute ricostruita in laboratorio come Episkin o Epiderm. Questi, tuttavia, oltre ad essere molto costosi, sono poco standardizzati. In alternativa si stanno sviluppando numerosi saggi che usano colture in vitro come i fibroblasti, cellule dendritiche e globuli rossi per diversi test di fototossicità o sensibilizzazione cutanea. Ad oggi il centro europeo ECVAM (Centro valutazione metodi alternativi in vitro) ha validato in vitro solo i primi quattro test riportati nell'elenco precedente; gli altri sono in corso di implementazione e sviluppo, vista anche l'elevata complessità degli end-point da verificare.

SCOPO DELLA TESI

Il principale obiettivo del presente lavoro ha riguardato lo studio delle proprietà antiossidanti e antiinfiammatorie di molecole di varia natura: sintetiche, naturali o semi naturali su modelli di fibroblasti umani foto-invecchiati.

Questa ricerca è stata sviluppata in collaborazione con l'azienda chimica farmaceutica Angelini A C R A F spa, in collaborazione con la quale abbiamo potuto selezionare alcune molecole con potenziale effetto anti-invecchiamento presenti nel mercato delle materie prime ad uso cosmetico e farmaceutico.

Da un punto di vista sperimentale preliminarmente abbiamo individuato, tramite saggi di citotossicità, quali concentrazioni di materie prime erano biocompatibili con il modello in vitro. Subito dopo abbiamo testato il loro potere antiossidante rispetto ad un agente stressante noto per i suoi effetti come il perossido di idrogeno.

Nella seconda parte abbiamo messo a punto il modello di foto-invecchiamento UVA-indotto nelle colture di fibroblasti umani, selezionando dosi di irraggiamento che produceva effetti sub-letali. Infine abbiamo testato le sostanze alle concentrazioni biocompatibili in termini di prevenzione (pre-incubazione) e recupero (post-incubazione) dal fotodanno mediato dagli UVA.

Le sostanze con il più alto effetto antiossidante, confermato anche mediante test del potere antiossidante in vitro (ORAC), sono state valutate relativamente alla loro efficacia nel ridurre i livelli di ROS-UVA indotti.

In ultimo abbiamo allestito un saggio anti-infiammatorio su fibroblasti di derma umano stimolati con lipopolisaccaride di *E. coli* (LPS) misurando i livelli di espressione delle principali citochine coinvolte nel meccanismo infiammatorio del derma e la capacità di ridurre l'espressione da parte dei composti fitochimici in esame.

Questa indagine ha permesso di identificare i composti più efficaci dal punto di vista antiinfiammatorio.

Nell'ultima fase dello studio, abbiamo selezionato i composti più efficaci sia da un punto di vista anti-infiammatorio che antiossidante per testare l'effetto di miscela ad azione antiossidante verso il foto invecchiamento, nell'intento di verificare un eventuale effetto sinergico.

Questa ultima fase poneva le basi per uno sviluppo di una nuova combinazione di principi attivi che potesse supportare un doppio claim antiinfiammatorio e antiossidante sulla cute con possibili sviluppi per la realizzazione di un brevetto di formulazione.

Per questo motivo i principi attivi presentati nello studio non saranno riportati con il loro nome, non verranno descritte le caratteristiche chimiche e non verranno citati i fornitori. Si presenteranno i composti con una semplice numerazione e la descrizione della specie di appartenenza in maniera generica.

MATERIALI E METODI

COLTURE CELLULARI

Fibroblasti di derma umano (HUDE, Istituto Zooprofilattico Brescia) coltivati su fiasche da 75 cm² con terreno di coltura MEM al 10% FBS (Siero fetale bovino, Carlo Erba, South American Origin), additivato con penicillina (100U/ml), streptomina (100ug/ml) e glutammina (2mM). Le cellule sono lasciate crescere in incubatore Heraeus BB15 (Thermo Scientific) a 37°C con 5% CO₂

Ai fibroblasti, durante la fase di crescita, venivano cambiati i terreni di coltura ogni due o tre giorni. Una volta che si raggiungeva una confluenza dell'80% circa venivano tripsinizzati e trasferiti in un'altra fiasca. Per gli esperimenti il range di passaggi utilizzati va dall'ottavo al ventesimo. Ogni semina in f75 cm² aveva una densità di 14x10³ cellule/cm².

PRINCIPI ATTIVI

Le molecole sono presenti sul mercato cosmetico o farmaceutico. Possono essere di varia natura: di sintesi, estratti naturali titolati o molecole semi sintetiche:

Sostanza 1

Fitochimico naturale che vanta proprietà antiossidanti e ringiovanenti in vitro (fibroblasti, cheratinociti ecc). Grazie alla capacità scavenging (sequestrante) verso i ROS e chelante nei confronti metalli, forma complessi inerti che terminano la reazione radicalica di propagazione. Questo effetto inibisce la perossidazione lipidica.

Sostanza 2

Flavonoide con forte potere antiinfiammatorio. In alcuni lavori viene riportato l'effetto inibitorio in vitro nei confronti di TNF-alfa, iNOS indotti dopo trattamento con Lipopolisaccaride. Altri segnali da esso inibiti possono essere le chinasi ERK, MAPK 38 e Nfk-B.

Sostanza 3

Prodotto puro al 95%, molecola a struttura terpenica. Ha un'azione simile al retinolo e vanta proprietà antiossidanti e antiinfiammatorie in vitro.

Sostanza 4

Estratto idro solubile vegetale, contenente un'alta percentuale di Omega 3. Vanta un'azione antiossidante contro il foto-danno e un'azione antiinfiammatoria unita ad un effetto lenitivo.

Sostanza 5

Estratto vegetale contenente proteina ad attività enzimatica antiossidante. Questo enzima è noto per il suo alto effetto detossificante contro ROS di varia natura.

Sostanza 6

Materia prima liquida contenente il 10% del principio attivo. Quest'ultimo è un peptide che vanta diverse proprietà benefiche per la cute. La prima riguarda il suo potere antiossidante e protettivo verso stimoli pro-ossidanti e anche verso il DNA. La seconda proprietà riguarda il suo potere anti-glicante in grado di proteggere, insieme alla funzione antiossidante, le proteine strutturali della cute. A livello di prodotto cosmetico queste due proprietà comportano un effetto lenitivo sulla cute.

Sostanza 7 Trolox (Sigma Aldrich)

Derivato idrosolubile del tocoferolo, caratterizzato da attività antiossidante. Protegge le membrane dalla perossidazione lipidica ed ha un effetto sinergico in concomitanza con l'ascorbato. Viene usato letteratura come riferimento in questo studio in quanto largamente impiegato in letteratura antiossidante di riferimento.

Sostanza 8

Estratto naturale idrosolubile ottenuto dalla polpa dell'olivo. Ha una concentrazione polifenolica di almeno il 10%. Fra questi ci sono dei derivati della tirosina e un complesso esterificato della famiglia dei glicosidi. Questo prodotto vanta proprietà antiossidanti contro la perossidazione lipidica ed è usato anche come integratore.

Sostanza 9

Estratto naturale dalla polpa dell'olivo. Questo estratto ha un alto contenuto di polifenoli, circa il 30%, tra cui i più attivi sono dei derivati tirosinici e glicosidici. Questo prodotto ha un forte effetto antiossidante e grazie alla protezione dell'ossidazione delle LDL, espleta un effetto cardioprotettivo.

CITOFUORIMETRIA A FLUSSO

Si tratta di una tecnica che permette di contare e discriminare le cellule a seconda della loro struttura e morfologia. Le cellule o elementi corpuscolati vengono aspirati mediante un capillare che permette di ricreare un flusso laminare, durante il quale vengono eccitate da uno o più laser .

Una volta eccitate, il segnale emesso è catturato da foto rilevatori che ne permettono, tramite determinati software, la traduzione in segnale digitale e quindi in dato.

Lo strumento in questione è un citofluorimetro a flusso Guava Easycyte 5HT (Merck Millipore), presenta due raggi laser eccitanti uno blu (488nm) e uno rosso (642 nm).

Per l'analisi si utilizza il software Easycyte Guava (Millipore) La luce incidente del laser viene prima di tutto diffusa dalla cellula grazie a fenomeni fisici di rifrazione, riflessione (side scatter) e diffrazione (forward scatter). Queste proprietà forniscono informazioni circa la dimensioni e la complessità cellulare fornendo informazioni circa la distruzione delle cellule in relazione alla morfologia cellulare.

I due laser a differenti lunghezze d'onda sono in grado di eccitare fluorocromi incorporati dalle cellule fornendo informazioni riguardo a diversi marker biochimici quali la vitalità cellulare, l'apoptosi, lo stato redox intracellulare e la funzionalità mitocondriale riportati in dettaglio sotto.

SAGGIO DI CITOTOSSICITÀ

L'analisi viene effettuata tramite citofluorimetria a flusso e i campioni vengono trattati con una miscela di sonde il Guava Viacount kit (Merck, Millipore).

Questa soluzione è la combinazione di due sonde capaci di discriminare le popolazioni di cellule vive, morte e apoptotiche. Nello specifico la prima sonda è permeabile alla membrana cellulare ed è un intercalante del DNA grazie al quale è possibile discriminare misurazione tutte le cellule nucleate da debris e frammenti cellulari.

La seconda sonda, impermeabile alle membrane, colora intercalandosi al DNA, solo le cellule con membrane cellulari integre e quindi vitali. Una colorazione intermedia è indice di una alterazione delle membrane compatibile con i primi stadi di apoptosi (in analogia con il test dello ioduro di propidio sopravvitali).

I fibroblasti vengono coltivati su multiwell da 24 ad una concentrazione di 20000-25000 cellule/well, sono fatti crescere per 4-5 giorni cambiando il terreno ogni due giorni, fino a raggiungere una confluenza dell'80%.

Le cellule poi venivano successivamente incubate per 24 h con i fitocomposti in analisi in un range di concentrazione logaritmica. Come controllo sono state impiegate cellule incubate con solo veicolante alla concentrazione più alta e/o con solo mezzo di coltura.

Dopo l'incubazione si lavano le cellule con PBS, poi si staccando dalla piastra mediante trattamento con tripsina e si raccolgono i campioni mediante centrifugazione per 5 min a 600 g risospesi in ultimo in circa 50 ul.

Un' aliquota di 15ul e viene veniva successivamente diluita dieci volte, in una soluzione di PBS e Via count al 20% (Merck Millipore), nella quale veniva incubata peralmeno 5 min per consentire la colorazione.

La sospensione cellulare veniva infine letta in citofluorimetria (Guava Easycyte, Merck Millipore) ed i dati rappresentati mediante dotplot mediante il software Guava EasyCyte (Fig.46), nei quali ogni evento viene rappresentato da un punto lungo un grafico bidimensionale composto dal canale giallo sulle ascisse (Yellow, Y) e dal canale rosso sulle ordinate (Red, R).

Questa rappresentazione grafica permette di dividere la popolazione cellulare in percentuale rispetto a tre regioni: regione (R-/Y-) cellule non nucleate o debris, regione (R+/Y+) cellule morte e regione (R+/Y-) cellule vive. Un'ulteriore distinzione considerazione può essere fatta relativamente alle cellule moderatamente gialle, le quali indicano una regione di cellule apoptotiche.

In base a queste analisi è stato possibile identificare le concentrazioni biocompatibili, definite da una soglia di mortalità inferiore al 20%. Per ciascuna sostanza riporteremo la massima concentrazione che produceva tali livelli accettabili di mortalità "concentrazione A". A partire da questa concentrazione sono state nominate successivamente le diluizioni scalari con lettere progressive in ordine alfabetico (A/2=B; A/4=C; A/8=D; A/16=E).

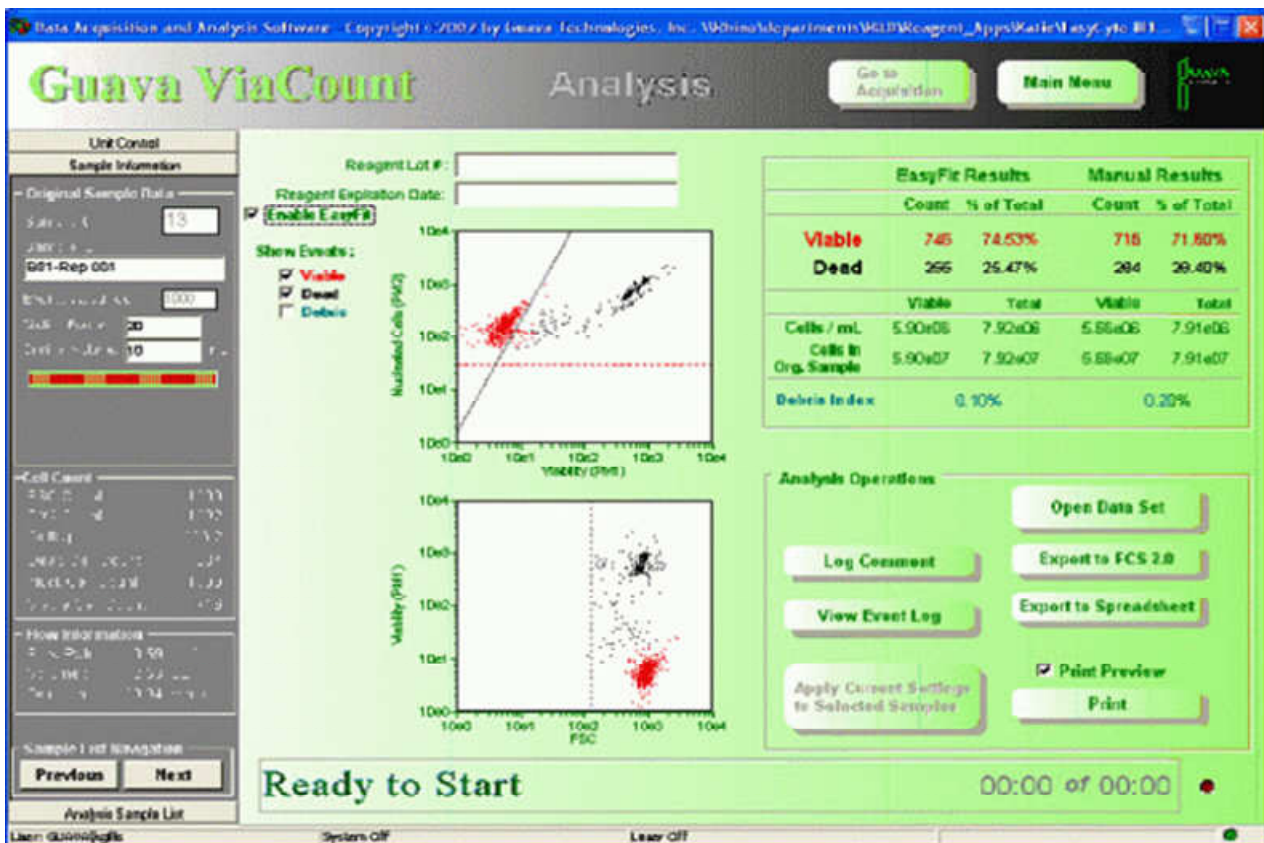


Figura 46 Schermata del Software Guava per il saggio con VIACOUNT. La popolazione di cellule è inquadrata in due differenti grafici in cui si individuano le popolazioni vive (rosso) e quelle morte (nero).

MISURAZIONE ROS INTRACELLULARI

Per la rilevazione delle specie reattive dell'ossigeno cellulari è stata impiegata la Diclorofluoresceina–diacetato ridotta (DFCDA-H₂) una sonda ridotta legata a due gruppi acetilici, in questa forma viene definita *leuco* in quanto non fluorescente.

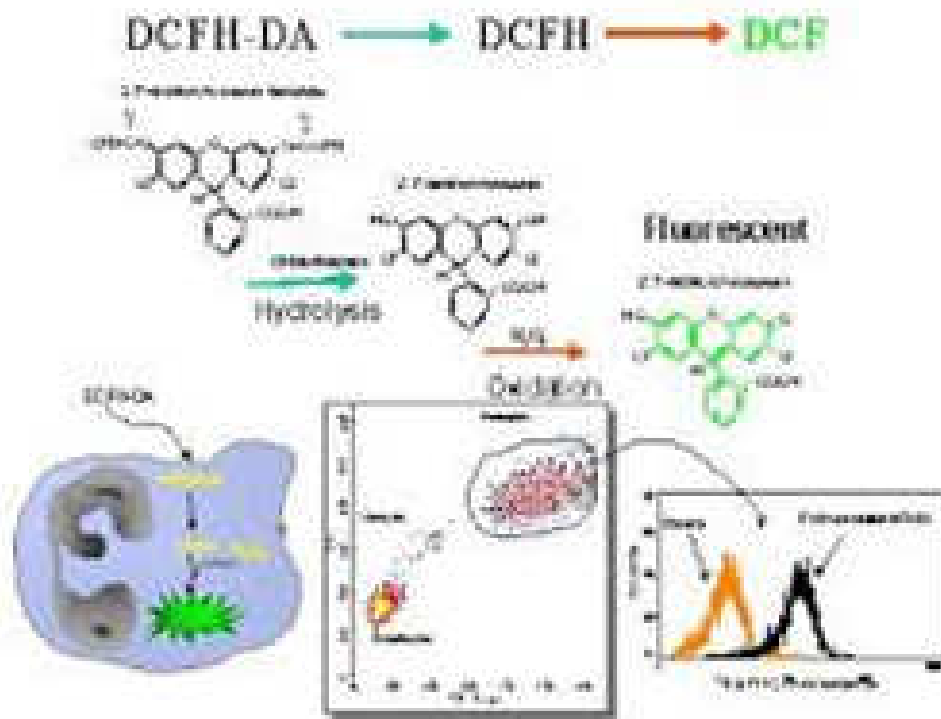


Figura 47 Struttura chimica della sonda in forma inattiva e in forma attiva. Analisi citofluorimetrica rappresentata una classica distribuzione delle cellule in relazione all'intensità della fluorescenza.

La sonda penetra all'interno del compartimento cellulare e viene idrolizzata per produrre la forma DCFH₂ attiva impermeabile alle membrane plasmatiche, pertanto in questa forma rimane intrappolata dentro alle cellule. In presenza di ROS intracellulari la sonda viene ossidata producendo la forma attiva DCF fluorescente nel verde. L'intensità di fluorescenza risulta pertanto proporzionale all'accumulo di ROS intracellulari (Fig.47).

Le distribuzioni delle popolazioni in base alla fluorescenza verde vengono rappresentate mediante istogrammi che riportano in ascisse i canali di fluorescenza ed in ordinate il numero di eventi. L'impiego del software Easycyte consente successivamente di calcolare la percentuale di cellule appartenenti a regioni, definite arbitrariamente sulla base di esperimenti pilota di riferimento, relative a diversi livelli di produzione di ROS.

Le misure preliminari sono state condotte su fibroblasti irradiati e non irradiati, al fine di rilevare il segnale della DCF nel canale verde proporzionale al massimo accumulo di ROS. La differenza di distribuzione di segnale fra il controllo negativo nella parte sinistra del plot o parte con minor intensità di segnale e il controllo positivo nella parte destra del plot, ci permette di impostare arbitrariamente tre intervalli (gate) definire che caratterizzano le popolazioni cellulari (Fig. 48)

Le regioni prese in considerazione sono:

Regione LOW ROS: regione che comprende il 50% delle cellule del controllo negativo con basso contenuto di ROS.

Regione MID ROS: regione che coincide con la percentuale di cellule tra le due regioni. Di solito coincide con la porzione di cellule con un' intensità di verde medio alta.

Regione HIGH ROS: regione che comprende il 50% delle cellule del controllo positivo. Il segnale verde è molto alto, l'accumulo di ROS è elevato.

Questa impostazione delle regioni con diversa percentuale di cellule ed emissione di segnale viene standardizzata e tenuta fissa per tutte le analisi successive di fotoinvecchiamento.

Tutti i campioni sono stati contrastati tramite colorazione con VIA COUNTal fine di misurare la fluorescenza della DCF solo nelle cellule vitali, evitando falsi negativi dovuti a fuoriuscita di fluoro cromo attivato dalle cellule con membrana plasmatica compromessa(84).

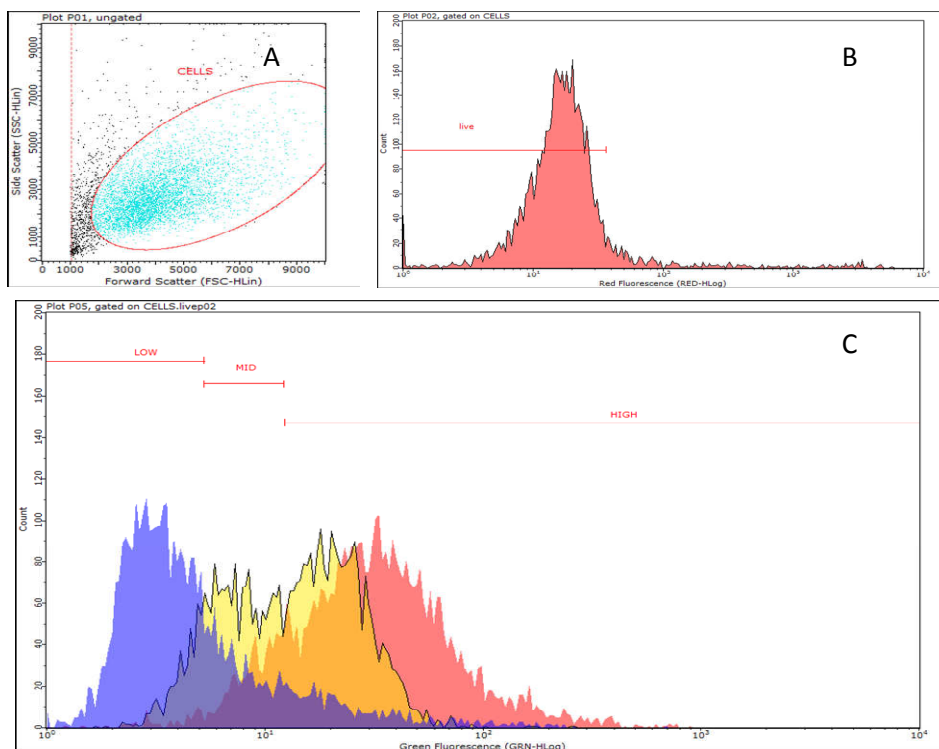


Figura 48 Analisi citofluorimetrica di fibroblasti foto irraggiati. A) distribuzione di cellule a seconda della loro morfologia (Forward e side scatter). B) Distribuzione delle cellule in relazione alla fluorescenza verde della DCF. C) Overlay di distribuzione di cellule Ctrl-UVA (blu), Ctrl+UVA (rosso) e campione trattato con sostanza (giallo). Nello stesso grafico sono riportati i gate per la quantificazione della percentuale di cellule con diverso contenuto di ROS (LOW, MID, HIGH).

INDUZIONE DI ROS INTRACELLULARI CON PEROSSIDO DI IDROGENO (STRESS CHIMICO)

I fibroblasti venivano coltivati su mw24 (20000-25000 cellule/well) per 4 o 5 giorni fino a raggiungere la confluenza e successivamente incubate con i composti fitochimici disciolti nel mezzo di coltura alle rispettive concentrazioni biocompatibili selezionate a partire dalla concentrazione B.

Queste sono concentrazioni pari alla metà delle concentrazioni A, in quanto operando in maniera conservativa si voleva rimanere al di sotto della soglia di mortalità del 20%. Al fine di ridurre il rischio di ottenere artefatti sperimentali. L'incubazione con i composti avveniva per 24h e successivamente le cellule venivano lavate con PBS. Le cellule venivano quindi incubate con DCFH₂DA 10μM a 37°C per 30 min al buio e successivamente lavate con PBS.

L'esposizione allo stimolo ossidante avviene tramite esposizione a H₂O₂ 2mM per 30 min a 37°C al buio. Al termine dell' incubazione i campioni venivano lavati con PBS, staccati con tripsina, lavati tramite centrifugazione e mantenuti in ghiaccio, per evitare ulteriore ossidazione della DCFH, prima della lettura al citofluorimetro della sospensione contrastata con viacount per escludere le cellule morte o con membrane compromesse.

Nell'analisi dei risultati si applicavano le regioni HIGH, MID e LOW ROS, illustrato nel punto precedente.

SAGGIO FOTODANNO UVA INDOTTO

1. SELEZIONE DEL MIGLIOR TEMPO DI ANALISI DOPO LO STIMOLO FOTOSSIDANTE (TIME RECOVERY)

Per evitare il rumore eccessivo dei radicali prodotti immediatamente dopo l'esposizione, gli esperimenti di valutazione dei livelli intracellulari di ROS sono stati condotti dopo un intervallo di tempo che consentisse di quantificare al meglio lo stato redox intracellulare al raggiungimento dell'omeostasi tra i sistemi di produzione ed i sistemi antiossidanti endogeni ed esogeni introdotti. Al fine di standardizzare questa procedura sono state allestite parallelamente piastre di fibroblasti irradiate con UVA a dose 25,7J/cm² (14min) confrontate con altre piastre tenute al buio.

Colture confluenti di fibroblasti su multiwell da 24 lavate dal mezzo di coltura e mantenute in PBS, coperte da una lastra di quarzo, venivano collocate su base metallica immersa in ghiaccio ed esposta alla radiazione di una lampada UVA (Philips Original Home Solarium sun lamp model HB406/A; Philips, Groningen, Holland) perpendicolare alla piastra ad una distanza di 20cm. L'energia prodotta dalla lampada è stata misurata con un Radiometro UV Power Pack (EIT Inc., Sterling, USA) insieme allo spettro di emissione della stessa mediante uno spettroradiometro portatile Stellar-Net (Tampa, FL, USA) come descritto in *Venditti et al;*(85).

La dose di radiazione UVA impiegata derivava da esperimenti condotti in precedenza presso il laboratorio ed equivalgono alla radiazione prodotta da 90 minuti di esposizione in una giornata di mezza estate in Costa azzurra (86).

Successivamente i livelli intracellulari di ROS venivano quantificati ad intervalli standard di 0,2,4,8,24 ore.

Per questi esperimenti riguardanti il fotodanno la diclorofluoresceina veniva aggiunta dopo lo stress UVA-indotto. Tale test ha consentito di monitorare le variazioni nei livelli intracellulari di ROS nei tempi successivi all'esposizione alla radiazione UVA. Ed in particolare per quanto tempo permanessero dei livelli significativamente elevati rispetto ai controlli

2. *SELEZIONE DOSE DI IRRAGGIAMENTO (TIME COURSE)*

Successivamente, dopo aver individuato con il tempo massimo dopo l'esposizione per quantificare livelli di stress ossidativo significativamente aumentato, abbiamo modulato il test al fine di identificare la massima dose di irraggiamento che allo stesso tempo producesse effetti sub-letali (vitalità > 80%). A tale fine sono state applicate i seguenti tempi di irraggiamento (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 min). I campioni venivano analizzati relativamente al contenuto di ROS impiegando il saggio con DCFH₂DA descritto precedentemente.

3. FOTOSTABILITÀ

L'impiego dei fotocomposti è stato studiato sia preincubando i campioni per 24 ore prima dell'irraggiamento che tramite incubazione post esposizione. Al fine di verificare la fotostabilità dei principi attivi gli stessi venivano stock solubilizzati in etanolo puro e gli spettri di assorbanza venivano misurati tra 250 a 500 nm prima e dopo l'esposizione ad una dose di UVA 36,6J/cm². La fotostabilità veniva determinata nella misura del decadimento del principale picco dello spettro irraggiato rispetto a quello non irraggiato, stabilendo un cut-off massimo del 10% oltre il quale le sostanze venivano considerate foto instabili.

Ruolo protettivo dei fotocomposti verso lo stress ossidativo indotto da UVA

I fibroblasti a confluenza venivano incubati con i principi attivi per 24 ore prima dell'esposizione con UVA (pre-trattamento) o nelle ore immediatamente successive (post-trattamento).

Le concentrazioni utilizzate erano le stesse impiegate per il saggio di protezione antiossidante con perossido di idrogeno (concentrazioni B).

Nel saggio con incubazione pre-irraggiamento i principi vengono aggiunti nel mezzo di coltura 24 ore prima; in seguito vengono rimossi per irradiare i fibroblasti in PBS alla dose di 36,6J/cm² di UVA (20min) che è risultata la più efficace nell'indurre stress ossidativo in condizioni subletali. L'analisi tramite DCF e VIA COUNT viene effettuata dopo che i fibroblasti, successivamente allo stress, sono lasciati nel mezzo di coltura per 24h. In questa parte del saggio si analizzerà l'effetto preventivo delle sostanze fotostabili nel bloccare o sequestrare i ROS foto-indotti rispetto ai controlli positivi (incubati con solo mezzo).

Nei test post-trattamenti composti fitochimici disciolti nel mezzo subito venivano aggiunti alle cellule dopo la foto-esposizione, a dosi di 36,6 J/cm², per verificare la loro efficacia antiossidante nel riequilibrare lo stato redox rispetto ai controlli positivi 24 ore dopo l'esposizione.

L'analisi dei dati ha consentito di classificare i principi attivi in relazione alla loro efficacia antiossidante verso ROS-UVA.

Nell'ambito della valutazione dell'efficacia antiossidante delle miscele le sostanze sono state aggiunte sia prima che dopo l'esposizione con UVA. In questi esperimenti sono state impiegate miscele di sostanze efficaci sia verso il foto-danno che verso stimoli pro-infiammatori. In particolare lo studio prevedeva l'analisi dei composti singoli e delle

combinazioni. Scopo principale dell'ultima parte dello studio era evidenziare un effetto combinatorio o pseudo-sinergico.

SAGGIO ORAC

Mediante questo test è possibile valutare il potere antiossidante totale di miscele di composti. Questa tecnica è molto utilizzata per studiare il potere antiossidante di vari composti presenti su matrici differenti come alimenti, cosmetici, farmaci etc. Nello specifico il saggio misura la capacità antiossidante di un composto o di una miscela di composti, nel prevenire l'ossidazione della fluoresceina, da parte di forme radicali che prodotte dalla degradazione dell'AAPH. (2,2'-Azobis(2-amidinopropanoDiidrocloreuro), un diazocomposto che grazie al calore è in grado di produrre radicali perossilici. L'ossidazione della fluoresceina determina la scomparsa della fluorescenza emessa. La reazione di ossidazione sonda viene rallentata dalla presenza di antiossidanti nella miscela.

Il saggio prevede l'uso del bianco, un campione di controllo positivo con la sola presenza di sonda e AAPH e l'utilizzo di una scala di standard composta da diverse concentrazioni di Trolox, usati come riferimento.

La reazione fluorescente viene rilevata tramite microlettore di piastra a fluorescenze (Sinergy Biotek). I risultati sono calcolati valutando l'area sotto la curva (AUC) delle varie condizioni, che consentono di costruire una curva associando tali AUC alle concentrazioni di Trolox relative ad una scala degli standard. (Fig.49). Il potere antiossidante di una soluzione incognita verrà espresso quindi come concentrazioni di μmol Trolox equivalenti (μmol Trolox eq).

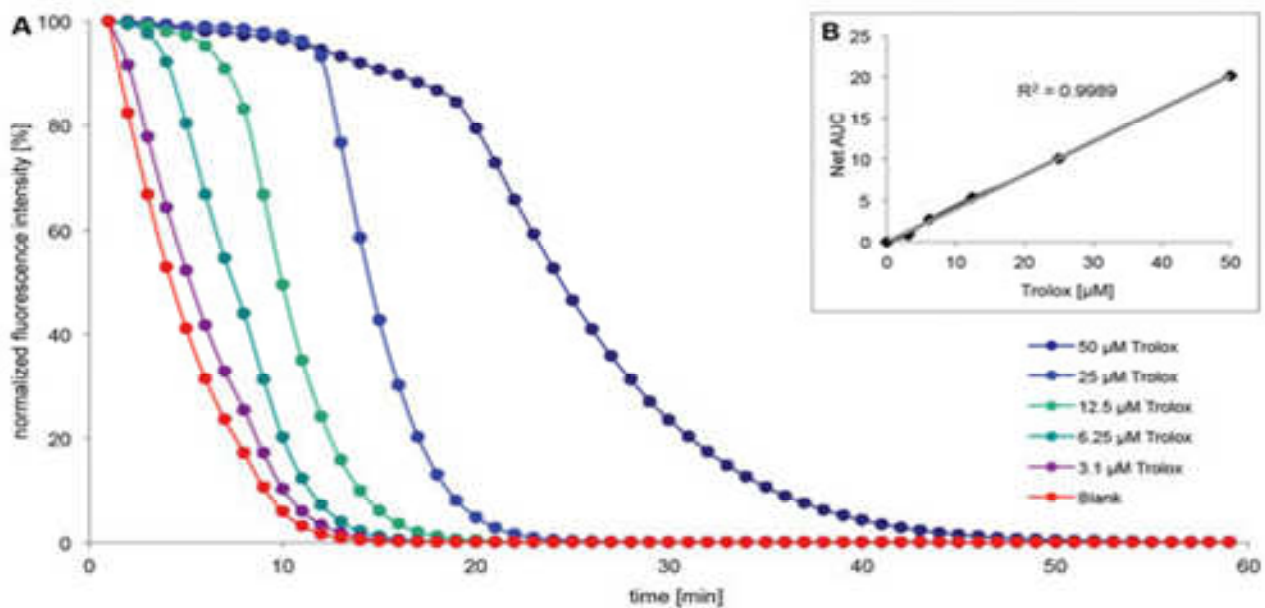


Figura 49 Grafico tipico di un'analisi ORAC con l'intensità di fluorescenza in funzione del tempo, da notare i diversi andamenti dei campioni caratteristici dell'efficacia antiossidante di ogni composto, intesa come aumento del segnale della fluorescenza

Il saggio è stato adattato nel nostro laboratorio per studiare l'attività antiossidante di varie molecole (fitochimici, cofattori lipofili, vitamine, etc) secondo il modello proposto da *Brugè et al.*: (87)

Nell'ambito di questa tesi è stato testato il potere antiossidante dei vari principi attivi in un sistema cell-free. In particolare, una volta ottenuti i valori di umol di Trolox equivalenti per ciascuna sostanza, è stato valutato il potere antiossidante di miscele impiegando volumi paria a 25 umol Trolox equivalenti.

il saggio ORAC consentiva di confrontare il potere antiossidante di sostanze singole e delle miscele in rapporto 1:1. Se il potere antiossidante delle miscele era superiore a quanto atteso dalla somma teorica dei singoli composti. si aveva una indicazione di un potenziale effetto combinatorio di fatto superiore ad un effetto additivo.

SAGGIO ANTIINFIAMMATORIO CON LPS

1. CITOTOSSICITÀ LPS

La citotossicità dell'LPS di *E. coli* è stata preliminarmente testata al fine di identificare le modalità di esposizione sub-letali. La vitalità è stata misurata tramite analisi citofluorimetrica con VIA COUNT (Merck, Millipore) al fine di identificare le concentrazioni ed i tempi di esposizione che producevano una vitalità superiore al 80%.

L'esposizione con LPS è stata verificata a 3 o 6h di esposizione in un range di concentrazione definito da 10000 ng/ml a 10ng/ml.

2. CITOTOSSICITÀ BISABOLOLO

Nel nostro modello sperimentale il bisabololo è stato impiegato come molecola di riferimento ad attività antinfiammatoria (controllo positivo). Questa molecola, nota in letteratura per il suo effetto anti-infiammatorio, è usata in prodotti cosmetici e farmaceutici come lenitivo e calmante verso l'irritazione cutanea.(124) La citotossicità del bisabololo è stata verificata in seguito ad esposizione per 24 h nel range di concentrazioni (300, 150, 125, 100, 80, 0 uM) al fine di identificare le concentrazioni sub letali (vitalità >80%) Per le successive indagini relative all'attività anti-infiammatoria il bisabololo è stato preincubato per 24 ore in analogie con le altre sostanze ad una concentrazione di 100 uM

Al fine di sviluppare un modello di stress pro-infiammatorio si è impiegato il disegno sperimentale descritto da Junfei *et al* incubando i fibroblasti con lipopolisaccaride derivato da *E.coli*(LPS) verificando l'espressione dell' interleuchina 6 (IL-6) principale citochina infiammatoria presente nella pelle (88). Fibroblasti coltivati cresciuti a confluenza su multiwell da 6, venivano incubati con LPS nel seguente range di concentrazioni 10-100 ng/ml per 3-6 ore. I composti fitochimici sono stati testati alle concentrazioni B nel mezzo di coltura per 24 h. Durante le ultime tre ore veniva aggiunto LPS 10ng/ml.

Dai fibroblasti, trattati con i fitocomposti e sensibilizzati con l'endotossina, veniva estratto l'RNA totale con NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel) seguendo le istruzioni del fornitore. Si verificava, poi, la purezza e la concentrazione dell'RNA tramite micro-spettrofotometro Nanodrop. Successivamente si caricavano all'incirca 500 ng di RNA totale per retrotrascriverli a cDNA, impiegando il kitiScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Nello specifico si utilizzavano 20 ul di soluzione composta da 4 ul di 5xScript reaction mix, 1 ul iScript reverse transcriptase, 500 ng di RNA del campione e acqua nuclease free fino ad un volume finale di 20 ul. Infine i cDNA dei campioni si amplificavano con RT-PCR, tramite MyiQ Single Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), usando sonda SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA). Per la Real Time PCR si sono impiegati primer forward e reverse, alla concentrazione di 400 nM. specifici per le citochine infiammatorie caratterizzanti la cuteriportati in tabella 1. I valori di espressione dei geni infiammatori erano misurati come fold di espressione rispetto ad un gene di riferimento house keeping (GAPDH).

La corsa di Real Time PCR prevedeva le seguenti impostazioni: denaturazione di 3 min a 95°C, seguiti da 40 cicli (15 secondi di denaturazione a 95°C, 30 sec di fase di annealing/estensione a 60°C, tranne che per COX-2 e IL-8 con fase annealing/estensione a 64 e 58 °C rispettivamente).

Le efficienze della Real Time PCR erano comprese tra 89% e 104%. L'espressione dei geni delle citochine infiammatorie erano calcolate in relazione ai geni del controllo positivo (Ctrl+LPS), i quali si assumevano avere fold di espressione uguale a 1.

Le condizioni ottimali di esposizione, in termini di dose di LPS e tempi di esposizione, sono state messe a punto valutando l'espressione della citochina IL-6, marker infiammatorio che viene up-regolato durante l'invecchiamento dei tessuti (89,90). Il panel completo di citochine testate nelle condizioni ottimali includeva:

- IL8: chemochina con proprietà chemotattiche capace di richiamare i neutrofili durante la cascata infiammatoria, si trova espressa in molti tessuti: epiteliali, endoteliali etc.(91)
- COX2: cicloossigenasi coinvolta in molti pathways riguardanti la fotoinfiammazione, la fotocarcinogenesi e l'invecchiamento. (92)
- MCP-1o CCL2: chemochina, chemotattica verso monociti e macrofagi, regola la loro migrazione nei tessuti.

CCL2 for	5' GATCTCAGTGCAGAGGCTCG 3'
CCL2 rev	5' TTTGCTTGTCCAGGTGGTCC 3'
COX2for	5' CCGAGGTGTATGTATGAGTGTG 3'
COX2 rev	5' TGAAGTGGGTAAGTATGTAGTGC 3'
IL-8 for	5' CACTGCGCCAACACAGAAAT 3'
IL8 rev	5' TCTCCACAACCCTCTGCACC 3'
IL-6 for	5' AACAACCTGAACCTTCCAAAGATG 3'
IL-6 rev	5' GTAGTGACCAGAAAACCTCAAAC 3'
GAPDH for	5' GAATTTGGCTACAGCAACAGGGTG 3'
GAPDH rev	5' GTCGTTCTCGTGTTCTCCTTCTCT 3'

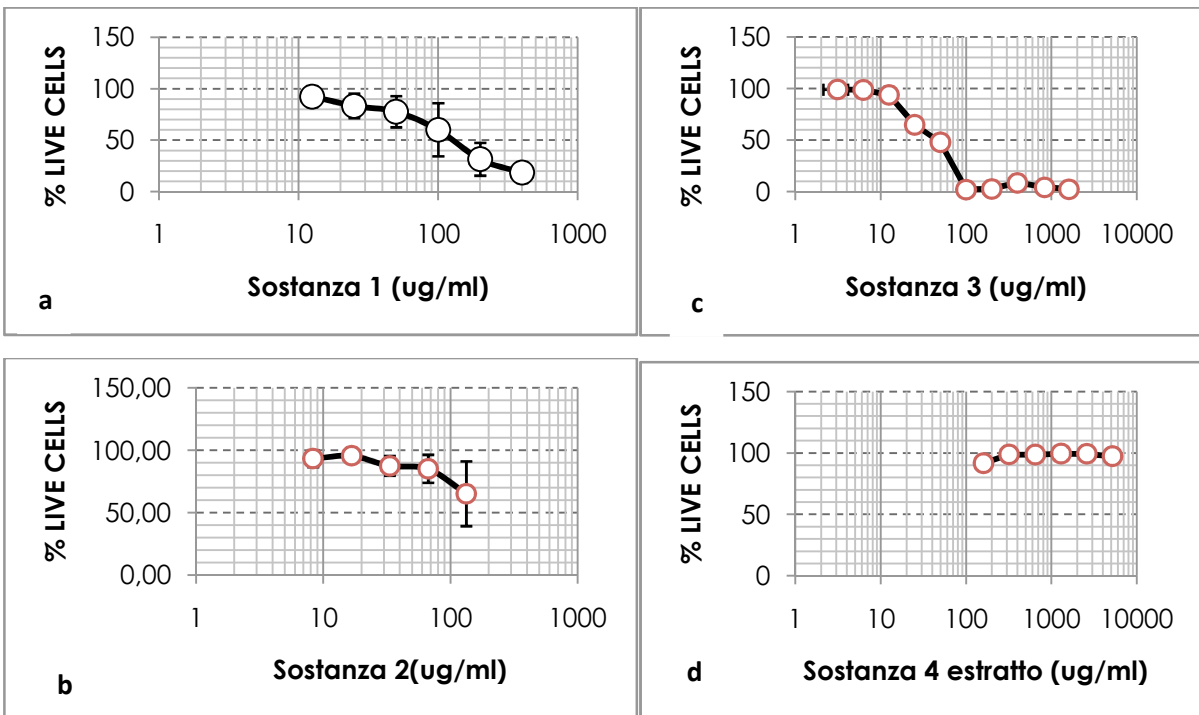
Tab 1 Primers utilizzati per amplificazione geni pro-infiammatori, forward e reverse

Infine una volta che si è disegnato e ottimizzato il saggio pro-infiammatorio con LPS si fanno crescere i fibroblasti a confluenza su multiwell da 6, si trattano per 24 ore con le materie prime e si aggiunge l'endotossina a concentrazioni e tempi stabiliti. Le concentrazioni dei fitochimici utilizzate sono le stesse concentrazioni utilizzate per l'UVA-challenge (concentrazioni B).

RISULTATI

SAGGIO DI CITOTOSSICITÀ

Le concentrazioni massime impiegate per verificare la citossicità nei fibroblasti sono state selezionate secondo quanto riportato in letteratura: e successivamente sono state eseguite delle diluizioni scalari in mezzo di coltura. I risultati dell'analisi della vitalità, misurata in citfluorimetria mediante il test Viacount è riportato nelle figura1a-1i dall'analisi di questi dati è stata ricavata la massima concentrazione non tossica (vitalità >80%) per ciascuna sostanza identificata come concentrazione A.



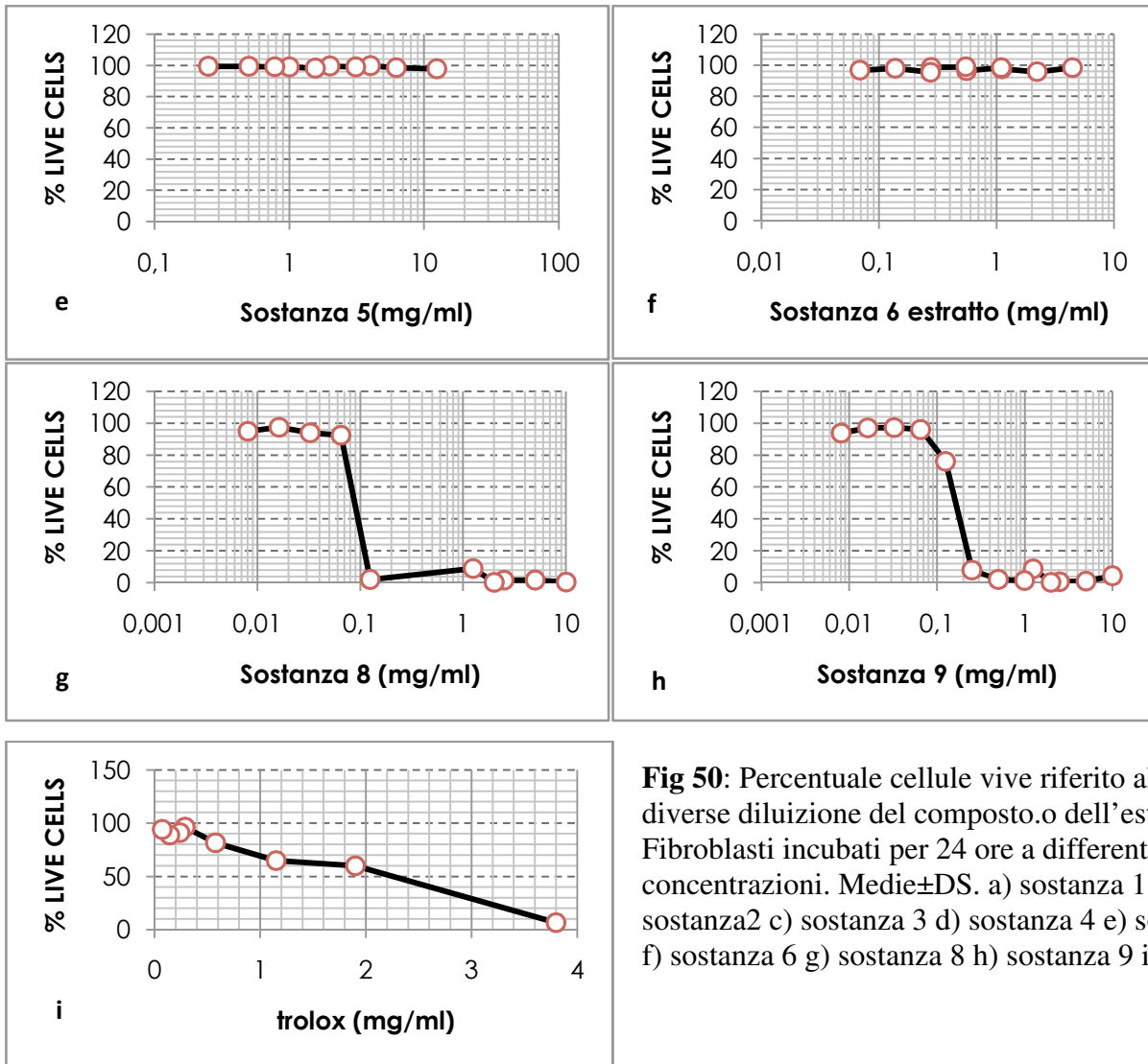


Fig 50: Percentuale cellule vive riferito alle diverse diluizione del composto.o dell'estratto Fibroblasti incubati per 24 ore a differenti concentrazioni. Medie±DS. a) sostanza 1 b) sostanza2 c) sostanza 3 d) sostanza 4 e) sostanza 5 f) sostanza 6 g) sostanza 8 h) sostanza 9 i) trolox.

Tra i principi attivi, alcuni sono considerati puri e altri invece sono delle miscele composte dall'estratto del principi attivo e da altre sostanze funzionali all'efficacia del composto.

Nella selezione riguardante la citotossicità indotta nei fibroblasti ci sono alcuni estratti come i composti 4,5 e 6 (Fig 50 d,e,f) che già ad alte concentrazioni hanno vitalità superiori all'80%.

Al contrario, ci sono degli estratti, come le molecole 8 e 9, che hanno bisogno di ulteriori diluizioni per diminuire significativamente la loro citotossicità.(Fig 50 g,h)

Per quanto riguarda i composti puri 1, 2 e 3 si osserva lo stesso effetto citotossico notevole alle concentrazioni massime iniziali, le quali sono diluite notevolmente per identificare un range bio-compatibile. (Fig 50 a,b,c). Lo stesso composto Trolox, che si userà come riferimento positivo per i

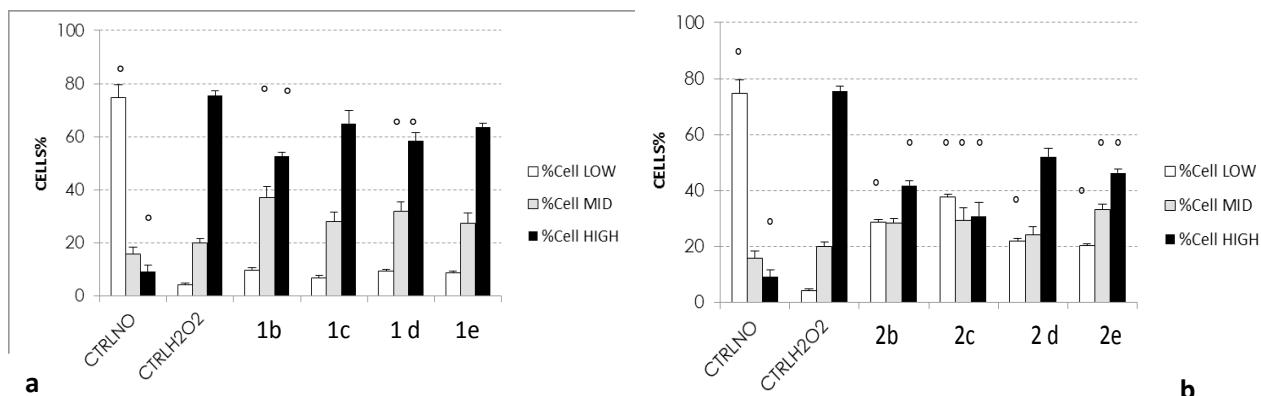
successivi saggi, ad alte concentrazioni presenta una citotossicità elevata e sono necessarie delle diluizioni per renderlo non tossico per i fibroblasti (Fig.50 i). Nella tabella 2 sono riportate le massime concentrazioni biocompatibili (concentrazioni A) per le diverse sostanze.

Sostanza 1	=<12,5 ug/ml
Sostanza 2	=<16,7 ug/ml
Sostanza 3	=<12,5 ug/ml
Sostanza 4	=<5,2 mg/ml di estratto
Sostanza 5	=<12,46 mg/ml
Sostanza 6	=<1,1 mg/ml di estratto
Sostanza 8	=<32,5 ug/ml composto intero
Sostanza 9	=<32,5 ug/ml composto intero
Trolox	=<287 ug/ml

Tab 2 Range di concentrazioni biocompatibili minori o uguali alle concentrazioni massime A

SAGGIO DEL PEROSSIDO DI IDROGENO

Questo test vuole confermare l'azione antiossidante dei composti, i quali sono noti in letteratura per il loro effetto detossificante contro le specie pro-ossidanti. Contemporaneamente si sono usate diluizioni minori rispetto ai range biocompatibili precedenti per identificare le concentrazioni efficaci contro il danno ossidativo indotto dal perossido.



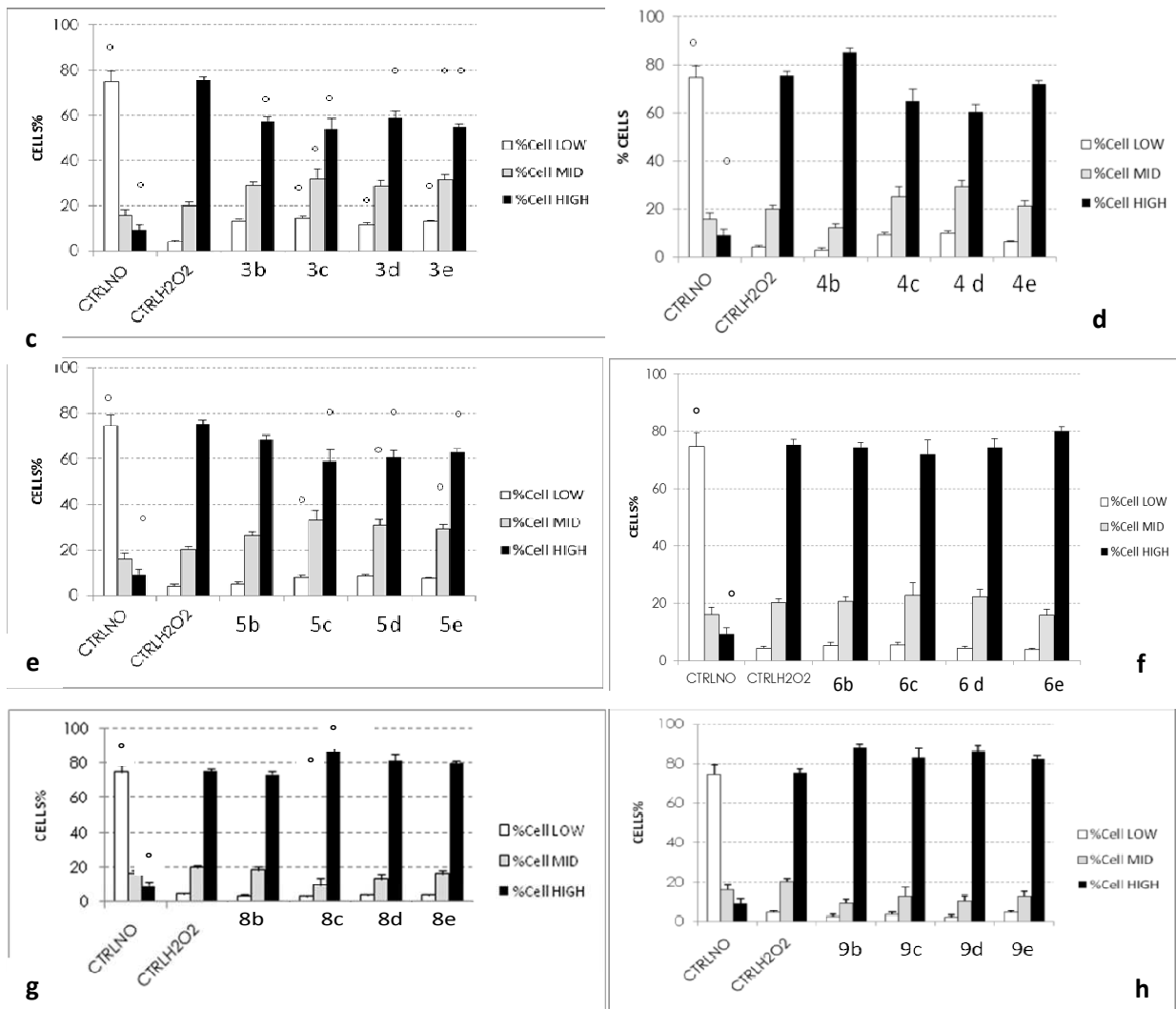


Fig 51 Livelli di ROS delle differenti materie prime, riportati come percentuale di cellule LOW, MID, HIGH. Concentrazioni inferiori alla concentrazione biocompatibili massime ottenute tramite diluizioni scalari b (A/2) c (A/4) d (A/8) e (A/16).

Valori media \pm DS. Significatività vs Ctrl H2O2 (* <0.05 e $^{\circ}<0.01$).

a sostanza 1 b) 6,25 ug /ml c) 3,125 ug /ml d) 1, 625 ug /ml e) 0, 812 ug /ml..

b sostanza 2 b) 8,3 ug /ml c) 4,15 ug /ml d) 2,07 ug /ml e) 1,003 ug /ml

c sostanza 3 b) 6,25 ug /ml c) 3,125 ug /ml d) 1,6 ug /ml e) 0,8 ug /ml

d sostanza 4 b) 2,6 mg/ml c) 1,3 mg/ml d) 0,65mg/ml e) 0,33mg/ml

e sostanza 5 b) 6,23 mg/ml c) 3,12 mg/ml d) 1,56 mg/ml e) 0,78mg/ml.

f sostanza 6 b) 0,55 mg/ml c) 0,275 mg/ml d) 0,135 mg/ml e) 0,065 mg/ml

g sostanza 8 b) 16,25 ug/ml c) 8,12 ug/ml d) 4,06 ug/ml e) 2,03 ug/ml

h sostanza 9 b) 16,25 ug/ml c) 8,12 ug/ml d) 4,06 ug/ml e) 2,03 ug/ml

I risultati ottenuti tramite citofluorimetro e colorazione con DCF, sono riportati come percentuale di cellule: LOW, MID, HIGH caratterizzate da differenti intensità di segnale della DCF e quindi per

contenuto intracellulare di ROS. I composti fitochimici venivano testati a diluizioni scalari della concentrazione B caratteristica di ogni molecola ricavata in relazione al test di citotossicità da A/2 (B) ad A/16 (E).

L'esposizione ad H₂O₂ 2mM per 30 min era in grado di alterare il contenuto intracellulare di ROS, determinando un aumento altamente significativo della percentuale di cellule ad elevato contenuto di ROS che passava da circa il 10% a oltre 70%. Analogamente si assisteva ad una diminuzione di cellule caratterizzate da un basso contenuto di ROS. Tale effetto veniva contrastato in maniera efficace per i composti 1, 2, 3, 5 l'effetto di diminuzione della popolazione HIGH è significativo e molto evidente, soprattutto alle concentrazioni B. (Fig. 51 a,b,c,e).

Le altre materie prime 4, 6, 8, 9 non presentavano un significativo effetto protettivo, (Fig. 51 d, f, g, h). Quest'ultimo effetto è dovuto presumibilmente allo stimolo e alla concentrazione massima di perossido di idrogeno utilizzata nel saggio.

Questo saggio ha consentito una prima classificazione delle sostanze efficaci come antiossidanti nei confronti dello stress ossidativo indotto dal perossido di idrogeno, a supporto degli studi indotti dal foto danno dove lo stimolo era più pertinente al modello del foto invecchiamento sebbene non diretto.

SAGGIO ORAC

In questo saggio sono state misurate in vitro, senza l'incubazione cellulare, la capacità antiossidante dei composti, intesa come capacità di inibire o ritardare la degradazione della fluoresceina ad opera di AAPH. Tutti i valori, grazie ad una scala di standard a diverse concentrazioni di Trolox, sono espressi come umol Trolox eq. Le unità di misura sono rapportate ai grammi di sostanza, (umol Trolox eq/g di sostanza).

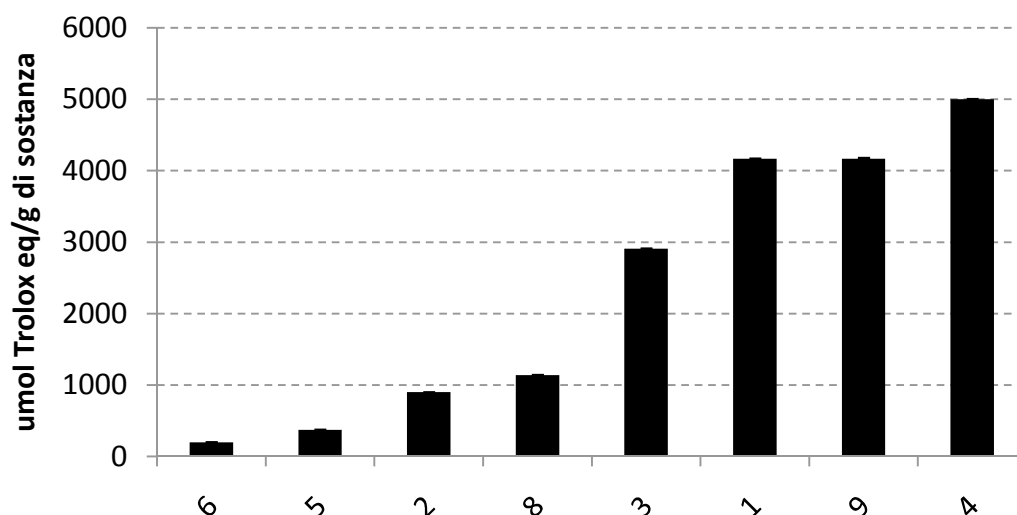


Fig 52 Capacità antiossidante dei diversi composti espressi in $\mu\text{mol Trolox /g}$ sostanza. Dati in $\mu\text{mol Trolox} \pm \text{DS}$.

I dati riportati in figura 18 indicano una notevole differenza in termini di capacità antiossidante dei composti. In particolare i composti 4, 9, 1, 3 hanno dei valori elevati di $\mu\text{mol Trolox}$ rispetto ai composti nella parte più a sinistra del grafico: 2, 5, 6 (Fig 52).

SAGGIO FOTODANNO UVA INDOTTO

1. SELEZIONE DEL MIGLIOR TEMPO DI ANALISI DOPO LO STIMOLO FOTOSSIDANTE (TIME RECOVERY)

Il grafico riportato in figura 53 indica che mentre nelle cellule tenute al buio la distribuzione delle cellule nelle popolazioni a basso (LOW) medio (MID) ed elevato (HIGH) contenuto di ROS rimangono costanti nel tempo. In particolare la regione MID rappresenta a tutti i tempi sperimentali la popolazione principale con una percentuale di cellule attorno all'80%, mentre la regione relativa alle cellule ad elevato contenuto di ROS (HIGH) in media raccoglie un popolazione costante pari al 10% del totale (Fig 53A).

Nelle colture fotoesposte ad una dose di 25,6 J/cm² (14 min) si assisteva ad un significativo aumento della percentuale di cellule ad elevato contenuto di ROS (HIGH) (Fig.53B) immediatamente dopo l'esposizione che raggiungevano livelli pari all'80% contro il 10% dei controlli. Progressivamente nel tempo si riscontra una graduale diminuzione della percentuale di cellule nelle regioni caratterizzate da un maggior stress ossidativo che tuttavia a 24 ore rimangono ancora significativamente diverse rispetto ai controlli avendo un contenuto circa doppio rispetto a queste ultime (20%), e pertanto questo tempo è stato considerato idoneo per i test di post incubazione anche per consentire alle sostanze di operare il loro effetto antiossidante.

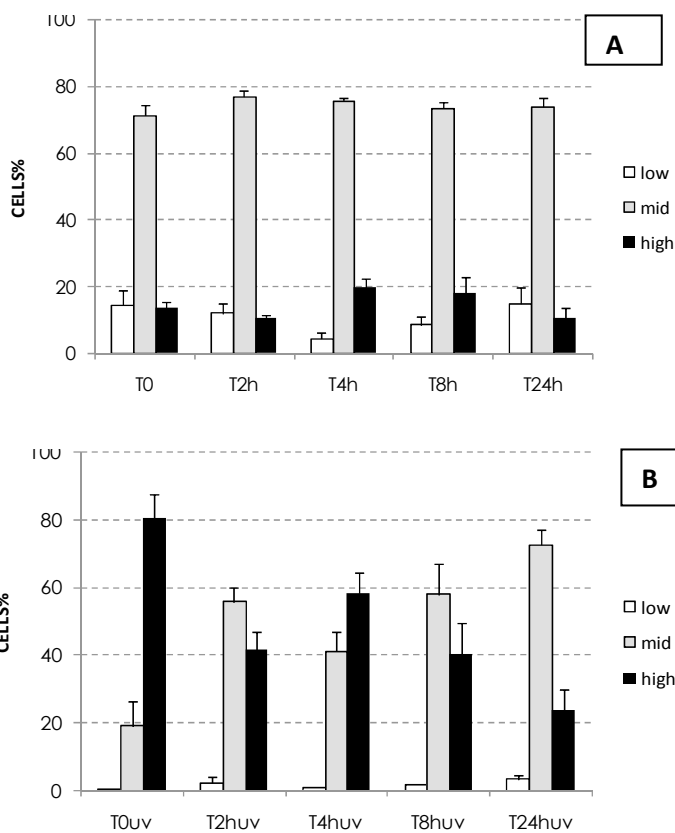


Fig53 Livelli intracellulari di ROS (LOW, MID, HIGH) a diversi tempi di misurazione dopo la fotoesposizione (T0,2,4,8,24h). A) controlli non irraggiati B) cellule irraggiate per 14 min.

2. SELEZIONE DOSE DI IRRAGGIAMENTO (TIME COURSE)

Al fine di massimizzare la risposta si è proceduto a verificare la distribuzione delle cellule in relazione al contenuto di ROS a 24ore in seguito ad esposizione UVA per diversi tempi. Nella figura 54 si può osservare come aumentando la dose di irraggiamento, si osserva una correlazione diretta tra tempo di esposizione e percentuale di cellule ad elevato contenuto di ROS (HIGH). A tempi di esposizione compresi tra 0 e 10 min dei corrispondono basse percentuali di cellule ad elevato contenuto di ROS (20 – 40 % circa), aumentando le dosi oltre i 20 minuti di foto-

esposizione si osserva un aumento di tale popolazione intorno al 60%. La massima percentuale di cellule nella regione HIGH (80%) si raggiunge in seguito ad esposizione delle cellule a radiazione UVA per di 30 minuti.

successivo Nelle medesime condizioni è stata analizzata anche la citotossicità indotta a 24 ore dalle stesse dosi di radiazione (Fig 54). Tempi di esposizione inferiori ai 20 minuti non producevano significativi aumenti della percentuale di cellule morte. La percentuale di cellule apoptotiche tuttavia risultano significativamente aumentate a tempi di esposizione superiori a 15 minuti.(Fig 55) L'analisi combinata dei tre parametri descritti sopra ha consentito pertanto di identificare un tempo di esposizione pari a 20 minuti quale dose di UVA ideale per la quantificazione del' aumento specie intracellulare di ROS a 24 ore dall'esposizione, in condizioni sub-letali(vitalità >80%).

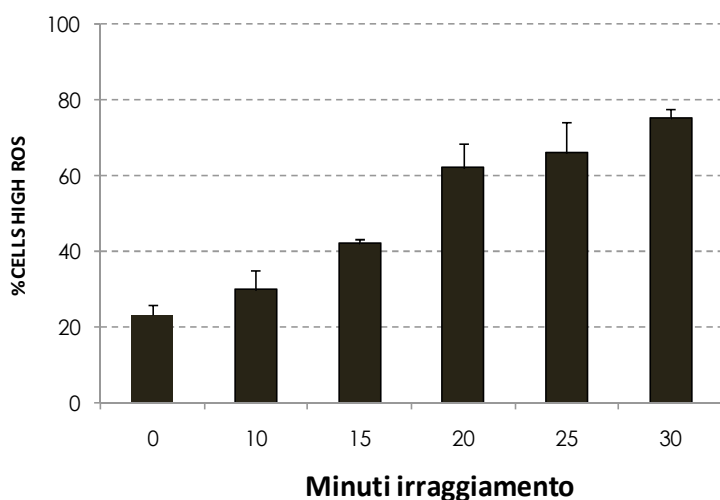


Fig 54 Livelli di cellule con alta presenza di ROS (HIGH) a diversi dosi di irraggiamento, riportate come tempi (0, 10, 15, 20, 25, 30 minuti). Le misurazioni vengono eseguite dopo 24 ore dalla foto-esposizione. Dati±DS

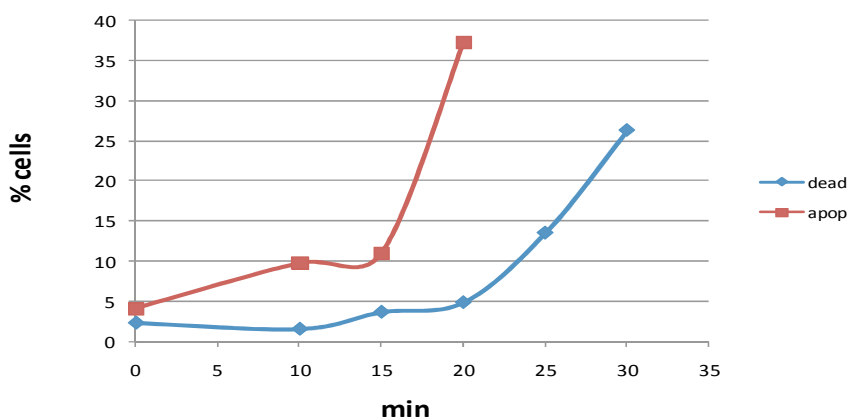


Fig 55 percentuale di cellule morte (blu) e apoptotiche (rosse) a diversi tempi di foto-esposizione .

3. FOTOSTABILITÀ

In figura 3 sono riportati gli spettri di assorbanza dei fotocomposti disciolti in etanolo non irraggiati ed in seguito ad irraggiamento con radiazione UVA per tempi comparabili a quelli impiegati nei test cellulari. La finalità era quella di valutare alterazioni dello spettro quali indici di foto instabilità. In termini quantitativi è stata valutata l'assorbanza del picco massimo e le variazioni dello stesso nelle forme irraggiate e non irraggiate ponendo come cut-off di foto stabilità una variazione massima del 10%. Dall'analisi degli spettri i composti: 1, 3, 9 (Fig 56 a, c, h) sono risultati fotoinstabili ; al contrario i composti fotostabili sono: 2, 4, 5, 6, 8(Fig. 56 b, d, e, f, g).

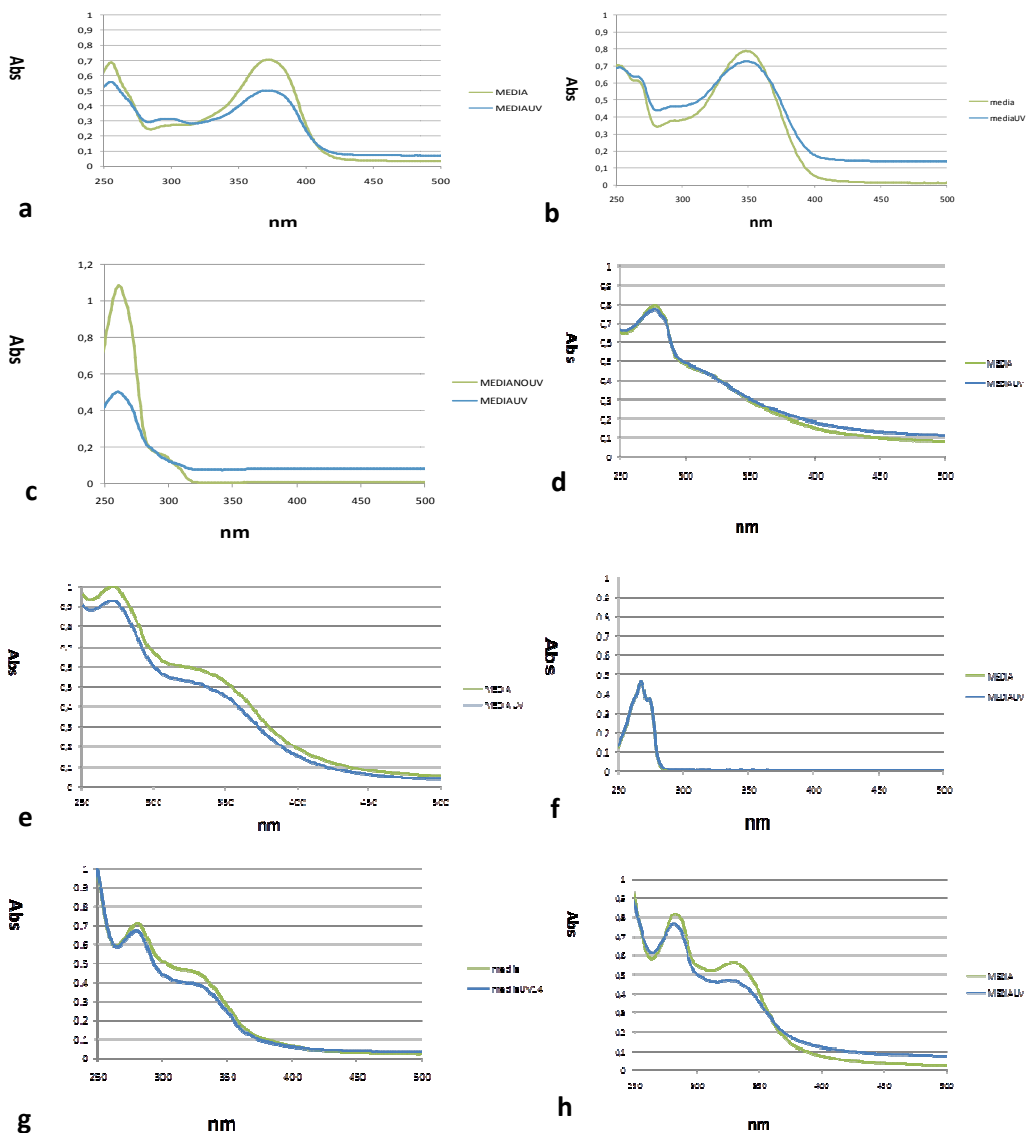


Fig 56

- a) Sostanza 1 assorbanza diminuita dell'21% in corrispondenza del picco a 372 nm
- b) Sostanza 2 assorbanza diminuita dell'8% in corrispondenza del picco a 348 nm
- c) Sostanza 3 assorbanza diminuita dell'54% in corrispondenza del picco a 281nm
- d) Sostanza 4 assorbanza diminuita dell'3% in corrispondenza del picco a 277 nm
- e) Sostanza 5 assorbanza diminuita dell'8% in corrispondenza del picco a 272 nm
- f) Sostanza 6 fotostabile
- g) Sostanza 8 assorbanza diminuita dell'8% in corrispondenza del picco a 300 nm
- h) Sostanza 9 assorbanza diminuita dell'11% in corrispondenza del picco a 329 nm

4. UV CHALLENGE CON I PRINCIPI ATTIVI

Le figure 3 a,b,c,d,e,f,g,h indicano la distribuzione delle cellule in relazione al loro contenuto di ROS dopo 24 ore di esposizione ad una dose di UVA pari a $36,6\text{J}/\text{cm}^2$ (20 min). L'analisi riporta la distribuzione delle cellule di controllo (non irraggiate) contro le cellule irraggiate in assenza ed in presenza dei diversi fotocomposti nelle 24 ore prima delle esposizione (Fig.57) o nelle 24h immediatamente successive (Fig 58). Dall'analisi dei risultati è possibile classificare le molecole rispetto alla loro capacità di minimizzare il contenuto intracellulare di ROS foto indotti.

I fotocomposti venivano testati ad un'unica concentrazione (concentrazione B) specifica per ogni composto e ricavata dal test di citotossicità ed in particolare pari alla metà della massima concentrazione non tossica. I composti con il miglior effetto preventivo (pre-incubazione) verso i ROS foto-indotti, risultavano essere 4, 3, 5, 2 (Figura 57), essendo caratterizzati da una percentuale significativamente inferiore minor della popolazione HIGH (Tabella 3). Gli altri composti presentavano un debole effetto antiossidante non significativo (composti 9 e 1) (Figura 57) (Tabella 3). I composti 8 e 6 non presentavano alcun effetto protettivo in seguito a pre-incubazione.

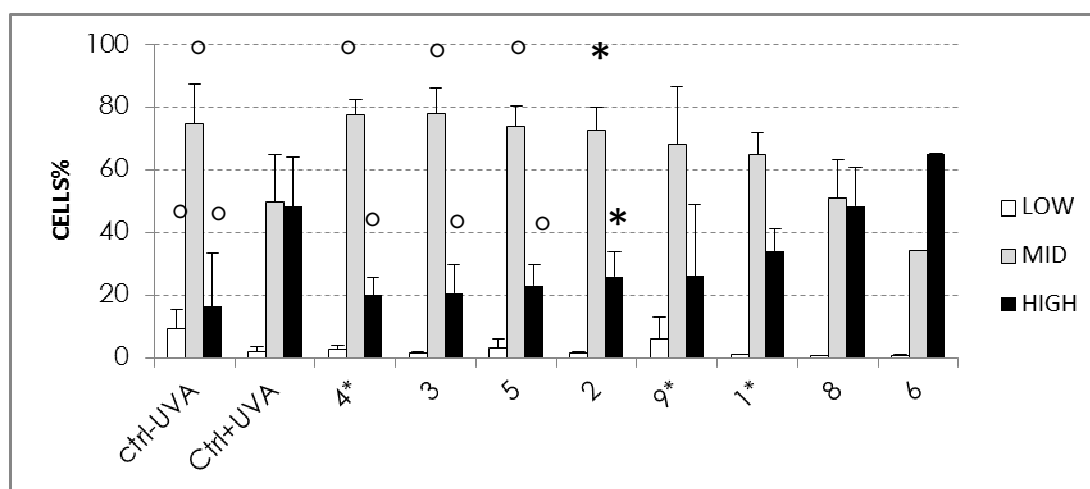


Fig 57 PRE-ESPOSIZIONE Livello di ROS con aggiunta delle sostanze prima trattamento UV. Barra nera: HIGH, barra grigia MID e barra bianca LOW. I dati sono riportate come medie \pm DS. Le sostanze sono disposte in ordine decrescente, rispetto alla elevata capacità di diminuire le HIGH.

Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e analizzate con metodo t-student rispetto a ctrl+UVA. (* $p < 0,05$ significative; ° $p < 0,01$ estremamente)

Campioni (PRE-UV)	%cellule HIGH±DS
Ctrl+UVA	48±16
4	20±6
3*	21±9
5	23±7
2	26±8
9*	26±23
1*	34±7
8	48±13
6	65±0

Tabella 3 Percentuali cellule HIGH riferite al controllo positivo (Ctrl+UVA). Sostanze in ordine crescente riferito al valore HIGH.

La valutazione delle proprietà antiossidanti nella fase di recupero (post-incubazione) sono riportate in Fig 58. I dati indicano che i principi 3, 9, 4 buona presentano una significativa attività antiossidante durante il periodo post irraggiamento, contribuendo a diminuire in maniera significativa la percentuale di cellule nella regione HIGH (Tabella 3). Il composto 1 presenta una minore efficacia, mentre i composti 8, 2, 6, 5 non sembrano giocare un ruolo nel proteggere le cellule dall'insulto ossidativo promosso dalla radiazione UVA (Fig 58 e Tabella 4)

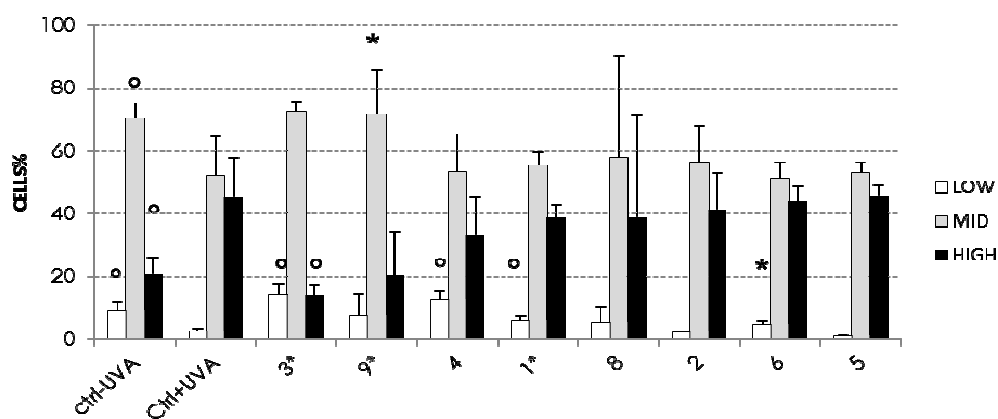


Fig 58 POST-ESPOSIZIONE Livello di ROS con aggiunta delle sostanze dopo trattamento UV. Barra nera: HIGH, barra grigia MID e barra bianca LOW. I dati sono riportate come medie±DS.

Le sostanze sono disposte in ordine decrescente, rispetto alla elevata capacità di diminuire le HIGH.

Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e analizzate con metodo t-student rispetto a ctrl+UVA. (* p<0,05 significative; °p<0,01 estremamente)

Campioni (POST-UVA)	% cellule HIGH±DS
Ctrl+UVA	45±12
3*	14±3
9*	20±14
4	33±12
1*	39±4
8	39±33
2	41±12
6	44±5
5	46±4

Tabella 4 Percentuali cellule HIGH riferite al controllo positivo (Ctrl+UVA). Sostanze in ordine crescente riferito al valore HIGH.

Nel complesso, nei due esperimenti con diverso tempo di incubazione rispetto all'irraggiamento UVA si selezionano le prime tre materie prime efficaci nel prevenire il fotodanno e nel proteggere e nel recuperare dallo stimolo pro-ossidante della radiazione UVA.

Questo pool di materie prime esalta la capacità antiossidante di alcuni principi verso i ROS foto-indotti, sia nel saggio con pre incubazione, che in quello post incubazione. Tra i composti presi in considerazione, grazie a queste caratteristiche, si individuano come molecole efficaci contro il fotoinvecchiamento le materie prime 4, 3, 9.

SAGGIO ANTI-INFIAMMATORIO CON LPS

1. CITOTOSSICITÀ LPS

Come riportato in Fig 32, l'endotossina a diversi range di concentrazione (10-10000 ng/ml) sia a 3h che a 6h di incubazione risulta avere un'elevata biocompatibilità non alterando i livelli di vitalità cellulare a tutte le concentrazioni testate. (Fig.59)

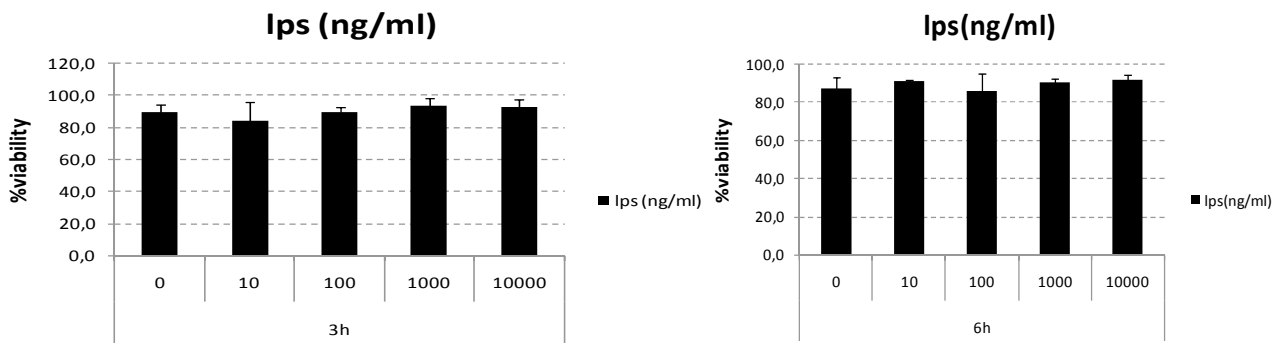


Fig 59 Citotossicità del Lipopolisaccaride (LPS) a diversi tempi di incubazione 3 e 6 h, con differenti concentrazioni (0- 10000 ng/ml).
Dati: Media \pm DS.

2. SELEZIONE MIGLIOR TEMPO DI INCUBAZIONE E CONCENTRAZIONE CON LPS

In figura 60 è riportata l'induzione del gene che codifica per IL 6 in seguito ad esposizione ad LPS 10 e 100 ng/ml dopo 3h e 6h di esposizione.

Questo test preliminare ci ha consentito di identificare la minima concentrazione capace di indurre un aumento significativo dell'espressione del gene che codifica per IL 6 che è risultato essere 10 ng/ml per 3h di incubazione (Fig. 60).

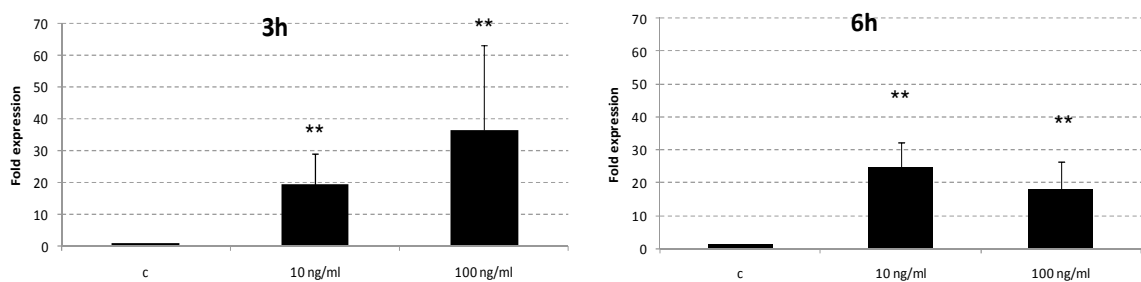


Fig 60 Diversi tempi di incubazione con il Lipopolisaccaride (3 e 6 h) a diverse concentrazioni 10 ng/ml e 100 ng/ml per indurre nei fibroblasti l'espressione di IL 6. Valori normalizzati per il gene di riferimento GAPDH. Dati: Fold espressione \pm DS. Significatività *t-student*: $p < 0.05$ * e $p < 0.01$ **

3. CITOSSICITÀ BISABOLOLO

Analogamente è stata verificata anche la concentrazione non citotossica di Bisabololo, impiegato come riferimento per la sua riconosciuta attività antinfiammatoria. La sostanza è

stata incubata in presenza dei fibroblasti per 24 h in un range di concentrazione 80-400 μM . Come riportato in fig. 61 la vitalità cellulare non risulta significativamente alterata per concentrazioni inferiori a 150 μM

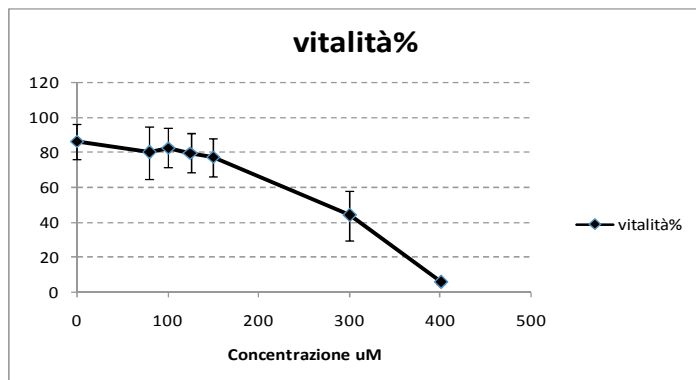


Fig 61 Citotossicità del bisabololo dopo 24 ore di incubazione a differenti concentrazioni (μM). Dati: Media \pm DS

4. POTERE ANTIINFIAMMATORIO DEL BISABOLOLO

Una volta identificate le concentrazioni utili per produrre un insulto pro-infiammatorio con LPS e la massima concentrazione non citotossica di Bisabololo si è proceduto a verificare l'effetto anti-infiammatorio del bisabololo inteso come capacità di limitare l'induzione del gene che codifica per IL6. In particolare i fibroblasti sono stati pre incubati con bisabololo per 24 h ad una concentrazione 100 μM , e successivamente esposti ad LPS 10 ng/ml per 3h. La figura mette in evidenza come il bisabolo abbia un significativo effetto inibitorio sull'espressione di IL-6, dato (Fig 62).

Nello stesso sistema sperimentale è stata altresì verificata l'induzione del gene che codifica per IL8 che risultava notevolmente più indotto rispetto a IL6, fino a 300 volte rispetto al controllo (Fig 62). In questo contesto il bisabololo era in grado di contenere l'induzione di IL 8, sebbene in maniera non significativa.

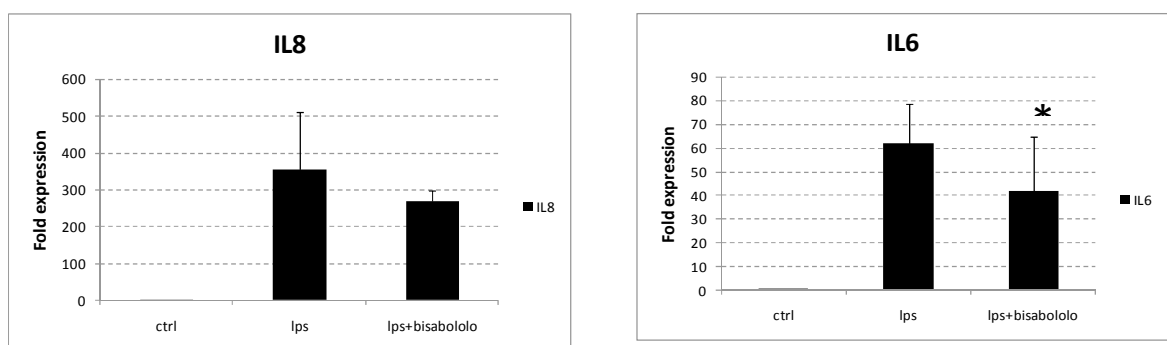


Fig 62 Grafici riferiti all'efficacia del bisabololo nel diminuire l'espressione dell'IL6 e IL 8 dopo 10 ng/ml per 3h con lps. I fibroblasti vengono incubati per 24 ore prima del trattamento bisabololo (100 μM). Valori normalizzati per il gene di riferimento GAPDH. Dati : fold espressione \pm DS Significatività REST2009: $p < 0.05$ * e $p < 0.01$ **

5. SCREENING POTERE ANTI-IFIAMMATORIO DELLE MATERIE PRIME

In seguito alla validazione del test con il bisabololo, come sostanza di riferimento, si è proceduto alla verifica dell'efficacia anti-infiammatoria dei principi attivi oggetto della tesi. Anche in questo caso le sostanze sono state incubate per 24 ore e per ciascuna sostanza è stata impiegata la concentrazione B, riportate nella Fig.51 del saggio con danno ossidativo indotto da perossido, in analogia con gli studi relativi al foto-ageing. L'incubazione con LPS (10ng/ml) è stata eseguita per 3h successivamente all'incubazione con i principi attivi.

Nella figura 63 sono riportati i livelli di espressione dei marker pro-infiammatori COX2, IL6, IL8 e CCL2 o MCP-1 riportati come fold di espressione rispetto all'housekeeping gene GAPDH. I fold di espressione rispetto al campione trattato con LPS sono riportati in ordine decrescente, ed indicano una chiara down-regulation nei campioni di controllo e nella maggior parte dei principi attivi testati. inteso come maggior inibizione dell'espressione del gene pro-infiammatorio.

In particolare, nella figura si nota come i ctrl negativi, come atteso, abbiano un valore vicino allo zero, mentre i campioni con bisabololo espletano un forte effetto inibitorio sulla maggior parte dei marker pro-infiammatori, ad esclusione del gene che codifica per CCL2 (Fig 63 c).

Per il gene IL6 le sostanze più efficaci nell'inibire lo stimolo LPS indotto sono: 5, 4, 2.(Fig. 63a)

Per il gene IL8, i principi attivi in grado di modulare significativamente l'espressione erano 5,2, 6 e quindi risultano essere i più attivi nel ridurre la risposta infiammatoria (Fig 63b).

Nel caso di COX-2 si riscontra sempre una significativa attività dei composti 5 e 4 (Fig.63d), e per CCL2 le sostanze 5, 2, 4 dimostrano ancora un'attività antinfiammatoria (Fig 63 c).

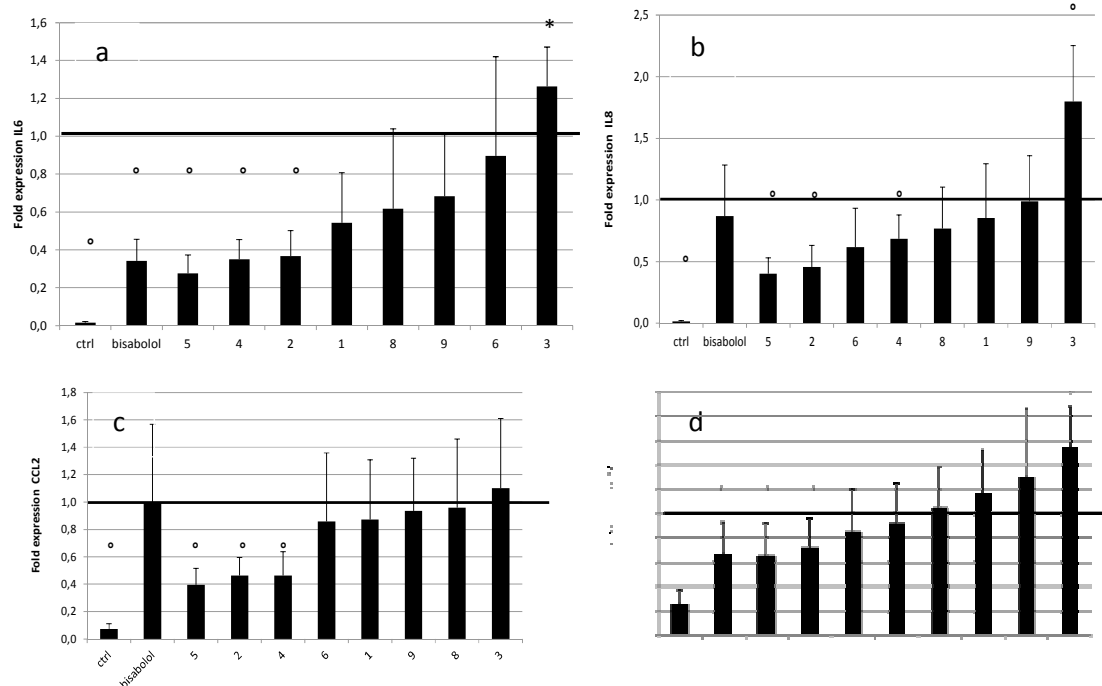


Fig 63 Livelli di espressione in fibroblasti trattati con le materie prime, prima del trattamento con LPS (10 ng/ml per 3h), per 24 ore. I livelli di espressione sono riferiti al controllo positivo (Ctrl+lps). I fold di espressione dei principi attivi sono disposti in ordine decrescente, a seconda del maggior potere antiinfiammatorio (diminuzione del fold di espressione). I livelli sono anche standardizzati al gene di riferimento GAPDH. Dati : fold espressione \pm DS Significatività t-student $p<0.05^*$ e $p<0.01^\circ$ a) IL6 b) IL8 c) CCL2o MCP-1 d) COX2

EFFETTO MISCELE NEL SAGGIO ORAC

Nell'ambito della valutazione dell'attività combinatoria delle molecole testate, utile alla definizione di formulazioni innovative, tramite il saggio ORAC siamo andati a valutare se miscele di sostanze presentavano un potere antiossidante totale maggiore in associazione rispetto al potere antiossidante dei composti presi singolarmente. Tale saggio è stato scelto per evidenziare potenziali attività sinergiche dei composti in seguito a possibili interazioni biochimiche.

Quantità note di principi attivi sono state unite al fine di ottenere miscele con una capacità antiossidante teorica compresa tra 15 e 30 μ M equivalenti di trolox, determinata dalla somma delle capacità antiossidanti dei singoli composti (valore teorico). In figura 64 sono riportati i valori sperimentali misurati delle miscele (barre nere,) con i valori teorici ottenuti sommando le misure singole dei composti (barre bianche).

Gli istogrammi mostrano come alcune miscele di sostanze abbiano un potere antiossidante leggermente superiore ai valori della somma teorica (4+5, 4+8, 5+6, 4+3) a sottolineare un effetto

combinatorio che può presupporre una sinergia tra i composti. Le altre combinazioni hanno solo un effetto additivo, come nel caso delle miscele 4+6, 3+8, 4+9; in questo caso infatti il valore sperimentale è identico alla somma teorica degli equivalenti di trolox.

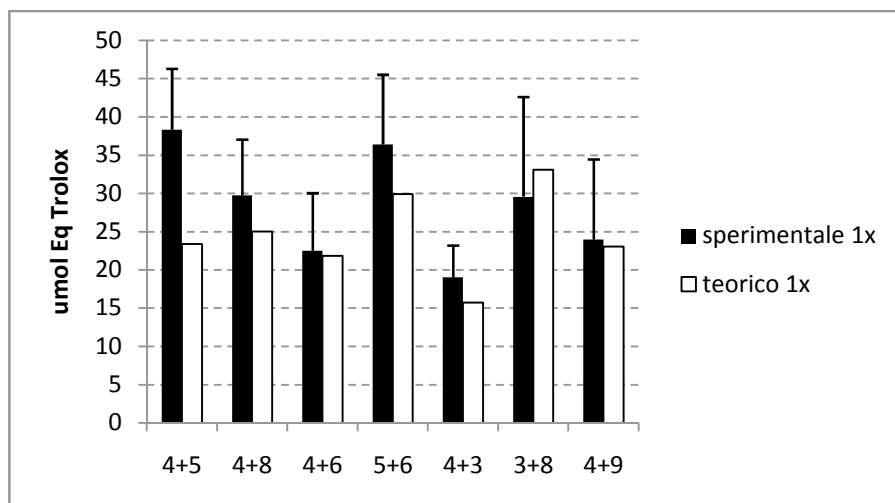


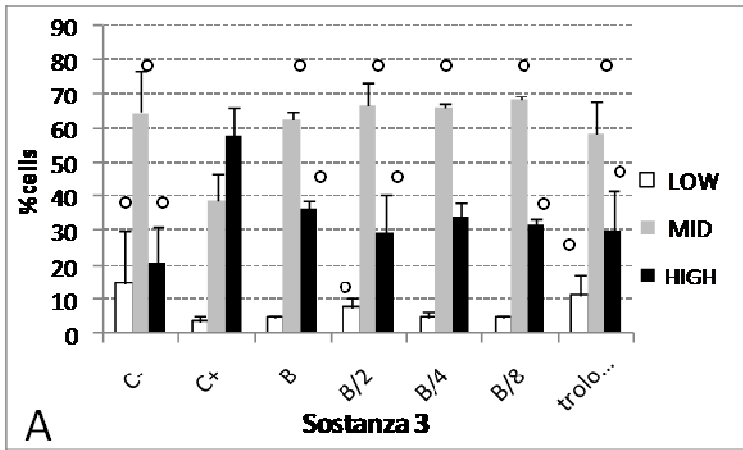
Fig 64 Misura potere antiossidante delle combinazioni fra composti tramite saggio ORAC. Valore misurato riferito alla combinazione dei composti (sperimentale 1x) confrontato con somma teorica dei valori dei composti singoli misurati dal saggio ORAC (teorico 1x). Dati in umol Trolox eq \pm DS

TEST DEL FOTOINVECCHIAMENTO IMPIEGANDO MISCELE DEI PRINCIPI A PIU' ELEVATA AZIONE ANTIOSSIDANTE E ANTIINFIAMMATORIA.

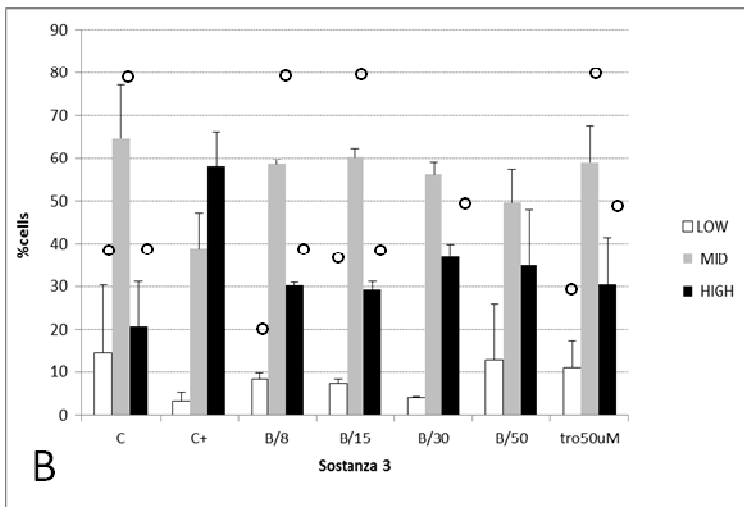
MINIMA CONCENTRAZIONE EFFICACE DEI MIGLIORI PRINCIPI ATTIVI AD AZIONE ANTIOSSIDANTE E ANTIINFIAMMATORIA

Le analisi condotte relativamente all'efficacia antiossidante e antiinfiammatoria hanno portato ad evidenziare i composti 3, 4, 5, 9 come composti più attivi. Nell'ultima fase dello studio miscele di questi composti sono state impiegate su fibroblasti esposti a insulto con radiazione UVA. Nello specifico abbiamo preliminarmente identificato la minima concentrazione attiva di ciascuno di questi composti nel proteggere i fibroblasti dall'accumulo di ROS UVA-indotti.

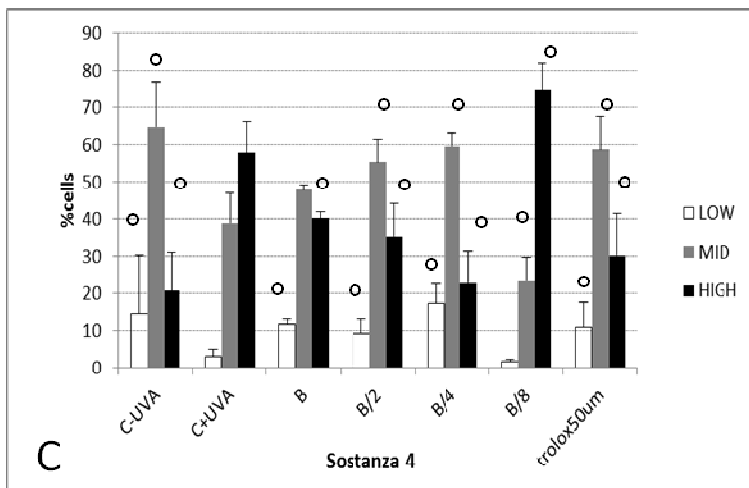
Le sostanze venivano incubate con i fibroblasti sia nelle 24h precedenti che in quelle successive al trattamento UVA. La concentrazione massima impiegata era per ciascuna sostanza alla concentrazione B indicata nei materiali e metodi, e diluizioni scalari di questa. Per ogni condizione venivano misurate le percentuali di cellule con un contenuto basso (LOW), intermedio (MID) e elevato (HIGH) di specie reattive dell'ossigeno intracellulari.



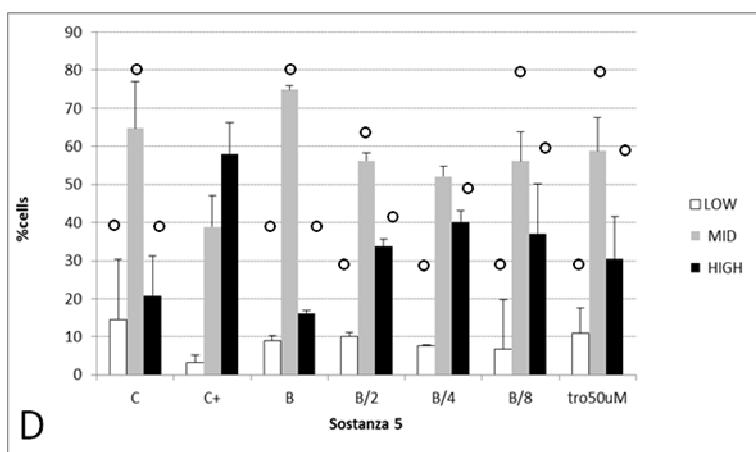
Campioni (PRE/POST-UVA)	% cellule HIGH±DS
Ctrl+UVA	58±8
Sostanza 3 B	37±2
Sostanza 3 B/2	30±11
Sostanza 3 B/4	34±4
Sostanza 3 B/8	32±2
Trolox 50uM	30±11



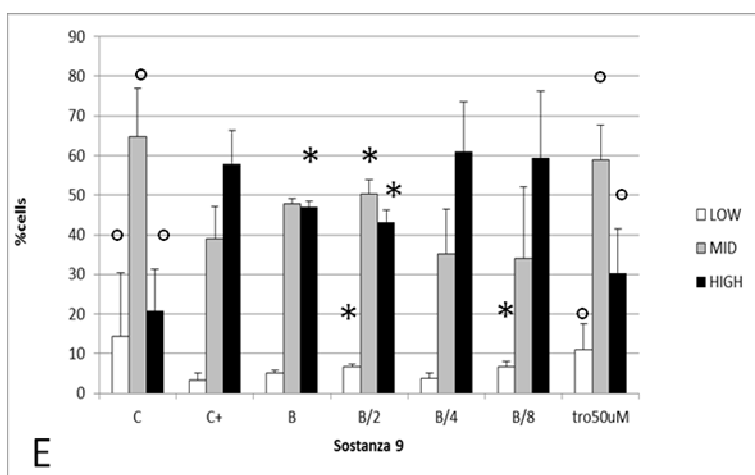
Campioni (PRE/POST-UVA)	%cellule HIGH±DS
Ctrl+UVA	58±8
Sostanza 3 B/8	30±1
Sostanza 3 B/15	29±2
Sostanza 3 B/30	37±3
Sostanza 3 B/50	35±13
Trolox 50uM	30±11



Campioni (PRE/POST-UVA)	%cellule HIGH±DS
Ctrl+UVA	58±8
Sostanza 4 B	40±2
Sostanza 4 B/2	35±9
Sostanza 4 B/4	23±9
Sostanza 4 B/8	75±7
Trolox 50umf	30±11



Campioni (PRE POST-UVA)	%cellule HIGH±DS
Ctrl+UVA	58±8
Sostanza 5 B	16±3
Sostanza 5 B 2	34±2
Sostanza 5 B 4	40±4
Sostanza 5 B 8	37±1
Trolox 50uM	30±11



Campioni (PRE POST-UVA)	%cellule HIGH±DS
Ctrl+UVA	58±8
Sostanza 9 B	47±1
Sostanza 9 B 2	43±3
Sostanza 9 B 4	61±13
Sostanza 9 B 8	59±17
Trolox 50uM	30±11

Fig.65 Combinazione di sostanze e Trolox 50 uM. pre e post irraggiamento UVA. Livelli di radicali riportati come popolazioni LOW, MID, HIGH. Aggiunta del Trolox 50uM usato nelle stesse condizioni come riferimento. Dati: media ±DS. Significatività calcolata con t-student vs Ctrl+UVA (*<0,05 e °<0,01)
 A,B) sostanza 3 B=6,25 ug/ml C) Sostanza 4 incubata (B=2,7 mg/ml). D) Sostanza 5 (B=6,23 mg/ml).E) Sostanza 9 (B=16,25 ug/ml).

Nell'ambito di questi test tutte le sostanze testate, ad eccezione della sostanza 3, esaurivano rapidamente le loro proprietà antiossidanti in seguito a diluizione. Al contrario per la sostanza 3 si riscontrava una significativa diminuzione della percentuale di cellule ad elevato contenuto di ROS in presenza di soluzioni diluite fino a 30 volte rispetto alla concentrazione B (Fig 65 b).

Le concentrazioni minime efficaci nel prevenire l'aumento intracellulare di ROS per ciascuna sostanza sono le seguenti:

sostanza 3 **B/20=0,312 ug/ml**(Fig 63 A,B)

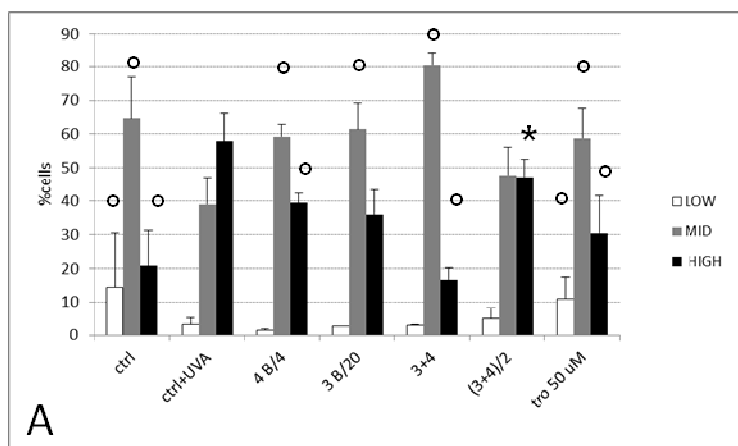
sostanza 4**B/4=0,68 mg/ml**(Fig. 40 63C)

sostanza 5**B/8=0,78 mg/ml**(Fig 63D)

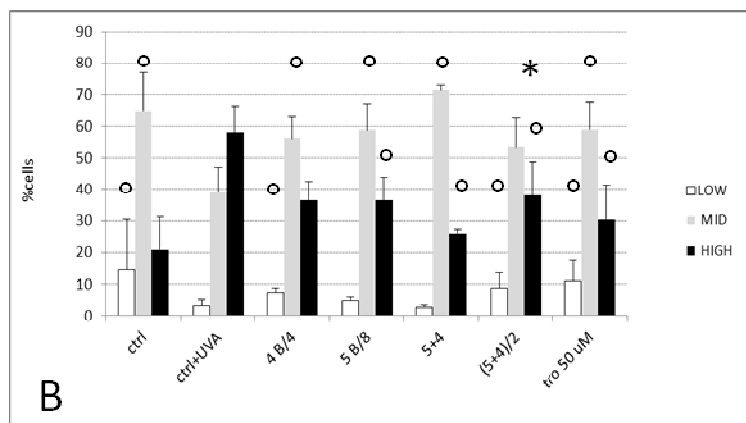
sostanza 9**B/2=8,12ug/ml**(Fig 42E)

EFFICACIA DELLE MISCELE CONTRO IL FOTO-INVECCHIAMENTO

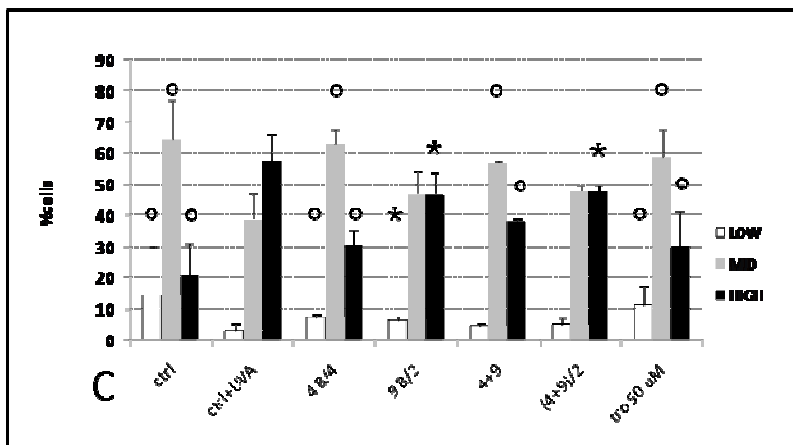
In ultimo miscele ottenute dalla combinazione delle sostanze più attive nelle concentrazioni minime efficaci, sono state testate mediante incubazione per le 24h pre e post trattamento UVA al fine di verificare possibili effetti combinatori, già riscontrati mediante il saggio ORAC in sistemi cell-free, nel ridurre significativamente la percentuale di cellule ad elevato contenuto di ROS (HIGH). Il saggio riportato in figura 66 A, B, C riporta la valutazione degli effetti dei composti singoli ed in associazione, confrontati con una soluzione 50 µM trolox impiegato come riferimento.



Campioni (PRE/POST-UVA)	%cellule HIGH±DS
Ctrl+UVA	58±8
Sostanza 4 B/4	39±3
Sostanza 3 B/20	36±7
Combinazione 4+3	17±4
Combinazione (4+3)/2	47±5
Trolox 50uMl	30±11



Campioni (PRE/POST-UVA)	%cellule HIGH±DS
Ctrl+UVA	58±8
Sostanza 4 B/4	37±6
Sostanza 5 B/8	37±7
Combinazione 4+5	26±1
Combinazione (4+5)/2	38±11
Trolox 50uMl	30±11



Campioni (PRE/POST-UVA)	%cellule HIGH±DS
Ctrl+UVA	58±8
Sostanza 4 B/4	31±5
Sostanza 9 B/2	47±7
Combinazione 4+9	38±1
Combinazione (4+9)/2	48±2
Trolox 50uM	30±11

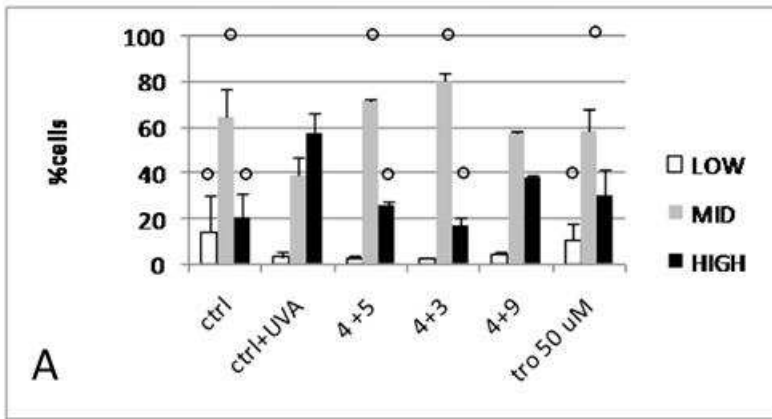
Fig 66 Livelli di radicali riportati come popolazioni LOW, MID, HIGH. Aggiunta del Trolox 50uM usato nelle stesse condizioni come riferimento. Dati: media ±DS. Significatività calcolata con t-student vs Ctrl+UVA (*<math><0,05</math> e °<math><0,01</math>)

A) Combinazione 4 conc B/4; 3 Conc B/20 e loro combinazione B) Combinazione 4 conc B/4; 5 Conc B/8 e loro combinazione C) Combinazione 4 conc B/4; 9 Conc B/2 e loro combinazione

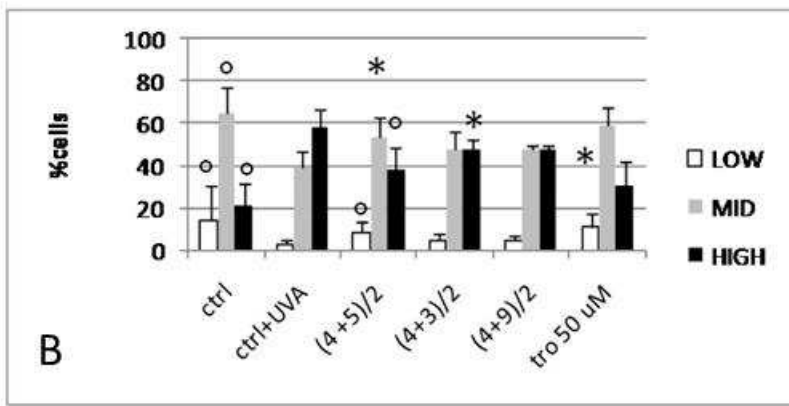
In fig.66B la miscela 4+5 presenta un forte effetto antiossidante, diminuendo in maniera altamente significativa la percentuale di cellule ad elevato contenuto di ROS (HIGH) rispetto alle cellule esposte a radiazione UVA (Ctrl+UVA). Sebbene l'effetto antiossidante si esauriva tuttavia rapidamente in seguito a diluizione, la sua efficacia risultava maggiore rispetto ai composti singoli e al Trolox 50 uM impiegato come riferimento.

La miscela 4+3 (Fig. 66A) risultava più efficace nel ridurre significativamente la percentuale di cellule ad elevato contenuto di ROS (HIGH) rispetto al controllo irraggiato (Ctrl+UVA) risultando in questo caso non significativamente diversa dal controllo non irraggiato (Ctrl). Anche in questo caso si riscontra un effetto antiossidante aumentato rispetto ai composti singoli sebbene la diluizione 1:1 della miscela era associato ad una significativa diminuzione dell'efficacia antiossidante.

Anche la miscela 4+9, la cui efficacia è riportata in figura 66C, presenta un significativo effetto protettivo nel contenere la percentuale di cellule ad elevato contenuto di ROS (HIGH) rispetto al controllo irraggiato (Ctrl+UVA).



Campioni (PRE/POST-UVA)	%cellule HIGH±DS
Ctrl+UVA	58±8
Combinazione 4+5	26±1
Combinazione 4+3	17±4
Combinazione 4+9	38±1
Trolox 50uM	30±11



Campioni (PRE/POST-UVA)	%cellule HIGH±DS
Ctrl+UVA	58±8
Combinazione (4+5)/2	47±11
Combinazione (4+3)/2	38±5
Combinazione (4+9)/2	48±2
Trolox 50uM	30±11

Fig 67 Confronto miscele pre e post trattamento UVA . Livelli di radicali riportati come popolazioni LOW, MID, HIGH. Aggiunta del Trolox 50uM usato nelle stesse condizioni come riferimento. Dati: media ±DS. Significatività calcolata con t-student vs Ctrl+UVA (*<0,05 e °<0,01).

A) Miscele dei seguenti composti: 3 B/20= 0,312 ug/ml, 4 B/4= 0,68 mg/ml, 5 B/8=0,78 mg/ml, 9 B/2=8,06 ug/ml. B) Miscele diluite 1:1

In fig. 67 A sono comparate le miscele in relazione al livello di protezione dall'accumulo di ROS fotoindotti. Nello specifico, la miscela 4+3 è quella più efficace nel diminuire la percentuale di cellule HIGH, seguono in ordine decrescente 4+5 e 4+9. Tale diminuzione in cellule ad elevato contenuto di ROS, si traduce chiaramente in un aumento della percentuale di cellule a contenuto intermedio, la quale distribuzione ha di conseguenza un trend opposto rispetto alla popolazione HIGH: massimo per la miscela 4+3, seguita da 4+5 e 4+9.

Nell'ultimo grafico (Fig.67B) si mettono in comparazione le miscele dimezzate fra loro e se ne deduce che l'effetto inibitorio rimane in tutte e tre le miscele, sebbene in misura attenuata. In questo contesto la miscela 4+5 sembra essere quella più efficace anche in seguito a diluizione.

DISCUSSIONE

Il sistema cute nella sua complessità comprende annessi cutanei, componenti cellulari eterogenee, sostanza extracellulare e molecole di varia natura. Esso rappresenta sia un elemento di difesa che di comunicazione con l'ambiente circostante. Questo tessuto complesso è costantemente esposto a innumerevoli stimoli, agenti fisici o chimici (UV, radiazioni ionizzanti, xenobiotici, etc) che possono alterare l'integrità della barriera cutanea

In questo senso la cute rappresenta una sorta di barriera dinamica e gli stimoli ambientali possono accelerare i naturali processi caratteristici della senescenza associati ad un'alterazione della funzione protettiva e escretoria della cute.

Fattori estrinseci e intrinseci contribuiscono all'invecchiamento della pelle, in quest'ottica è importante comprendere i meccanismi molecolari alla base della disfunzione indotta sia da processi endogeni che esogeni al fine di identificare composti attivi in grado di agire a livello di questi processi chiave. Lo stress esogeno di maggiore rilievo per la cute è costituito dalla radiazione UVA che tra le componenti UV è in grado di penetrare lo strato atmosferico di ozono, a differenza della radiazione UVC, e l'epidermide a differenza della radiazione UVB. Questa radiazione è in grado di eccitare le molecole biologiche danneggiandole ma soprattutto è in grado di indurre specie reattive dell'ossigeno in seguito a fotolisi delle componenti acquose. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) fotoindotte, a causa della loro elevata reattività sono in grado di reagire con lipidi, proteine, acidi nucleici danneggiandoli. Fortunatamente i sistemi biologici hanno differenziato una complessa rete di sistemi antiossidanti, sia enzimatici che a basso peso molecolare in grado di tenere sotto controllo i livelli di specie ossidanti mantenendo un'omeostasi redox essenziale per il corretto funzionamento delle cellule.

Tali difese tuttavia tendono a declinare naturalmente con l'invecchiamento in seguito all'accumulo stocastico di danno e fenomeni degenerativi associati alla senescenza. Il fenotipo della cellula senescente risulta pertanto molto diverso dalle cellule giovani in relazione ad alterate capacità proliferative e l'acquisizione di condizioni croniche pro-infiammatorie (inflammaging) con attiva secrezione di interleuchine.

Alla luce della rilevanza dello stimolo UVA nel promuovere l'invecchiamento della pelle, il presente progetto ha impiegato un modello in vitro di stimolo foto-ossidante irradiando i fibroblasti con radiazione UVA. Nelle cellule stimulate abbiamo successivamente quantificato i livelli di ROS

intracellulari ed in particolare come questi variassero in relazione alla dose di radiazione ed al tempo di recupero post-irraggiamento.

Tale modello è ampiamente impiegato in letteratura per studiare lo stress-ossidativo foto-indotto e l'attività di composti, naturali e di sintesi, in grado di mitigarlo.

Huang et al., hanno usato colture di fibroblasti irradiati con UVA a 20 J/cm^2 per analizzare in citofluorimetria il potere antiossidante del flavonoide cicloeterofilina (93). Analogamente *Bing-Ron Zhou et al.*, ha impiegato lo stesso modello cellulare per valutare l'effetto fotoprotettivo della baicalina, un altro flavonoide, impiegando una dose di UVA pari a 10 J/cm^2 per valutare la capacità di questa molecola nell'inibire l'accumulo di RONS quali NO, anione superossido. Inoltre gli autori hanno valutato anche la funzionalità mitocondriale in seguito a misura della depolarizzazione del potenziale di membrana mitocondriale (94).

Nel nostro laboratorio (84) in studi precedenti avevamo irradiato fibroblasti di derma umano con una dose di UVA 18 J/cm^2 per studiare la foto stabilità di nano particelle solide liquide (nano lipid carriers NLC) una volta incorporate nelle cellule. Tali particelle rappresentano degli innovativi vettori di composti lipofili ma in questo studio abbiamo dimostrato che sono in grado di indurre stress ossidativo nella cellula in seguito a irraggiamento.

Nell'ambito dello studio oggetto di questa tesi abbiamo ottimizzato il modello sperimentale valutando la dose di UVA in grado di provocare un aumento significativo dei ROS cellulari senza compromettere la vitalità cellulare, in queste condizioni abbiamo successivamente testato i principi attivi da soli ed in combinazione. In particolare la prima fase dello studio ci ha consentito di individuare la dose ottimale di UVA di 36 J/cm^2 in grado di promuovere significativamente la produzione di ROS mantenendo dei livelli di vitalità cellulare superiori all'80%. Tale squilibrio ossidativo permaneva nel sistema cellulare sino a 24 ore, consentendo una valutazione delle proprietà antiossidanti di 8 fitocomposti innovativi per il mercato cosmetico da impiegare nello sviluppo di nuove formulazioni antiageing. I composti sono stati testati nel modello di foto-danno di fibroblasti del derma umano sia in termini di protezione pre-irraggiamento sia di ottimizzazione del recupero nella fase post-irraggiamento. La misura a 24 ore dall'insulto consentiva inoltre di limitare la variabilità biologica e di misurare l'effettivo steady state radicalico in condizioni stabili presentando una maggiore rilevanza biologica.

La stessa dose di irraggiamento è stata applicata anche alle materie prime in un sistema cell-free per valutare la fotostabilità dei composti stessi valutando il loro profilo spettrofotometrico prima e dopo l'irraggiamento. In questo contesto è stato possibile interpretare al meglio l'efficacia dei composti

impiegati in termini preventivi (pre-irraggiamento) o nell'ottimizzare il recupero cellulare (post-irraggiamento).

Dall'analisi spettrofotometrica le sostanze 1, 3, 9 sono risultate essere foto instabili in quanto si osservavano delle significative diminuzioni dei principali picchi di assorbimento, mentre le rimanenti sostanze 2,4,5,6,8 risultavano fotostabili. Questo dato può fornire delle indicazioni utili circa il tipo di formulazione che si intende sviluppare o relativamente all'importanza di aggiungere co-formulanti quali filtri solari che proteggano le molecole in oggetto.

In accordo con questi dati i composti foto-stabili 4 e 5 si sono rilevati particolarmente efficaci nel minimizzare lo stress ossidativo foto-indotto quando venivano incubati con i fibroblasti prima dell'irraggiamento (ruolo preventivo). Tuttavia la materia prima 3, che nel saggio spettrofotometrico è risultata foto-instabile risulta essere una delle migliori nel prevenire il foto-danno. La stessa molecola ha dimostrato un'efficacia antiossidante particolarmente elevata anche in seguito a diluizione 1:30 rispetto alla massima concentrazione non tossica identificata per questo composto; L'insieme delle informazioni raccolte potrebbe suggerire da una parte una estrema reattività della molecola anche in termini protettivi, e dall'altra che anche in seguito ad una forte deplezione foto-mediata i composti residui a livello cellulare mantengano la loro efficacia antiossidante.

Nei saggi dove i composti venivano testati nella fase post-irraggiamento i composti 3 e 4 risultano egualmente tra i più efficaci nel contribuire alla detossificazione delle specie reattive dell'ossigeno foto-indotte. Inoltre la sostanza 9, foto-instabile e non efficace nel prevenire il danno foto indotto, risulta tra le più attive nell'ottimizzare il recupero nelle 24 ore successive all'irraggiamento, fornendo delle chiare indicazioni rispetto al suo utilizzo in formulazioni appropriate. Questo comportamento della sostanza 9 conferma la foto-instabilità del composto *in vitro*, visto che la radiazione UVA ne compromette la capacità protettiva nel saggio cellulare, dovuta probabilmente ad una modifica della sua struttura chimica rilevata nel saggio spettrofotometrico (Fig. 31 e Tab3) e probabilmente associato ad una sua inattivazione.

L'insieme dei dati sopra descritti ci ha consentito, a partire dagli otto composti analizzati di isolarne quattro particolarmente efficaci, due di questi (i composti 3 e 4) caratterizzati da notevole stabilità ed efficacia sia nella prevenzione del foto danno sia nel miglioramento del recupero dall'insulto indotto dagli UVA.

Il principio 4 è un estratto purificato da pianta succulenta, nota da secoli nella medicina cinese, ha un elevato numero di vitamine, fitochimici e acidi grassi omega 3. Per questi ultimi la molecola maggiormente presente è l'acido linolenico, gli omega 3 hanno un elevato effetto protettivo in vitro bloccando l'espressione in vitro di vari marker infiammatori come PGE2, IL 8, IL 6 e TNF-alfa. In vivo è stato condotto uno studio su pazienti irraggiati con dosi UV, che l'impiego di formulazioni topiche arricchite con omega 3 permettevano l'inattivazione di p53 UV-mediata (95)

Altri componenti bioattivi nell'estratto 4 sono il tocoferolo, il kaempferolo e l'apigenina, la principale vitamina liposolubile ad attività antiossidante, particolarmente ricco nelle lipoproteine e nelle membrane biologiche dove combatte la perossidazione lipidica mediata dai radicali liberi. A livello cutaneo espleta un effetto antiossidante contro la radiazione UV in sinergia con l'ascorbato (15), altra potente vitamina antiossidante di natura idrofilica. Diversi studi *in vitro* confermano il suo ruolo protettivo contro il danno foto ossidativo bloccando la produzione di radicali perossilici e idroperossidi indotti da UVA. Alla luce di queste proprietà viene utilizzato in applicazioni topiche cosmetiche o farmaceutiche nella formulazione di creme solari, crema da giorno, creme da notte, sieri idratanti e ricostituenti. Tali proprietà antiossidanti hanno sia un ruolo a supporto di attività anti-invecchiamento sia nel proteggere altri principi attivi co-formulati al fine di aumentare la stabilità e la shelf-life del prodotto.

Il kaempferolo è un flavonoide comune in diversi alimenti (broccoli, cavoli), con proprietà antiossidanti, anti-infiammatorie e anti-neoplastiche. In diversi studi il kaempferolo esercita un'attività inibitoria verso fattori pro infiammatori come NF-kb (RAW 246.7) e IL-8 (cellule epiteliali polmonari)(96).

L'apigenina presente in molti alimenti (prezzemolo, tè, arance) si trova sotto forma di dimero diapigenina, è caratterizzato da un elevato potere anticarcinogenico e antiossidante. Studi animali su modelli di carcinogenesi cutanea indotta hanno dimostrato che l'applicazione topica previene la comparsa di tumori cutanei indotti da sostanza cancerogene e da radiazione UV. (125) La sua principale caratteristica antiossidante è dovuta alla proprietà di chelare i metalli pesanti e alla attività di "scavenger" nei confronti dei ROS oltre a promuovere le difese antiossidanti endogene come la sintesi di glutatione ridotto (97).

La sostanza 3 è un composto puro appartenente alla classe dei terpeni, caratterizzato da attività antiossidanti essendo in grado di neutralizzare specie radicaliche e non radicaliche (radicali

perossilici, idrossile, superossido etc.). Tali attività sono state verificate su epidermide ricostruita esposta a stimoli pro-infiammatorine quali era in grado di modulare un panel di geni coinvolti nel processo infiammatorio (PLCL2, PTGER2, PTGER4 etc.), nel riparo del DNA (PARP2, PARP9 etc.) e nella sintesi delle acquaporine e glicosamminoglicani (HAS3, AQP3etc.). In studi clinici è stata verificata un effetto idratante e protettivo verso l'eritema solare in soggetti sottoposti a radiazione UV.

Dagli studi in vitro e clinci che supportano l'efficacia della materia prima 3 come molecola anti aging, si notano come reagisca con molecole o segnali coinvolti in diversi processi degenerativi tipici dell'invecchiamento, con un coinvolgimento dipathways convolti nell'infiammazione, ciclo cellulare e rimodellamento della matrice extracellulare (Nfk-B, AP-1/MMPs).

I dati relativi all'attività antiossidante sono stati complementati con la valutazione dell'attività antinfiammatoria dei composti, un processo intimamente connesso allo stress ossidativo che caratterizza in maniera cronica i fibroblasti senescenti. Nelle cellule senescenti i ROS prodotti, non controbilanciati da efficaci difese antiossidanti, determinano l'attivazione di pathways pro-infiammatori con rilascio di chemochine. Nello specifico nel nostro modello sperimentale tra i marker infiammatori abbiamo valutato IL6, IL8, COX 2 e MCP-1 indotti dall'esposizione al lipopolisacacride (LPS) un endotossina batterica.

Le cellule senescenti, anche in assenza di stimolo, sono caratterizzate da un'aumentata secrezione di fattori pro-infiammatori; *Wolf et al.* hanno evidenziato che la risposta infiammatoria allo stimolo diretto indotto da LPS varia a seconda che le linee di fibroblasti derivino un donatore giovane o anziano (98). La chemochina COX-2 è connessa all'invecchiamento cutaneo è una ciclossigenasi, inducibile da fattori di crescita, coinvolta nella comparsa di fenomeni di fotocarcinogenesi in diversi tessuti, alcuni studi di immunistochemica mettono in luce come la presenza di COX-2 sia fortemente presente in campioni istologici di pelle invecchiata e soprattutto foto-invecchiata (99). CMP-1 è coinvolto nella comparsa della malattia fibrotica chiamata scleroderma, infatti questa chemochina ha un ruolo centrale nel processo infiammatorio e fibrotico cutaneo.(100)

Nel nostro modello sperimentale l'esposizione a 10 ng/ml di LPS per 3 ore di incubazione determinava un aumento dell'espressione di IL6 di un'ordine di grandezza rispetto al ctrl negativo (Fig33)e due ordini di grandezza per quanto riguarda l'IL8. Tale induzione veniva inibita dal

bisabololo, una sostanza naturale estratta da *Matricaria chamomilla L.* e impiegata come sostanza di riferimento ad attività anti-infiammatoria.

Nell'ambito dei principi attivi testati i composti 5, 4, 2 risultavano significativamente efficaci nel dimezzare l'espressione dell'IL6, IL-8, CCL2 (Fig 36) rispetto al controllo trattato con LPS da solo; mentre per quanto riguarda COX2 si riscontrava un effetto significativo dei soli composti 5 e 4 (Fig. 36).L'analisi integrata dei parametri ha consentito di associare ai composti 5 e 4 un chiara azione antinfiammatoria per tutti i marker misurati. Tali attività, nel caso del composto 4 potrebbero essere associati all'elevato contenuto di omega 3 già descritto, noto in letteratura per l'elevato potere anti-infiammatorio. Composti assimilabili da un punto di vista composizionale erano in grado di contenere l'espressione di IL8 e CCL2 nei confronti di HUVECs sensibilizzate con TNF-alfa (101). La sostanza 5 è un estratto vegetale ad elevata concentrazione di enzimi ad attività antiossidante. I ROS possono innescare pathways infiammatori che coinvolgono mediatori come IL8, IL6, COX2, IL 1 beta etc. Questa attività antiossidante in accordo con quanto riscontrato nel saggio ai livelli di radicali citosolici indotti da radiazione UVA nella quale abbiamo evidenziato un significativo effetto protettivo di questa sostanza in seguito a incubazione per 24h pre-irraggiamento.

L'identificazioni dei composti a maggiore attività antinfiammatoria e antiossidante, che abbiamo visto essere largamente connesse, ha consentito di valutare altresì l'attività delle miscele di questi composti in termini di protezione dallo stress ossidativo foto-indotto. L'effetto delle miscele è stato valutato relativamente a questo parametro per la rilevanza dello stesso nel promuovere sia la senescenza cellulare ed i processi infiammatori ad esso associati.

La miscela 4+3 ha dimostrato un chiaro effetto combinatorio presentando livelli di cellule con una elevata percentuale di ROS (HIGH) comparabile al controllo non irraggiato e quindi nettamente inferiori a quelli di cellule irraggiate e trattate con Trolox 50uM come composto antiossidante di riferimento. Anche la miscela 4+5 presentava un effetto combinatorio seppure di entità minore rispetto alla miscela precedente.

I composti fitochimici sono oggetto di numerosi studio per le loro proprietà detossificanti nei confronti del fotoinvecchiamento UVA indotto. Gli estratti vegetali hanno delle forti proprietà antiossidanti rispetto a stimoli di varia natura. *Singh et al.*, ad esempio (102) riportano l'efficacia di applicazioni topiche di polifenoli del tè verde ed in particolare EGCG determinava un'efficace protezione del derma esposto a UVB in termini di contenimento della risposta immunitaria

induzione di IL12 con un ruolo protettivo nella protezione dell'instabilità genomica. Anche miscele di flavolignani, quali la silimarina dal cardo mariano, sono caratterizzate da attività antiossidante e protettive del DNA associato allo stress ossidativo indotto da radiazione UVB. Nello specifico il trattamento topico di modelli murini (CH3/Hen) con silimarina $1\text{mg}/\text{cm}^2$ inibiva lo stress ossidativo indotto da radiazione UVB promosso dall'infiltrazione di cellule CD11b+ ad elevata produzione di ROS (102). A sottolineare la rilevanza delle sinergie fra principi attivi nelle formulazioni, *Wolfe et al*, dimostrano su colture di fibroblasti irradiati con UV l'efficacia protettiva e antiossidante della miscelazione di ubiquinone, tocoferolo e luteolina (4:4:1) che era in grado di detossificare in maniera significativa dai ROS indotti dall'irraggiamento con simulatore di luce solare (SSR). Nello specifico i composti in esame presi singolarmente prevenivano l'ossidazione della DCF, impiegato come reporter di ROS, ad una concentrazione di $4\text{ug}/\text{ml}$, mentre nella combinazione dei tre composti a concentrazione finale di $0,25\text{ ug}/\text{ml}$ svolgevano il medesimo effetto. (103)

In conclusione il presente progetto di dottorato ha consentito lo sviluppo di opportuni modelli cellulari *in vitro* di fotodanno impiegando fibroblasti del derma umano al fine di comparare l'efficacia di composti singoli e miscele nel promuovere un'efficace protezione antiossidante e antinfiammatoria. Tale ricerca si propone come un semplice screening applicabile nel contesto industriale per la definizione di miscele innovative per il loro uso nell'industria cosmetica. Nello specifico, nell'ambito dei composti testati, siamo stati in grado di definire una miscela (composti 4+3) con possibili sviluppi per i quali i dati accumulati possano augurabilmente concorrere alla definizione di dossier brevettuali.

BIBLIOGRAFIA

1. J.A. Bouwstra The skin barrier, a well-organized membrane. *Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects*. 1997; 123:403-413
2. Larrabee W, Bloom D. Biomechanics of skin flaps. In: Baker S. editor. *Local flaps in facial reconstruction*, 2 nd edition Philadelphia. Elsevir; 2007. pp. 31–40.
3. S H Hussain, B Limthongkol and T R Humpreys *The Biomechanical Properties of the Skin*. *Dermatol Surg*. 2013 Feb;39(2):193-203.
4. Chu DH. Chapter 7. Development and Structure of Skin. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ, editors. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 2008. pp. 57–72 ,
5. Wilkes GL, Brown IA, Wildnauer RH. The biomechanical properties of skin. *CRC Crit Rev Bioeng* 1973;1(4):453–495.
6. Callaghan TM, Wilhelm KP . A review of ageing and an examination of clinical methods in the assessment of ageing skin. Part I: Cellular and molecular perspectives of skin ageing .*Int J Cosmet Sci*. 2008 Oct;30(5):313-22)
7. G Imokawa. Recent advances in characterizing biological mechanisms underlying UV-induced wrinkles: a pivotal role of -derived elastase. *Arch Dermatol Res* 2008 300 (Suppl 1):S7–S20
8. Imokawa G, Nakajima H, Ishida K. Biological mechanisms underlying the ultraviolet radiation-induced formation of skin wrinkling and sagging II: over-expression of neprilysin plays an essential role. *Int J Mol Sci*. 2015 Apr 8;16(4):7776-95.
9. Bee L, Marini S, Pontarin G, Ferraro P, Costa R, Albrecht U, Celotti L. Nucleotide excision repair efficiency in quiescent human fibroblasts is modulated by circadian clock. *Nucleic Acids Res*. 2015 Feb 27;43(4).
10. Michael J. Sherratt. Tissue elasticity and the ageing elastic fibre *AGE* 2009 31:305–325.,9

11. Rajawat YS1, Hilioti Z, Bossis I. Aging: central role for autophagy and the lysosomal degradative system
12. Hayflick L, Moorhead PS The serial cultivation of human diploid cell strains. 1961 *Exp Cell Res* 25; 585-621.
13. P L. Opreskoa,, J W. Shayb,ReviewTelomere-associated aging disorders*Ageing Research Reviews 2016
14. Angustias Page, Manuel Navarro, Cristian Suarez-Cabrera, Josefa P. Alameda, M. Llanos Casanova, Jesús M. Paramio, Ana Bravo, Angel Ramirez . Protective role of p53 in skin cancer: Carcinogenesis studies in mice lacking epidermal p53
15. Su Liu, Harpreet Uppal, Marco Demaria, Pierre-Yves Desprez, Judith Campisi & Pankaj Kapahi. Simvastatin suppresses breast cancer cell proliferation induced by senescent cells. *Sci Rep.* 2015 Dec 14;5:17895
16. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992; 358:15-16., 21 Benjamin CL, Ananthaswamy HN. p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007; 224:241-248.
17. Benjamin CL, Ananthaswamy HN. p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007; 224:241-248. 20.
18. Giglia-Mari G, Sarasin A. TP53 mutations in human skin cancers. *Human mutation.* 2003; 21:217-228
19. Lapouge G, Youssef KK, Vokaer B, Achouri Y, Michaux C, Sotiropoulou PA, Blanpain C. Identifying the cellular origin of squamous skin tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011; 108:7431-7436
20. Heng-long Hu, R.J Forsey, Tony J Blades, Mike E.J Barratt, Preyesh Parmar, Jonathan R Powell. Antioxidants may contribute in the fight against ageing: an in vitro model.,
21. M Rinnerthaler, J Bischof, M K Streubel, A Trost and K Richter. Oxidative Stress in Aging Human Skin.
22. Su Liu, Harpreet Uppal, Marco Demaria, Pierre-Yves Desprez, Judith Campisi & Pankaj Kapahi. Simvastatin suppresses breast

23. Barbara A. Gilchrest. Photoaging J Invest Dermatol. 2013 Jul 1;133(E1):E2-6.
24. Yaar M, Gilchrest BA Aging versus photoaging: postulated mechanisms and effectors. J Invest Dermatol .SympProc. 1998 Aug;3(1):47-51)
25. Savar A, Acin S, Gonzalez CL, El-Sawy T, Mejia O, Li Z, Esmaeli B, Lacy-Hulbert A, El-Naggar AK, McCarty JH, Caulin C. Loss of epithelial p53 and alpha v integrin cooperate through Akt to induce squamous cell carcinoma yet prevent remodeling of the tumor microenvironment. Oncogene. 2014
26. UV-light-induced signal cascades and skin aging Laure Rittié, Gary J. Fisher. Ageing Research Reviews 2002 705–720.,25
27. Palak Shah and Yu-Ying He .Molecular Regulation of UV-Induced DNA Repair.Photochem Photobiol. 2015 Mar; 91(2): 254–264
28. Berg RJ1, Ruven HJ, Sands AT, de Gruijl FR, Mullenders LH. Defective global genome repair in XPC mice is associated with skin cancer susceptibility but not with sensitivity to UVB induced erythema and edema. J Invest Dermatol. 1998 Apr;110(4):405-9.
29. The (6-4) Dimeric Lesion as a DNA Photosensitizer.Vendrell-Criado V, Rodríguez-Muñiz GM, Lhiaubet-Vallet V, Cuquerella MC, Miranda MAChemphyschem. 2016 Jul 4;17(13):1979-82. AND Defective global genome repair in XPC mice is associated with skin cancer susceptibility but not with sensitivity to UVB induced erythema and edema. Chemphyschem. 2016 Jul 4;17(13):1979-82,
30. Pattison DI, Davies MJ. EXS. Actions of ultraviolet light on cellular structures. EXS. 2006;(96):131-57
31. Davies MJ. Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. Photochem Photobiol Sci. 2004 Jan;3(1):17-25. Epub 2003 Sep 3.
32. Cadet J, Douki T, Ravanat J-L 2008. Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells. Acc Chem Res 41:1075–83

33. Jean Cadet and Thierry Douki .Oxidatively Generated Damage to DNA by UVA Radiation in Cells and Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology* (2011)131 1005–1007.
34. Individual photosensitivity of human skin and UVA-induced pyrimidine dimers in DNA.. Mouret S, Leccia MT, Bourrain JL, Douki T, Beani JC.*J Invest Dermatol.* 2011 Jul;131(7)
35. Min Lu, Paul Miller, Xin Lu. Restoring the tumour suppressive function of p53 as a parallel strategy in melanoma therapy. *FEBS Letters* 2014 588 2616–2621)
36. Takema Y, Imokawa G .The effects of UV-A and UV-B irradiation on the viscoelastic properties of hairless mouse skin in vivo. *Dermatology* 1998 196:397–400.)
37. G Imokawa and K Ishida Biological mechanisms underlying the ultraviolet radiation-induced formation of skin wrinkling and sagging I:reduced skin elasticity, highly associated with enhanced dermal elastase activity, triggers wrinkling and sagging. *Int J Mol Sci.* 2015 Apr 8;16(4):7753-75
38. Imokawa G, Nakajima H, Ishida K. Biological mechanisms underlying the ultraviolet radiation-induced formation of skin wrinkling and sagging II: over-expression of neprilysin plays an essential role. *Int J Mol Sci.* 2015 Apr 8;16(4):7776-95.)
39. Lavker R, Kaidbey K The spectral dependence for UVA-induced cumulative damage in human skin. *J Invest Dermatol.* 1997 Jan;108(1):17-21.
40. Battie C, Jitsukawa S, Bernerd F, Del Bino S, Marionnet C, Verschoore M. New insights in photoaging, UVA induced damage and skin types. *Exp Dermatol.* 2014
41. S. Pillai, C. Oresajo and J. Hayward. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactiveoxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation – a review. *International Journal of Cosmetic Science*, 2005, 27, 17–34.

42. Scharffetter K, Wlaschek M, Hogg A, Bolsen K, Schothorst A, Goerz G, Krieg T, Plewig G. UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo Arch Dermatol Res. 1991;283(8):506-11.
43. Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries.
44. Katharine Briegera, Stefania Schiavonea, Francis J. Miller Jr.b, Karl-Heinz Krausea. Reactive oxygen species: from health to . Swiss Med Wkly. 2012;142
45. Lee WL, Huang JY, Shyur LF. Phytoagents for cancer management: regulation of nucleic acid oxidation, ROS, and related mechanisms. Oxid Med Cell Longev. 2013:925804
46. Hyunyun Kim, JisooYun, andSang-MoKwon. Therapeutic Strategies for Oxidative Stress-Related Cardiovascular Diseases: Removal of Excess Reactive Oxygen Species in Adult Stem Cells. Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2016
47. Liu B, Chen Y, St Clair DK. ROS and p53: a versatile partnership. Free Radic Biol Med. 2008 Apr 15;44(8):1529-35
48. Rittié L, Fisher GJ UV-light-induced signal cascades and skin aging. Ageing Res Rev. 2002 Sep;1(4):705-20.
49. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. Oxid Med Cell Longev. 2016:).
50. Sestili P and Fimognari C. Cytotoxic and Antitumor Activity of Sulforaphane: The Role of Reactive Oxygen Species. Biomed Res Int. 2015;2015:402386
51. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem J. 1973; 134:707–716.)

52. Scharffetter K, Wlaschek M, Hogg A, Bolsen K, Schothorst A, Goerz G, Krieg T, Plewig G. UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo Arch Dermatol Res. 1991;283(8):506-11
53. Oral administration of β -carotene or lycopene prevents atopic dermatitis-like dermatitis in HR-1 mice. Hiragun M, Hiragun T, Oseto I, Uchida K, Yanase Y, Tanaka A, Okame T, Ishikawa S, Mihara S, Hide M. J Dermatol. 2016 Oct;43(10):1188-1192
54. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. J Leukoc Biol. 1994 Nov; 56(5):559-64.
55. Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem and Biophys 1990; 280(1) : 1 – 8.
56. Birch-Marchin M. A. and A. Bowman. Oxidative stress and ageing. Br J Dermatol. 2016 Oct;175 Suppl 2:26-29
57. Halliwell B, Gutteridge JMC. Freeradicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford : Clarendon Press; 1989
58. Sciatti E, Lombardi C, Ravera A, Vizzardì E, Bonadei I, Carubelli V, Gorga E, Metra M. Nutritional Deficiency in Patients with Heart Failure. Nutrients. 2016 Jul 22;8(7)
59. Ivanov V, Ivanova S, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M. Inhibition of collagen synthesis by select calcium and sodium channel blockers can be mitigated by ascorbic acid and ascorbyl palmitate. Am J Cardiovasc Dis. 2016 May 18;6(2):26-35
60. Indo HP, Yen HC, Nakanishi I, Matsumoto K, Tamura M, Nagano Y, Matsui H, Gusev O5, Cornette R, Okuda T, Minamiyama Y, Ichikawa H, Suenaga S, Oki M, Sato T, Ozawa T, Clair DK, Majima HJ. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. J ClinBiochemNutr. 2015 Jan;56(1):1-7

61. Herndon JH Jr, Jiang LI, Kononov T, Fox T. An Open Label Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Tolerance of a Retinol and Vitamin C Facial Regimen in Women With Mild-to-Moderate Hyperpigmentation and Photodamaged Facial Skin. *J Drugs Dermatol*. 2016 Apr;15(4):476-82.
62. Niki E., Noguchi N., Tsuchihashi H., Gotoh N. Interaction among vitamin C., vitamin E., and beta-carotene. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995 62: 1322S-1326S
63. Littarru GP, Tiano L. Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q10: recent developments. *MolBiotechnol*. 2007 Sep;37(1):31-7
64. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE The effect of ascorbate and alpha-tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa.. *Mutagenesis*. 1999 Sep;14(5):505-12.).
65. Berger TM, Polidori MC, Dabbagh A, Evans PJ, Halliwell B, Morrow JD, Roberts LJ and, Frei B . Antioxidant activity of vitamin C in iron-overloaded human plasma.. *J Biol Chem*. 1997 Jun 20;272(25):15656-60.
66. Freitas JV, Gaspar LR. In vitro photosafety and efficacy screening of apigenin, chrysin and beta-carotene for UVA and VIS protection. *Eur J Pharm Sci*. 2016 Jun 30;89:146-53.
67. Keen MA, Hassan I . Vitamin E in dermatology. *Indian Dermatol Online J*. 2016 Jul-Aug;7(4):311-5.
68. Tohru Fukuoka , Rodney J. Folz, Ulf Landmesser, David G. Harrison. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease *Cardiovascular Research* 55 2002 239–249.

69. Indo HP, Yen HC, Nakanishi I, Matsumoto K, Tamura M, Nagano Y, Matsui H, Gusev O5, Cornette R, Okuda T, Minamiyama Y, Ichikawa H, Suenaga S, Oki M, Sato T, Ozawa T, Clair DK, Majima HJ. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *J ClinBiochemNutr*. 2015 Jan;56(1):1-7
70. Mohammed Ahmad Habib, Samar Abdallah M. Salem, Sarah Adel Hakim &Yahia Ahmad Mostafa Shalan.Comparative immunohistochemical assessment of cutaneous cyclooxygenase-2 enzyme expression inchronological aging and photoaging.
71. Birch-Machin MA, Russell EV, Latimer JA. Mitochondrial DNA damage as a biomarker for ultraviolet radiation exposure and oxidative stress. *Br J Dermatol*. 2013 Jul;169 Suppl 2:9-14
72. Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura AM, Saura-Calixto F. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *MolNutr Food Res*. 2009 Sep;53 Suppl 2:S310-29
73. Myung-Ja Kwon, ByungHak Kim, Yun Sang Lee, Tae-Yoon Kim Role of superoxide dismutase 3 in skin inflammation
74. Liu Y, Chan F, Sun H, Yan J, Fan D, Zhao D, An J, Zhou D. Resveratrol protects human keratinocytes HaCaT cells from UVA-induced oxidative stress damage by downregulating Keap1 expression. *Eur J Pharmacol* 2011 Jan 10;650(1):130-7
75. A, Barreca D, Bellocco E, Trombetta D. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *Smeriglio. Br J Pharmacol*. 2016
76. Soeur J, Eilstein J, Léreaux G, Jones C, Marrot L. Skin resistance to oxidative stress induced by resveratrol: from Nrf2 activation to GSH biosynthesis. *Free RadicBiol Med*. 2015 Jan;78:213-23.

77. Oyetakin White P, Tribout H, Baron E. Protective mechanisms of green tea polyphenols in skin. *Oxid Med Cell Longev*. 2012
78. Afaq F, Katiyar SK Polyphenols: skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. *Mini Rev Med Chem*. 2011 Dec;11(14):1200-15.
79. Bastianetto S, Ménard C, Quirion R. Neuroprotective action of resveratrol. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Jun;1852(6):1195-201.
80. Benedict AL, Knatko EV, Dinkova-Kostova AT. The indirect antioxidant sulforaphane protects against thiopurine-mediated photooxidative stress. *Carcinogenesis*. 2012 Dec;33(12):2457-66).
81. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. Ann N Y Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Acad Sci*. 2000 Jun;908:244-54
82. Sophia N Mowla Neil D Perkins Parmjit S Jat. Friend or foe: emerging role of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells in cell senescence. *OncoTargets and Therapy* 2013;6 1221–1229
83. Yong Zhuang and John Lyga. Inflammaging in Skin and Other Tissues - The Roles of Complement System and Macrophage
84. Brugè F, Damiani E, Marcheggiani F, Offerta A, Puglia C, Tiano L. A comparative study on the possible cytotoxic effects of different nanostructured lipid carrier (NLC) compositions in human dermal fibroblasts. *Int J Pharm*. 2015 Nov 30;495(2):879-85
85. Venditti, E., Spadoni, T., Tiano, L., Astolfi, P., Greci, L., Littarru, G.P., Damiani, E.. In vitro photostability and photoprotection studies of a novel 'multi-active' UV-absorber. *Free Radic. Biol. Med*. 2008 45, 345–354

86. Seite, S., Moyal, D., Richard, S., de Rigal, J., Leveque, J.L., Hourseau, C., Fourtanier, A., 1998. Mexoryl SX: a broad absorption UVA filter protects human skin from the effects of repeated suberythemal doses of UVA. *J. Photochem. Photobiol. B* 44,69–76.
87. Brugè F, Bacchetti T, Principi F, Scarpa ES, Littarru GP, Tiano L. Olive oil supplemented with Coenzyme Q(10): effect on plasma and lipoprotein oxidative status. *Biofactors*. 2012 May-Jun;38(3):249-56)
88. Junfei Jin Kamala P. Sundararaj Devadoss J. Samuvel Xiaoming Zhang Yanchun Li Zhongyang Lu Maria F. Lopes-Virella and Yan Huang. Different Signaling Mechanisms Regulating IL-6 Expression by LPS between Gingival Fibroblasts and Mononuclear Cells: Seeking the Common Target. *Clin Immunol*. 2012 May ; 143(2): 188–199.
89. Andrew Mamalis , Duc-Huy Nguyen, Neil Brody and Jared Jagdeo. The Active Natural Anti-Oxidant Properties of Chamomile, Milk Thistle, and Halophilic Bacteria Components in Human Skin In Vitro.
90. Claudio Franceschi and Judith Campisi. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases
91. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. *J. Leukoc Biol*. 1994 Nov;56(5):559-64.
92. Mohammed Ahmad Habib, Samar Abdallah M. Salem, Sarah Adel Hakim & Yahia Ahmad Mostafa Shalan. Comparative immunohistochemical assessment of cutaneous cyclooxygenase-2 enzyme expression in chronological aging and photoaging.
93. Huang CH, Li HJ, Wu NL, Hsiao CY, Lin CN, Chang HH, Hung CF. Photoprotective Effects of Cycloheterophyllin against UVA-Induced Damage and Oxidative Stress in Human Dermal Fibroblasts. *PLoS One*. 2016 Sep 1;11(9).
94. Paul Talalay, Jed W. Fahey, Zachary R. Healy, Scott L. Wehage, Andrea L. Benedict, Christine Min, and Albena T. Dinkova-Kostova Sulforaphane mobilizes cellular defenses that protect skin against damage by UV radiation *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct 30; 104(44): 17500–17505)

95. Photoprotective and anti-skin-aging effects of eicosapentaenoic acid in human skin in vivo Hyeon Ho Kim, Soyun Cho, Serah Lee, Kyu Han Kim, Kwang Hyun Cho, Hee Chul Eun, and Jin Ho Chung *Journal of Lipid Research* Volume 47, 2006).
96. Rajendran P, Rengarajan T, Nandakumar N, Palaniswami R, Nishigaki Y, Nishigaki I. Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. *Eur J Med Chem.* 2014 Oct 30;86:103-12.
97. Apigenin: A Promising Molecule for Cancer Prevention. S Shukla and S Gupta. *Pharm Res.* 2010 June ; 27(6): 962–978.
98. Wolf J, Weinberger B, Arnold CR, Maier AB, Westendorp RG, Grubeck-Loebenstien B The effect of chronological age on the inflammatory response of human fibroblasts. *Exp Gerontol.* 2012 Sep;47(9):749-53.
99. Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol.* 1997 Aug;151(2):317-22
100. Yan M, Liu Z, Yang H, Li C, Chen H, Liu Y, Zhao M, Zhu Y. Luteolin decreases the UVA-induced autophagy of human skin fibroblasts by scavenging ROS.
101. Lee AS, Kim JS, Lee YJ, Kang DG, Lee HS Anti-TNF- α activity of *Portulaca oleracea* in vascular endothelial cells.
102. M Singh, S Suman, and Y Shukl. New Enlightenment of Skin Cancer Chemoprevention through Phytochemicals: In Vitro And In Vivo Studies and the Underlying Mechanisms. *BioMed Research International* Volume 2014.
103. Wölfle U, Haarhaus B, Schempp CM. The photoprotective and antioxidative properties of luteolin are synergistically augmented by tocopherol and ubiquinone. *Planta Med.* 2013 Jul;79(11):963-5.