



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in *Biologia Molecolare e Applicata*
Curriculum *Scienze della Nutrizione*

Fotodanno a fibroblasti del derma umano: strategie di protezione dallo stress ossidativo e danno al DNA.

Photodamage in human dermal fibroblasts:
protection strategies against oxidative stress and
DNA damage.

Tesi di Laurea Magistrale di:
Beatrice Maggio

Primo Relatore:
Dott. Luca Tiano

Secondo Relatore:
Dott.ssa Elisabetta Damiani

Correlatore:
Dott.ssa Sonia Silvestri

Anno Accademico 2018/2019

Indice

Introduzione

1. La pelle

1.1 La Composizione degli Strati della Pelle

2. Le Radiazioni Solari

2.1 Gli effetti benefici delle radiazioni solari

2.2 Gli effetti dannosi delle radiazioni solari

3. Il Fotoinvecchiamento

3.1 I Radicali Liberi

4. Antiossidanti

5. Scopo della Tesi

6. Materiali e Metodi

6.1 Colture Cellulari

6.1.2 Reagenti

6.2 Preparazione delle Sostanze Antiossidanti e Irraggiamento delle Cellule

6.3 Valutazione della Vitalità Cellulare: Saggio del Presto Blue

6.4 Valutazione dei Livelli intracellulari di ROS: Saggio della Diclorofluorescina Diacetato (DCFH-DA)

6.5 Valutazione del Danno al DNA: Comet Assay

7. Risultati

7.1 Vitalità Cellulare, Livelli Intracellulari Di ROS e Danno Ossidativo al DNA

In HDF

7.2 Vitalità Cellulare in HDF dopo 24 Ore di Trattamento con la 5-Tioistidina

o il Polline

8. Discussione e Conclusioni

Bibliografia

Introduzione

L'esposizione alla radiazione solare è uno degli argomenti più discussi e trattati dagli esperti ed ampiamente coperto dai media in relazione alla salute umana. In particolare durante i mesi estivi è consuetudine esporsi alla luce solare per il benessere della persona e per fini estetici, sia attraverso l'esposizione alla luce naturale del sole sia attraverso l'uso di metodiche artificiali come i lettini abbronzanti.

La radiazione solare tuttavia, oltre ad avere effetti positivi espone l'organismo anche a diversi rischi per la salute. In questo contesto svolge un ruolo chiave il concetto di dose di esposizione. Entro una certa misura infatti, l'esposizione alla luce solare esplica un effetto positivo nei confronti dell'organismo perché partecipa al pathway metabolico per la produzione di vitamina D3, ed è utile nel trattamento di patologie croniche e non della pelle come la vitiligine e la psoriasi. Allo stesso tempo però la radiazione ultravioletta può danneggiare i costituenti cellulari e produrre specie reattive dell'ossigeno (ROS) in seguito a fotolisi dell'acqua. In particolare la pelle rappresenta la prima barriera fisica tra l'organismo e l'ambiente esterno e per questo motivo va protetta da una dose eccessiva di radiazioni solari che possono danneggiarla in maniera più o meno grave passando dalle scottature all'invecchiamento precoce, fino alla comparsa di tumori della pelle.

Particolare attenzione viene posta sulla radiazione ultravioletta (UV) e sul suo intervallo di frequenza con un maggiore potenziale cancerogeno. A causa dell'inquinamento ambientale, la quantità di raggi UV che raggiunge la terra aumenta sempre di più e purtroppo la nostra pelle possiede un limitato potenziale di difesa dai danni da essa indotti. Diventa quindi sempre più necessario riuscire a mettere a punto dei sistemi di fotoprotezione efficace.

1. La pelle

La pelle, il più esteso e il primo organo di protezione del corpo, copre l'intera superficie esterna dell'organismo e si presenta come prima barriera fisica che ci separa dall'ambiente esterno. La cute assume un ruolo di spiccata importanza e molteplici sono le funzioni da essa svolte come, ad esempio, quelle di:

- protezione dai microrganismi, dalla disidratazione, dalla luce ultravioletta e dal danno meccanico
- sensoriale per la rilevazione del dolore, della temperatura, del tatto e della pressione
- endocrina per la produzione di vitamina D
- escretoria per l'eliminazione di acqua, urea e ammoniaca
- immunitaria
- mantenimento dell'omeostasi

A livello anatomico, la pelle si divide in tre strati, ossia l'epidermide, il derma e l'ipoderma e tutti e tre gli strati presentano significativa variabilità sia anatomica che funzionale (Fig. 1).

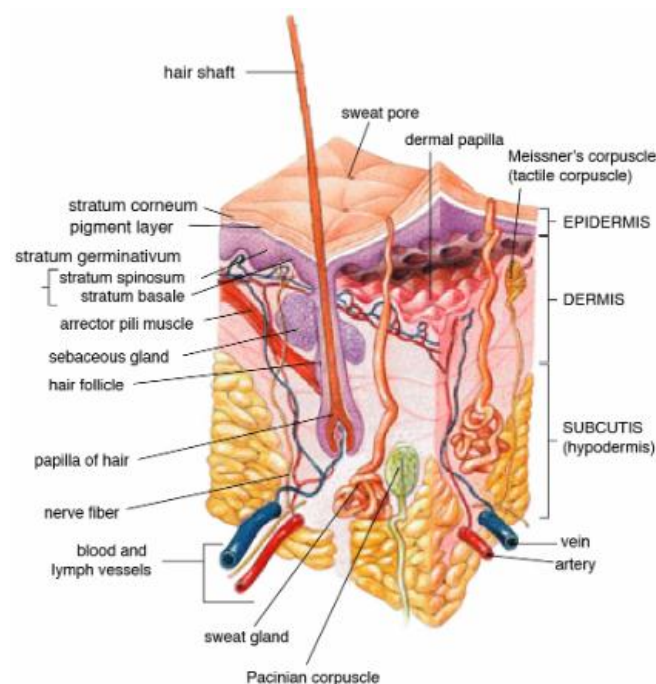


Fig. 1 Rappresentazione schematica della pelle

1.1 La composizione degli strati della pelle

L'epidermide, lo strato più esterno, è composto da un epitelio squamoso, cheratinizzato e stratificato, di origine ectodermica. Nell'uomo lo spessore di questo strato varia dai 30 μm ai 2 mm raggiungendo valori superiori nel palmo delle mani e dei piedi. L'epidermide include: lo strato basale (la porzione più profonda dell'epidermide), lo strato spinoso, lo strato granuloso, lo strato lucido e lo strato corneo (la porzione più superficiale) (Yousef H. *et al.*, 2019). La popolazione cellulare che caratterizza questo strato sono i cheratinociti che subiscono il processo di cheratinizzazione in cui le cellule degli strati più profondi migrano verso l'esterno ed esprimono e accumulano sotto forma di filamenti la cheratina, una proteina, perdendo così il nucleo e gli organuli cellulari.

Lo strato basale, anche conosciuto come strato germinativo, è separato dal derma grazie alla lamina basale. In questo strato ritroviamo cellule staminali mitoticamente attive, di forma cubica o cilindrica, che generano due cellule figlie: una mantiene le caratteristiche di cellula staminale mentre l'altra subisce il processo di cheratinizzazione e perde la sua capacità proliferativa. Le cellule dello strato basale contengono anche granuli di melanina, prodotti dai melanociti, che si accumulano al di sopra del nucleo (Rosati P. *et al.*, 1197).

Lo strato spinoso, costituito da 3-7 ordini di cellule di forma poliedrica, varia il suo spessore a seconda della zona presa in considerazione. Questo strato prende il suo nome da una caratteristica peculiare delle cellule: queste presentano dei prolungamenti, le spine, poi scoperti essere dei fasci di tonofibrille. Come per le cellule dello strato basale, anche qui troviamo granuli di melanina detti melanosomi. Le cellule più superficiali contengono granuli di diametro 0.1-0.3 μm , detti cheratinociti, situati nella porzione apicale della cellula. Questi granuli sono delimitati da una membrana e contengono delle lamelle lipidiche parallele che vengono trasportate nello spazio extracellulare attraverso il processo di esocitosi. Si crea così una barriera impermeabile all'acqua che protegge l'epidermide. Inoltre, le cellule più superficiali producono l'involucrina che insieme alla loricrina, una proteina secreta dalle cellule dello strato granuloso, ispessiscono e irrobustiscono l'involucro cornificato (Rosati P. *et al.*, 1197).

Lo strato granuloso, costituito da 3-5 ordini di cellule, contiene cellule a forma di diamante contenenti granuli di cheratoialina e lamellari. I granuli di cheratoialina contengono precursori di cheratina che successivamente si aggregano, cross-linkano e formano legami. Invece i granuli lamellari contengono glicolipidi che sono secreti nella superficie delle cellule e hanno la funzione di collante, tenendo le cellule vicine.

Lo strato lucido che rappresenta lo strato più sottile é formato da cellule appiattite e allungate, contenenti nel loro citoplasma eleidina, un prodotto di trasformazione della cheratoialina (Rosati P. *et al.*, 1997).

Lo strato corneo presenta cellule che si sono progressivamente modificate in elementi lamellari appiattiti cheratinizzati detti corneociti. Quest'ultimi sono anucleati, senza granelli e disidratati, ma contenenti filamenti di cheratina stabilizzati da ponti di solfuro, cementati da filaggrina e immersi in una matrice densa e amorfa fatta di involucrina (Anastasi G. *et al.*, 2006). È all'interno di questo strato che vengono secrete le defensine che fanno parte della nostra risposta immunitaria.

Oltre ai cheratinociti si trovano altri tipi di cellule di origine non ectodermica: i melanociti, le cellule di Langerhans e le cellule di Merkel.

I melanociti risiedono nello strato basale dell'epidermide dove formano unità di melanina come risultato della relazione tra un melanocita e 30-40 cheratinociti associati. Questa relazione è essenziale per il trasporto di melanina fino ai cheratinociti per il processo di colorazione della pelle e di fotoprotezione. I melanociti presentano delle formazioni particolari chiamate melanosomi. Questi sono delimitati da una membrana e presentano una matrice interna che è sede della formazione di melanina.

La melanina è un polimero chinonico di elevato peso molecolare in grado di assorbire l'energia delle radiazioni luminose visibili e dei raggi ultravioletti (Anastasi G. *et al.*, 2006). La melanina si presenta sotto tre forme: feomelanina, eumelanina e neuromelanina. La via biosintetica per la feomelanina e l'eumelanina inizia allo stesso modo. L-Tirosina viene convertita in L-diidrossifenilalanina (DOPA), reazione che richiede l'enzima tirosina idrossilasi. Gli step successivi per la produzione delle due molecole sono molteplici e rientrano tutti nella via biosintetica nota con il nome di Raper-Mason (Park HY *et al.* 2009) (Fig.2).

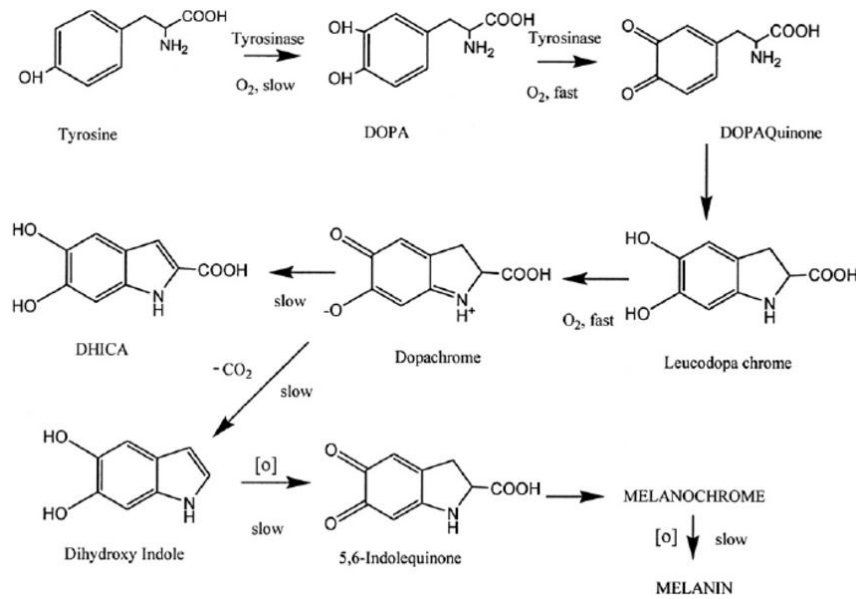


Fig. 1.1 Via biosintetica di Raper-Mason

Lo stimolo primario per la melanogenesi è la radiazione UV che stimola la produzione di proopiomelanocortina (POMC) e dei suoi prodotti a valle come l'ormone alpha melanocita stimolante (α -MSH) e l'ormone adrenocorticotropo (ACTH).

Le cellule di Langerhans sono dotate di prolungamenti cellulari e sembrano essere coinvolte nella risposta immunitaria. Queste cellule infatti si originano dal precursore emopoietico CD34p del midollo osseo e sono capaci di riconoscere e captare gli antigeni presenti sulla pelle (Kanitakis J. 2002).

Infine, le cellule di Merkel si pensa possano avere una funzione recettoriale in quanto presentano terminazioni nervose.

Ciò che determina la separazione tra l'epidermide e il derma sottostante è la lamina basale. Essa oltre ad avere una funzione di supporto meccanico consente anche il trasporto di ossigeno e dei metaboliti della matrice dermica fino alle cellule epidermiche così come anche l'eliminazione dei loro cataboliti. È costituita da tre strati di matrice cellulare: la lamina lucida, la lamina densa e quella reticolare. La lamina lucida contiene collagene di tipo IV, proteoglicani, glicoproteine e glicosaminoglicani mentre la lamina densa è

composta da filamenti dispersi in una matrice amorfa e la lamina reticolare è costituita principalmente da collagene (Rosati P. *et al.*, 1997).

Il derma è uno strato di tessuto connettivo di origine mesenchimale tra l'epidermide e il tessuto sottocutaneo. Il derma è una struttura fibrosa composta da collagene, tessuto elastico e altre componenti extracellulari tra cui terminazioni nervose, vasi sanguigni, ghiandole e follicoli piliferi. Il ruolo del derma è quello di supportare e proteggere la pelle e gli strati più profondi così come partecipare anche al processo di termoregolazione (Brown T.M. *et al.*, 2018). Come già detto, il derma è una struttura fibrosa che presenta una matrice amorfa extracellulare in cui si ritrovano i glicosaminoglicani come l'acido ialuronico, i proteoglicani e i glicolipidi.

Il derma è diviso in due strati: lo strato papillare e lo strato reticolare. Quello papillare è più superficiale ed è costituito da tessuto connettivo lasso altamente vascolarizzato mentre lo strato reticolare è più profondo costituito da tessuto connettivo denso e rappresenta il corpo del derma.

Il collagene rappresenta il componente principale del derma, soprattutto il collagene di tipo I e III. Anche le fibre elastiche hanno un ruolo strutturale importante nel derma e sono costituite da elastina e da microfibrille di fibrillina. Esistono due sottotipi di fibre elastiche: elanina e oxytalan. L'elanina si trova sia nello strato papillare che reticolare e le fibre sono disposte in parallelo, mentre le fibre di oxytalan si trovano solo nello strato papillare e le fibre sono disposte in perpendicolare.

Tra le tipologie di cellule presenti nel derma ritroviamo: cellule staminali, macrofagi, adipociti, mast cells e i fibroblasti.

I fibroblasti producono la componente fibrillare dei tessuti connettivi e sono implicati nella elaborazione della sostanza amorfa e dei suoi complessi macromolecolari. Dal punto di vista morfologica, appaiono come cellule fusiformi allungate con un reticolo endoplasmatico rugoso per la sintesi dei polipeptidi precursori del collagene, dell'elastina e dei proteoglicani. Il reticolo di Golgi anche è ben sviluppato e produce vescicole che vengono poi secrete nell'ambiente esterno e visibili attraverso il microscopio.

L'ipoderma o tessuto sottocutaneo è lo strato più profondo della pelle. È costituito da tessuto connettivo fibrillare lasso ricco di fibre elastiche e adipociti. Le funzioni dell'ipoderma sono: la regolazione della temperatura, l'isolamento termico, di riserva energetica e la protezione dai traumi meccanici.

2. Le radiazioni solari

La luce solare è composta da uno spettro di radiazioni elettromagnetiche suddivise in base alla lunghezza d'onda in raggi ultravioletti, luce visibile e raggi infrarossi. La quantità di raggi che raggiunge la terra dipende da vari fattori quali la latitudine, la stagione, la copertura nuvolosa e l'ora del giorno.

La radiazione ultravioletta è la componente meno abbondante e comprende le radiazioni con una lunghezza d'onda tra i 100 nm e i 400 nm. All'interno di questo intervallo è possibile un'ulteriore divisione in tre regioni: long wave UVA (315-400 nm), medium wave UVB (280-315 nm) e short wave UVC (280-100 nm). Le radiazioni UVA infine sono ulteriormente suddivise in UVA I (340-400 nm) e UVA II (320-340 nm) (Fig. 3).

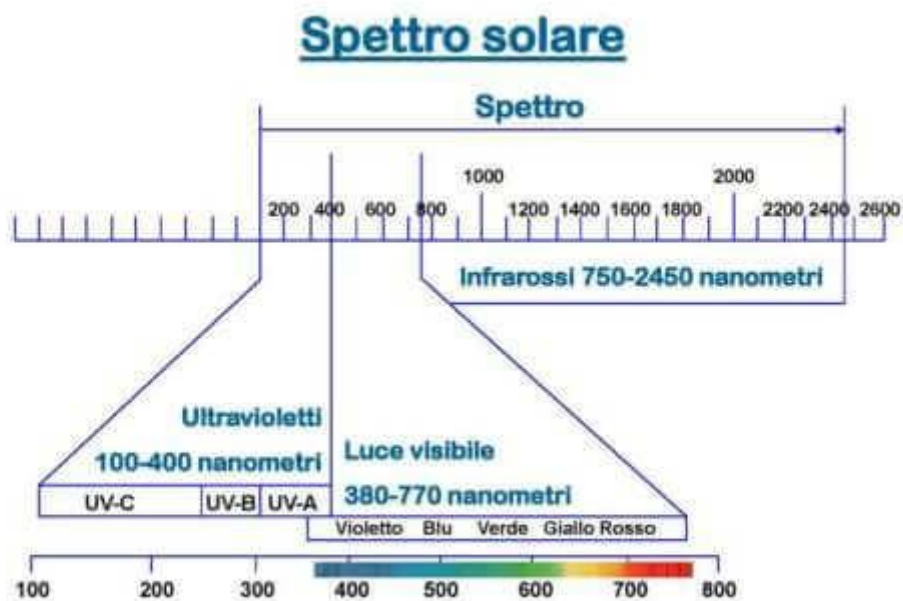


Fig. 2 Spettro solare

Nello spettro degli UV, le radiazioni UVC sono le più energetiche, hanno un elevato potenziale tossico e mutagenico nei confronti dei sistemi biologici ma fortunatamente lo strato di ozono nella stratosfera riesce ad assorbirle e a bloccarne l'arrivo sulla terra.

Le radiazioni UVB, anch'esse in parte vengono schermate ed assorbite dallo strato di ozono ma una piccola percentuale riesce a raggiungere la superficie terrestre e quindi anche la cute umana. Fortunatamente queste radiazioni sono poco penetranti e agiscono solo sugli strati superficiali dell'epidermide, fermandosi allo strato corneo, senza raggiungere il derma. Sono responsabili della comparsa degli eritemi ed alterano le difese immunitarie della pelle provocando immunosoppressione. L'esposizione prolungata alla radiazione UVB senza adeguata protezione può indurre all'insorgenza di tumori della pelle.

Infine, le radiazioni UVA sono le uniche capaci di penetrare la pelle fino a raggiungere il derma, la componente più vitale della pelle. In questo contesto il danneggiamento della componente cellulare e proteica del derma ha un ruolo importante nell'accelerare i processi naturali della senescenza inducendo processi definiti di fotoinvecchiamento.

2.1 Gli effetti benefici delle radiazioni solari

Molteplici sono gli effetti della fotoesposizione sia a livello cutaneo che a livello metabolico. La prima risposta della cute dopo 30 secondi dall'inizio dell'esposizione ai raggi solari, e che si protrae per i successivi 30 minuti, è la immediate pigment darkening (IPD) e si presenta come una colorazione brunastra dovuta alla foto-ossidazione della melanina e a cambiamenti nella distribuzione dei melanociti. Una risposta meno immediata è la persistent pigment darkening (PPD) utilizzata anche come fattore per la misurazione della protezione ai danni degli ultravioletti (Moloya D. *et al.*, 2000).

Se visivamente il cambio della colorazione è evidente, i cambiamenti metabolici non visibili sono assai più importanti, primo fra tutti il ruolo delle radiazioni solari nel metabolismo della vitamina D3. Il precursore della vitamina D3, ovvero il 7-deidrocolesterolo, presente negli strati basale e spinoso della pelle, grazie alla radiazione UV va incontro a una reazione eterociclica diventando così pre-colecalciferolo che a sua volta, tramite una isomerizzazione spontanea, si trasforma in vitamina D3. Quest'ultima subisce successivamente una doppia idrossilazione prima a livello epatico e poi a livello renale terminando con la produzione della sua forma biologicamente attiva, ossia il calcitriolo (Diffey BL 2005). Se il ruolo della vitamina D3 è noto nel metabolismo osseo e nell'assorbimento del calcio, si pensa che essa possa svolgere dei ruoli importanti anche nella proliferazione cellulare, nella differenziazione, nell'apoptosi e nella risposta infiammatoria e immunitaria, ed essere così collegata a patologie di notevole complessità fattoriale come il cancro, le malattie cardiovascolari, il diabete e la sclerosi multipla. La radiazione ultravioletta potrebbe quindi avere un ruolo in maniera indiretta nel trattamento di queste patologie (Juzeniene A. *et al.*, 2012).

Le radiazioni solari sono anche l'elemento alla base della fototerapia. Quest'ultima consiste nel trattamento di patologie della pelle attraverso appunto la radiazione UV come, ad esempio, la psoriasi, la vitiligine, la dermatite atopica e la sclerodermia. I meccanismi attraverso cui la radiazione UV sembra apportare beneficio ai soggetti affetti da queste patologie non sono molto chiari, ma sembra sia dovuto all'interazione

tra la radiazione UV e i nucleotidi ma anche tra UV e target molecolari extranucleari. L'assorbimento della radiazione da parte dei nucleotidi ad esempio, non solo determina la formazione di foto-prodotti del DNA, primi fra tutti i dimeri delle pirimidine ma anche una diminuzione del tasso di sintesi del DNA stesso. Gli effetti dell'interazione tra i raggi UV ed altre molecole possono essere riscontrate anche nel metabolismo proteico, come la fotoisomerizzazione dell'acido trans urocanico, un derivato del catabolismo dell'istidina, in acido cis urocanico che sembra avere effetti immunosoppressivi. L'esposizione alla luce ultravioletta sembra avere infine effetti anche sui cheratinociti, linfociti T, monociti, cellule di Langerhans e fibroblasti, esercitando su tutte queste tipologie cellulari un abbassamento della loro proliferazione e dunque essere utile per il trattamento delle patologie della pelle sopracitate (Juzeniene A. *et al.*, 2012).

2.2 Gli effetti dannosi delle radiazioni solari

Tra gli effetti dannosi dovuti all'esposizione alle radiazioni solari, possiamo fare due distinzioni: quelli con conseguenza immediata e quelli con conseguenza tardiva.

L'eritema è sicuramente uno degli effetti più comuni e si manifesta attraverso un rossore della pelle dovuto alla dilatazione dei vasi sanguigni superficiali del derma (Differy BL 2005). Se i raggi UVA possono anche non determinare la comparsa dell'eritema in alcuni soggetti, i raggi UVB causano una comparsa ritardata dell'eritema. Quest'ultimo, caratterizzato non solo dal rossore cutaneo ma anche dalla comparsa di bolle, prurito e dolore, compare dopo 3-4 ore dall'esposizione andando ad intensificarsi nelle successive 24 ore. La dose di UVA necessaria per scatenare l'eritema, ovvero la dose minima eritematosa (MED), è compresa tra 20 e 70 J/cm², ed è 600-1000 volte superiore a quella richiesta per gli UVB (20-1000 mJ/cm²).

L'eritema è forse la conseguenza meno grave in quanto gli effetti dannosi con conseguenza tardiva hanno un indice di gravità decisamente maggiore. L'eccessiva e prolungata esposizione agli UV promuove l'accumulo di molecole ossidate e lesioni al DNA, che insieme al danneggiamento dei meccanismi di riparazione causano infiammazione della pelle, foto-invecchiamento e carcinogenesi.

La carcinogenesi rappresenta la conseguenza più grave dell'eccessiva esposizione ai raggi UV, i principali responsabili della comparsa dei tumori della pelle e quindi della carcinogenesi sembrano essere gli UVB. Il DNA assorbe in maniera diretta questo tipo di radiazioni poiché gli acidi nucleici sono i principali cromofori di questo tipo di energia elettromagnetica generando così i dimeri delle pirimidine ciclobutano (CPD) e le pirimidine-(6-4)-pirimidone (6-4PP) (Fig 4). I CPD sono i maggiori responsabili della carcinogenesi indotta dagli UV poiché rispetto ai 6-4PP sono rimossi più lentamente dai meccanismi di riparazione anche se altri studi mostrano come i 6-4PP possano essere convertiti in isomeri di Dewar (poco riparati) e partecipare anch'essi al processo mutageno e di carcinogenesi della pelle. La sostituzione più ricorrente sembra essere la sostituzione della tiamina con la citosina (T to C) provocando le "UVB fingerprint mutations". Le radiazioni UVA a minore energia sono poco assorbite dal DNA ma possono essere assorbite da altri

cromofori cellulari, provocando la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), generando quindi stress ossidativo. Il target principale dei ROS sembra essere la guanina producendo la guanina ossidata 8-ossi-7,8-diidroguanina (8-ossiGua). La presenza di quest'ultima porta alle così dette "UVA fingerprint mutations" dovute all'inusuale transversione da T a G (Brozyna A. *et al.*, 2017). Le forme più comuni di tumori della pelle sono il carcinoma delle cellule basali (BCC), il carcinoma a cellule squamose (SCC) e il melanoma maligno (MM).

Le prime due forme citate di carcinomi riguardano due strati diversi che compongono l'epidermide. Se il carcinoma delle cellule basali si presenta nello strato più profondo dell'epidermide quello a cellule squamose invece si manifesta nello strato spinoso dell'epidermide (più superficiale). In entrambi i casi il carcinoma si presenta sotto forma di noduli. L'incidenza di queste due tipologie è molto alta, circa il 90% dei tumori della pelle rientra in queste categorie, ma sono anche facilmente curabili e raramente mortali.

Il melanoma sorge a seguito di una mutazione a livello dei melanociti, le cellule responsabili della pigmentazione. Questa tipologia di tumore maligno si presenta solo nell'1% della popolazione, colpisce specialmente quella caucasica senza una prevalenza di genere, ma rimane uno dei più aggressivi e mortali a causa dell'insorgenza di metastasi che invadono tessuti, organi circostanti e non.

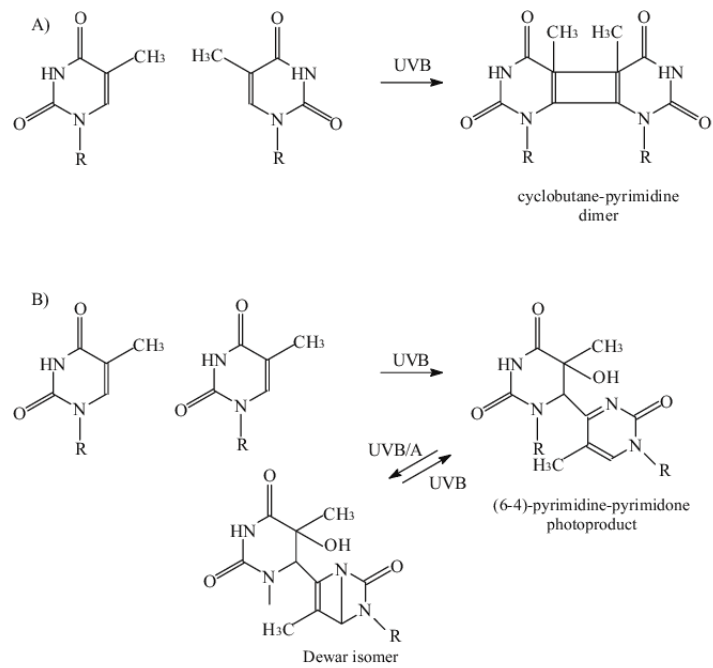


Fig. 4 Rappresentazione del dimero delle pirimidine (A) e del fotoprodotto pirimidine-(6-4)- pirimidone e isomero di Dewar (B) in seguito ad assorbimento di UVB

3. Il Fotoinvecchiamento

Nel contesto di questa tesi, viene posto maggiore interesse su un'altra conseguenza dell'esposizione dei raggi UV, il fotoinvecchiamento.

L'integrità della pelle è dovuta principalmente alla presenza di collagene. Quest'ultimo è una proteina fibrosa insolubile presente nel tessuto connettivo e nella matrice dermica extracellulare dove conferisce alla pelle forza e elasticità. Il collagene si forma da precursori chiamati procollagene che sono espressi da geni codificanti presenti nei fibroblasti. Vi sono diverse forme di procollagene ma nell'uomo quelli più abbondanti sono quelli di tipo I e III (Poon F. *et al.*, 2014). La sintesi di collagene è altamente regolata da eventi extra- e inter- cellulari. Un regolatore è il fattore di crescita beta trasformante le citochine (TGF- β) che promuove la produzione di collagene e ha un ruolo anche nella riparazione delle ferite. Invece, il fattore di trascrizione attivante la proteina 1 (AP-1) inibisce la formazione di collagene e attiva la sua degradazione (Kang S. *et al.*, 1997). Due famiglie di molecole presentano un ruolo nel fotoinvecchiamento: le protein chinasi attivate da mitogeni (MAPK) e le metallo proteinasi (MMP). Per quanto riguarda la prima classe di molecole, le MAPK svolgono un ruolo nella crescita cellulare e nella formazione di procollagene I (Fisher. GJ. *et al.*, 1998). La radiazione UV stimola il pathway di trasduzione delle MAPK. In seguito, l'up-regulation del

pathway di signalling stimola i recettori per il fattore di crescita epidermico, la proteina regolatoria legante il GTP p21Ras, la chinasi extracellulare (ERK), il gene p38 e c-jun. Tutta questa cascata di segnali porta alla formazione di AP-1 (Berneburg M. *et al.*, 2000). Dall'altro canto, l'esposizione ai raggi UV determina un aumento dell'espressione genica delle metallo proteine che a loro volta svolgono un'azione proteolitica degradando le proteine della matrice e riducendo la sintesi di collagene. Tutti questi cambiamenti a livello cellulare si riflettono con dei cambiamenti a livello istologico. Lo strato corneo dell'epidermide mostra il fenomeno di ipercheratosi. L'epidermide stessa si presenta come ipertrofica o atrofica o comunque alterata. Lo spessore della membrana basale aumenta a causa probabilmente di un danno ai cheratinociti o ad una alterazione della distribuzione dei melanociti, e anche la membrana stessa è irregolare in quanto le cellule che la compongono variano per la pigmentazione e la forma. La conseguenza principale nel derma è l'elastosi: una alterazione delle fibre elastiche. L'elastosi si verifica nella giunzione che collega lo strato reticolare con quello papillare del derma e non è riscontrabile nella pelle cronologicamente invecchiata. Tra le altre modificazioni della pelle fotoinvecchiata si possono riscontrare un rimpiazzo di fibre mature di collagene con fibre di collagene con un aspetto basofilico differente così come un aumento nella deposizione di glicosaminoglicani (Mitchell RE. *et al.*, 1967. Chen VL. *et al.*, 1986).

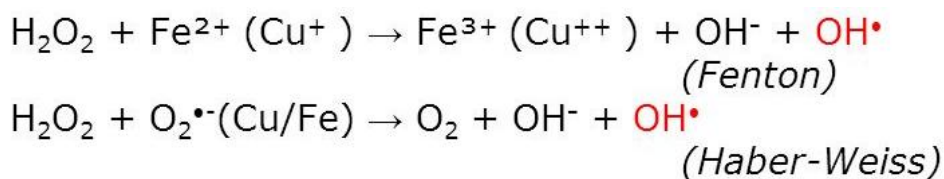
3.1 I radicali liberi

La radiazione UV oltre all'attivazione delle MMP e delle MAPK genera stress ossidativo nelle cellule, causando così invecchiamento precoce attraverso la produzione di radicali liberi. Questi ultimi sono delle specie chimiche che presentano uno o più elettroni spaiati nell'orbitale più esterno. La loro caratteristica principale è l'instabilità dovuta appunto agli elettroni spaiati che li porta a reagire e a combinarsi con un'altra molecola sottraendo un elettrone per ripristinare la propria stabilità elettronica. Quest'ultima conseguentemente diventa a sua volta instabile e ricerca un altro elettrone innescando così una reazione a catena. La formazione dei radicali liberi avviene mediante due meccanismi: per rottura omolitica di un legame covalente o per trasferimento elettronico. Tra i radicali liberi ritroviamo sia le specie reattive dell'azoto (RNS) e le specie reattive dell'ossigeno (ROS). Questi sono i più pericolosi in quanto l'ossigeno è naturalmente presente sotto forma di molecole biatomiche che presentano elettroni spaiati di spin uguali sistemati in orbitali diversi. Questa condizione rende l'ossigeno estremamente reattivo verso le specie radicaliche. Tra i ROS più comuni troviamo: il radicale superossido, il perossido di idrogeno, l'idrossi radicale, il perossi radicale, l'alcoossi radicale e l'ossigeno singoletto.

Partendo da una molecola di ossigeno e aggiungendo un elettrone nell'orbitale esterno, si ottiene il radicale superossido. Quest'ultimo rappresenta anche un sottoprodotto costitutivo dell'attività della catena di trasferimento elettronico mitocondriale per trasferimento di un elettrone dai trasportatori di elettroni direttamente all'ossigeno. Il radicale superossido può reagire conseguentemente con lipidi, proteine, polisaccaridi e acidi nucleici ma la sua reattività è piuttosto bassa e quindi non è eccessivamente tossico per l'organismo (eq 1).



La tossicità cambia quando questo radicale interagisce con l'acqua ossigenata generando il radicale idrossile (OH•) nella reazione di Haber Weiss. Il radicale idrossile si ottiene anche attraverso la reazione di Fenton in presenza di ferro. Combinando ferro e acqua ossigenata si ottiene il radicale idrossile e il ferro passa dallo stato 2+ a 3+. L'acqua ossigenata quindi è un composto pericoloso in quanto 1) a differenza delle altre specie reattive dell'ossigeno ha una maggiore stabilità e pertanto è in grado di migrare per notevoli distanze dal sito di produzione 2) In seguito alla sua conversione in radicale idrossile, conseguente alla reazione con anione superossido (Haber Weiss) o reazione con metalli di transizione (Fenton) può ossidare i composti sulfidrilici e danneggiare i costituenti molecolari della cellula in particolare il DNA (eq. 2).



I perossi radicali sono dovuti alla reazione di radicali centrati al carbonio con ossigeno molecolare. Questo radicale provoca la propagazione di catene di autossidazione come la perossidazione lipidica. La reattività dei perossi radicali diventa interessante nelle reazioni di terminazione che portano alla dimerizzazione del perossido a tetrossido. La decomposizione del tetrossido determina la formazione dell'ossigeno singoletto tra gli altri prodotti. Quest'ultimo non è un radicale vero e proprio, ma è un forte ossidante che reagisce con parecchie classi di composti: attacca i doppi legami dei carotenoidi, delle clorofille e degli acidi grassi insaturi. Esso danneggia anche i polipeptidi ossidando i residui di metionina, triptofano, istidina e cisteina. L'ossigeno singoletto ossida le basi puriniche pirimidiniche e provoca dunque danni al DNA.

È intuibile come i radicali liberi, soprattutto le specie reattive dell'ossigeno, siano estremamente dannosi e capaci di reagire con tutte le molecole di interesse biologico principali. Particolare attenzione va posta quindi nei metodi in grado di contrastare la loro formazione o comunque che siano in grado di neutralizzare la loro azione. Questo ruolo viene svolto da una classe di molecole ampiamente discusse in ambito di salute umana: gli antiossidanti.

4. Antiossidanti

Un antiossidante è una molecola sufficientemente stabile da essere in grado di donare un elettrone a una radicale libero e quindi neutralizzarlo e ridurre così il suo potere tossico. Gli antiossidanti ritardano o inibiscono il danno cellulare grazie alla loro proprietà di scavenger. Essi agiscono attraverso due meccanismi: o interrompendo la reazione a catena in quanto l'antiossidante primario dona un elettrone al radicale libero o eliminando i precursori dei radicali liberi. Gli antiossidanti possono essere sia di natura enzimatica che non enzimatica. Nell'ambito di questa tesi sono stati presi in considerazione tre antiossidanti non enzimatici di origine naturale: il polline, la 5-tioistidina e l'aspatina.

Il polline, presente nei fiori di svariate specie di piante, viene raccolto dalle api bottinatrici. In questa tesi il polline utilizzato proviene dai fiori di una pianta di castagno. I benefici del polline nell'uomo sono molteplici. Svolge un'azione epato-protettiva attivando gli enzimi antiossidanti e diminuendo la perossidazione lipidica nei soggetti affetti da epatite (Ialomiteanu *et al.*, 1976; Bevzo e Grygor'eva, 1997). Sembra avere anche un'attività ipolipidemizzante in quanto diminuisce i lipidi totali e i trigliceridi nel siero (Kassyanenko *et al.*, 2010). È interessante anche menzionare come il polline abbia proprietà antinfiammatorie inibendo l'attività della ciclossigenasi e della lipossigenasi, i due enzimi responsabili della

trasformazione dell'acido arachidonico in composti tossici come le prostaglandine e i leucotrieni responsabili della risposta infiammatoria cronica e acuta. Questo effetto antinfiammatorio è dovuta alla presenza di flavonoidi e acidi fenolici presenti nel polline (E.-M Choi, 2007). Grazie ai polifenoli viene utilizzato in questo studio per testare le sue effettive capacità antiossidanti, anche se come si vedrà nei risultati viene utilizzato l'acido gallico (GA), espresso come mg/L, come riferimento sperimentale per esprimere il contenuto in polifenoli e flavonoidi totali del polline.

La 5-tioistidina, detto anche ovotio A, è un composto naturale contenente zolfo biosintetizzato da invertebrati marini, microalghe e batteri ma non dai vertebrati (Castellano M. *et al.*, 2018). La sintesi dell'ovotio A inizia con l'accoppiamento ossidativo delle catene laterali della cisteina e della istidina per formare il coniugato 5-istidilcisteina sulfossido. Questo intermedio viene tagliato in una reazione peridossale 5-fosfato dipendente per formare la 5-tioistidina che viene metilata a livello dell'azoto imidazolico. L'ovotio A, facente parte di una famiglia di composti a basso peso molecolare chiamati tioli, permette di mantenere l'omeostasi redox cellulare. L'ovotio A riduce i perossidi attraverso l'attacco nucleofilo, possiede quindi una azione di scavenger. Questa non è la sua unica funzione in quanto diminuisce la proliferazione cellulare e attiva il processo autofagico nelle cellule cancerogene e contrasta il processo proinfiammatorio (Russo G.L. *et al.*, 2014).

L'asplatina, un glicoside diidrocalcone, è un composto bioattivo polifenolico presente nelle foglie e nei rametti di una pianta simile alla ginestra facente parte della famiglia delle Fabaceae chiamata rooibos o *Aspalathus linearis*. Il rooibos è originario del sud Africa e viene utilizzato per il trattamento di patologie della pelle grazie alle sue proprietà antiossidanti e antinfiammatorie. Gli estratti di questa pianta sono stati utilizzati in colture cellulari di cheratinociti (HaCat) esposti a radiazioni di tipo UVB. Dimostrando che il rooibos riduce in queste cellule l'accumulo di IL-1 α , una interleuchina proinfiammatoria ed induce l'apoptosi delle cellule che presentano alti livelli di IL-1 α (Magcwebeba *et al.*, 2008). Questi estratti sono utilizzati anche in cosmesi in quanto migliora l'idratazione della pelle e le rughe della pelle (Gaspar *et al.*, 2008). In altri studi effettuati su modello animale, l'effetto antiossidante del rooibos sembra essere efficace anche nella cardiomiopatia diabetica ed avere dunque effetti cardioprotettivi. In questo caso l'effetto benefico viene dimostrato su cardiomiociti di ratto in cui è stato indotto il diabete con la streptozocina.

L'estratto acquoso di rooibos fermentato protegge i cardiomiociti da stress ossidativo e ischemia (P.V. Dlundla *et al.*, 2014). L'aspatina sembra, inoltre, abbassare la concentrazione nel plasma di acido urico nei topi (Kondo *et al.*, 2013)

5. Scopo della tesi

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di allestire un modello di fotoinvecchiamento *in vitro* impiegando fibroblasti del derma umano irraggiati con radiazioni UVA. Nell'ambito delle modificazioni ossidative indotte dalla radiazione UVA, si è rivolta particolare attenzione al danno al DNA che rappresenta un sito sensibile all'interno della cellula e le cui manipolazioni determinano importanti alterazioni della funzionalità, esponendo la stessa a rischio cancerogenico. In questo contesto è stata ottimizzata la metodica del Comet Assay cercando di automatizzare i processi e rendere la procedura il più possibile operatore indipendente. In particolare, nell'ambito del disegno sperimentale, sono state anche indagate potenziali strategie protettive confrontando *in vitro* la capacità di due molecole antiossidanti naturali, di proteggere i fibroblasti di derma umano dal fotodanno indotto dall'esposizione ai raggi ultravioletti.

In particolare, le sostanze sperimentalmente testate nel presente lavoro di tesi sono state il **polline**, una sostanza presente in natura e ricca di amminoacidi, enzimi, acidi grassi, antiossidanti, vitamine, minerali, lipidi, carboidrati e polifenoli e la **5-tioistidina**, un composto tiolico isolato e purificato dalle uova del riccio di mare, che sembra avere anch'esso delle potenti proprietà antiossidanti.

6. Materiali e metodi

6.1 Colture Cellulari

Il modello sperimentale utilizzato è rappresentato da una coltura primaria di fibroblasti di derma umano (HDF). Le cellule sono state acquistate presso il Laboratorio Centro Substrati Cellulari dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia di Brescia. Le cellule sono state coltivate utilizzando un mezzo di coltura completo, costituito da MEM (Minimum Essential Medium) addizionato con Siero Fetale Bovino (FBS) al 10%, Penicillina e Streptomicina (P/S) e Glutamina (Glu), entrambi all'1%. Le HDF sono state mantenute in fiasche di mantenimento o piastre multiwell allestite al momento degli esperimenti, sterili, poste all'interno di un apposito incubatore, alla temperatura di 37°C, in un'atmosfera al 5% di CO₂ e di un sistema di controllo dell'umidità.

In particolare, ai fini dell'espansione della coltura cellulare, le HDF sono state mantenute in fiasche da 75 cm² o 25 cm², utilizzando una densità di semina rispettivamente di 500.000 e 300.000 cellule, mentre per l'allestimento degli esperimenti le cellule sono state seminate su piastre multiwell da 24/96/6 pozzetti. In questi casi la densità di semina è stata rispettivamente di 48.000-55.000 cellule/well, 8.000 cellule/well o 100.000 cellule/well. Gli esperimenti sono stati condotti tutti al raggiungimento del 90% di confluenza.

6.1.1 Reagenti

Tra i reagenti utilizzati per gli esperimenti troviamo:

Nome	Ditta Produttrice	Composizione
MEM (Minimum Essential Medium)	Carlo Erba	Aminoacidi, Sali minerali, Glucosio, Rosso Fenolo, Vitamine
FBS (Fetal Bovine Serum)	Carlo Erba	
Penicillina /Streptomicina	Carlo Erba	Penicillina 10000 U/mL, Streptomicina 10000 µg/mL
Glutammina	Carlo Erba	L-Glutammina 200 mM in soluzione acquosa di NaCl 0.85%
Tripsina/EDTA	Carlo Erba	Soluzione 1x
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Carlo Erba	Soluzione 10x

6.2 Preparazione delle Sostanze Antiossidanti e Irraggiamento delle Cellule

Le tre sostanze sono state preparate partendo da una soluzione stock con una concentrazione iniziale di 10 mM per la 5-tioistidina e 2,21 g/mL per il polline, disciolte rispettivamente in acqua sterile o etanolo/acqua (70/30). L'aspalatina invece è stata utilizzata partendo da una soluzione stock pari a 221,03 mM disciolta in dimetilsolfossido (DMSO). Dalle soluzioni madri delle tre sostanze sono state preparate diverse concentrazioni comprese negli intervalli tra 7,8 µg/mL e 1 mg/mL per il polline e tra 1 µM e 100 µM per la 5-tioistidina. Per l'aspalatina invece è stata utilizzata una concentrazione pari a 250 µM. Le diluzioni impiegate nei trattamenti sono state preparate nel mezzo di coltura per la crescita delle cellule stesse.

Le cellule sono state irraggiate con una lampada solare commerciale Philips Original Home Solarium (modello/A; Philips, Groningen, Olanda, dotata di bulbo Philips HPA, UV tipo 3, erogante un flusso di 23 mW/cm² tra 300 nm e 400 nm), preriscaldata 5 minuti prima dell'utilizzo al fine di garantire la sua stabilizzazione e un irraggiamento uniforme. La lampada è stata disposta ad una distanza di 20 cm dalla piastra multiwell sistemata su un supporto contenente ghiaccio per evitare il surriscaldamento della piastra stessa. Al momento dell'irraggiamento, il coperchio in plastica della piastra è stato sostituito con una lastra in quarzo poiché non assorbe ai raggi ultravioletti (Fig. 6.2).

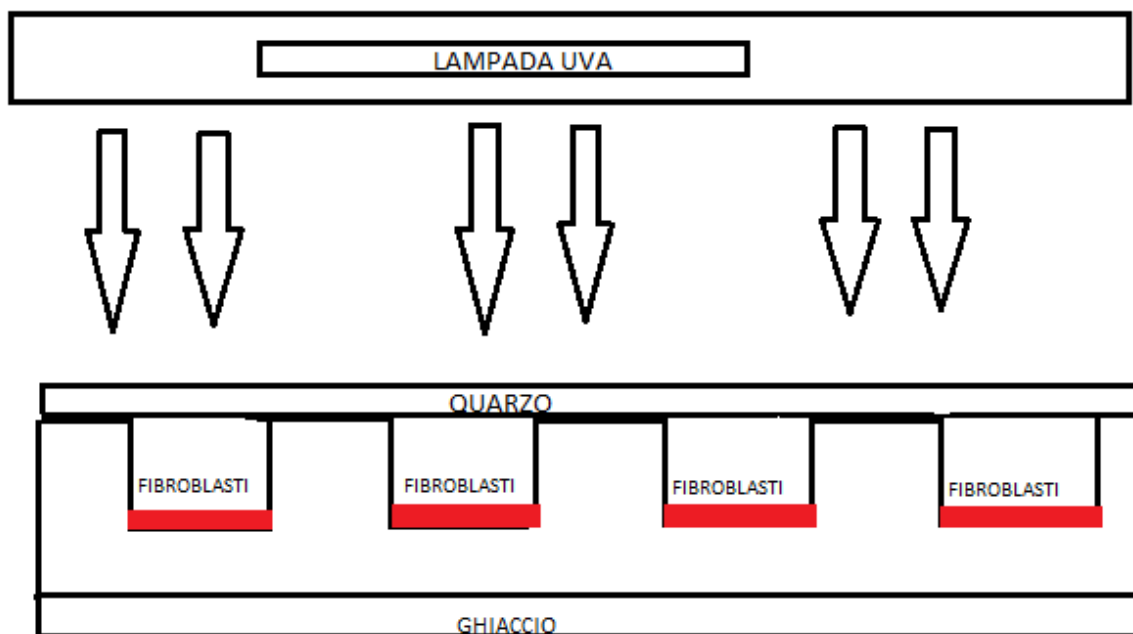


Fig.6.2 Schema di Irraggiamento

In particolare, l'irraggiamento è stato effettuato seguendo i punti elencati di seguito:

- rimozione del mezzo di coltura in ogni pozzetto;
- lavaggio con PBS;
- aggiunta di PBS ad ogni pozzetto;
- rimozione del coperchio in plastica della multi-well;

- disposizione della lastra in quarzo;
- irraggiamento con lampada UVA;
- rimozione del PBS e aggiunta di mezzo completo fresco.

Dopo 24 ore dall'irraggiamento le cellule sono state staccate dai supporti mediante l'utilizzo di tripsina al fine di analizzare la vitalità cellulare, i livelli intracellulari di ROS e il danno ossidativo al DNA con i saggi di seguito riportati.

6.3 Valutazione della Vitalità Cellulare: Saggio del Presto Blue

La vitalità cellulare effettuata dopo 24 ore di trattamento con le sostanze a 37°C è stata eseguita coltivando i fibroblasti nelle multiwell da 96 e tramite il saggio colorimetrico del Presto Blue. Questo reagente contiene la resazurina, un indicatore di pH e di ossidoriduzione all'interno di buffer. Quando viene aggiunto al mezzo di coltura, le cellule metabolicamente attive lo assorbono rapidamente e grazie al loro potere riducente trasformano la resazurina in resorufina (Figura n°?). La resazurina che in ambiente ossidato è di colore blu, in ambiente ridotto, quando quindi la cellula è viva, diventa di colore rosa. Grazie proprio a queste caratteristiche viene utilizzata come indicatore di salute cellulare e appunto per quantificare la vitalità cellulare. La sensibilità del saggio è aumentata tramite lettura in fluorescenza del prodotto ridotto che presenta le seguenti caratteristiche di fluorescenza: eccitazione 530-570 nm emissione 585-590 nm.

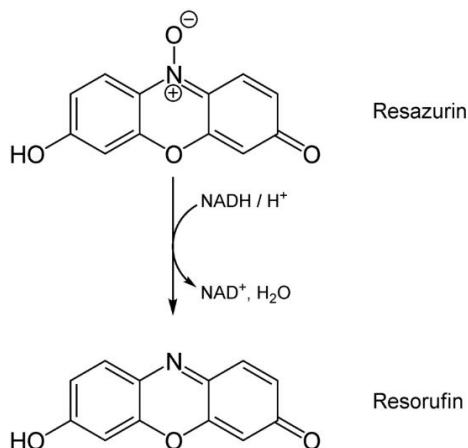


Figura (scrivere numero): reazione di ossidoriduzione alla base del principio di funzionamento del saggio Presto Blue.

In particolare, la valutazione della vitalità cellulare è stata effettuata seguendo i punti elencati di seguito:

- preparazione della soluzione contenente MEM e Presto Blue;
- rimozione del mezzo di cultura e aggiunta della soluzione con Presto Blue;
- incubazione per un'ora al buio a 37°C;
- lettura della fluorescenza con il microplate reader;
- elaborazione dei dati mediante l'uso del software Gen5.

6.4 Valutazione Dei Livelli Intracellulari Di ROS: Saggio della diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA)

La produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) è stata valutata tramite l'utilizzo di una sonda chiamata diclorofluorescina diacetato (Life Technologies), che grazie alla sua natura apolare penetra facilmente la membrana cellulare. Nello spazio intracellulare, la DCFH-DA viene idrolizzata dalle esterasi cellulari che rimuovono i gruppi acetati, ottenendo quindi la DCFH che non è più in grado di attraversare la membrana plasmatica integra ed è non fluorescente nella forma ridotta. La presenza di ROS nella cellula causa l'ossidazione di questa molecola trasformandola in diclorofluorescina (DCF), una molecola fluorescente che emette alla lunghezza d'onda di 532 nm. I livelli di fluorescenza misurati sono dunque direttamente proporzionali alla quantità di ROS presenti all'interno della cellula. L'intensità di fluorescenza di questa sonda è stata misurata mediante l'impiego di un citofluorimetro (Guava, Millipore) ma prima della lettura ogni campione è stato colorato con un'altra sonda nucleare denominata Via Count (Millipore), ossia una combinazione di due fluorocromi in grado di discriminare le cellule vive da quelle apoptotiche e morte, eliminando quindi i falsi negativi dovuti alla fuoriuscita della DCF a causa della compromissione dell'integrità della membrana cellulare che rappresenterebbero dei falsi negativi. I saggi sono stati effettuati sulle cellule risospese in PBS, dopo aver effettuato i trattamenti su piastre multiwell da 24 pozzetti.

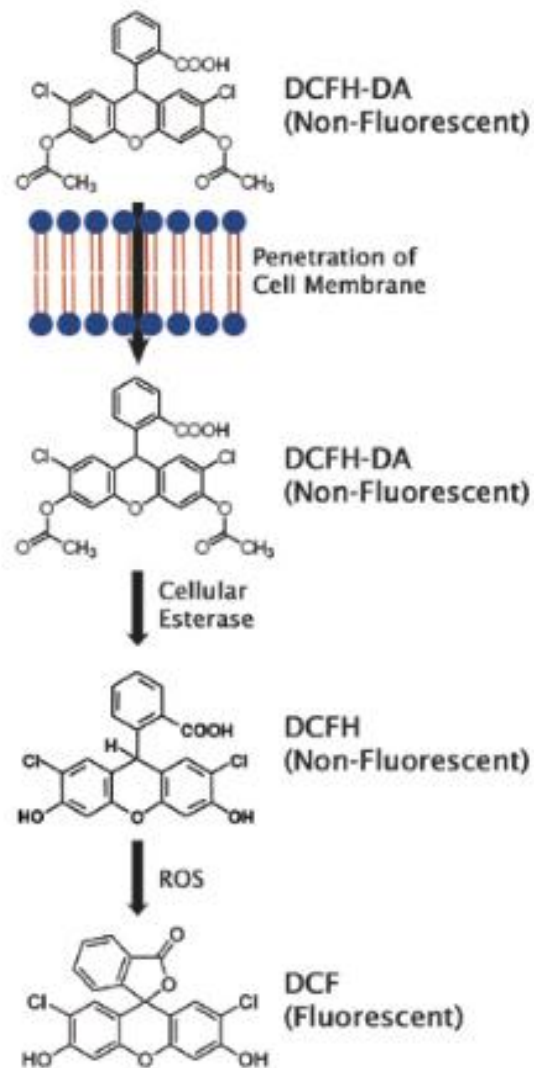


Fig. Processo attraverso il quale la DCFH-DA diventa fluorescente in presenza di ROS.

In particolare, il saggio della DCFH-DA è stato effettuato seguendo i punti elencati di seguito:

- rimozione del mezzo di cultura;
- lavaggio con PBS e rimozione;
- preparazione in PBS della soluzione di DCF 1 μ M (partendo da aliquote da 20 μ L a 1 mM)
- aggiunta della soluzione ad ogni pozzetto;
- incubazione a 37°C al buio per 30 minuti;
- rimozione della soluzione di DCF;

- lavaggio con PBS e rimozione;
- aggiunta della tripsina;
- incubazione a 37°C per 5 minuti;
- neutralizzazione con MEM;
- recupero delle cellule e trasferimento in eppendorf mantenute in ghiaccio;
- centrifugazione per 5 minuti a 500 g a 4°C;
- rimozione del surnatante e risospensione del pellet in PBS mantenendo i campioni al buio e in ghiaccio;
- preparazione della soluzione di ViaCount diluito 1:5 con PBS;
- aggiunta del ViaCount alla sospensione cellulare in PBS; ;
- incubazione per 5 minuti in ghiaccio al buio;
- lettura al citofluorimetro a 495/529 nm (eccitazione/emissione).

Attraverso l'analisi citofluorimetrica, ogni campione è stato analizzato a livello di singola cellula con la possibilità di caratterizzare la popolazione cellulare in funzione di parametri fisici associati alla riflessione e rifrazione della luce emessa da una sorgente laser a 488 nm. Nello specifico, i parametri che ne derivano sono il forward scatter (FSC) che discrimina le cellule in base alla grandezza e il side scatter (SSC) che discrimina le cellule in base alla complessità della loro membrana citoplasmatica e la organizzazione citoplasmatica in termini di vacuoli e organelli che nel loro complesso sono in grado di rifrangere la luce. L'analisi di questi due indici e della fluorescenza legata alle sole cellule vitali, individuata mediante il simultaneo utilizzo del ViaCount, ha permesso di discriminare la popolazione cellulare di interesse utile per la valutazione dei livelli intracellulari di ROS.

6.5 Valutazione del Danno al DNA: Comet Assay

Il comet assay, detto anche single cell gel electrophoresis (SCGE), è una tecnica impiegata per misurare nelle cellule eucariotiche le lesioni a singolo filamento dell'acido desossiribonucleico (DNA). Questo tipo di saggio è diventato molto popolare grazie alla sua capacità di individuare danni al genoma con un alto grado di sensibilità e semplicità. È possibile lavorare con un numero di cellule relativamente basso senza ricorrere a una stimolazione mitotica preliminare e consente di testare differenti tipi di cellule. Le varianti del comet sono molteplici ma quella utilizzata nel presente studio è stata quella della variante alcalina chiamata così perché il trattamento prevede l'utilizzo di soluzioni tampone con valori di pH elevati (> 13). La procedura inizia comunemente con la preparazione di vetrini per la microscopia in cui le cellule vengono immobilizzate su un gel di agarosio a bassa temperatura di fusione (LMA). Il passo successivo prevede la lisi delle cellule con detergenti non ionici ma ad alta molarità. Questo trattamento rimuove le membrane, il citoplasma e il nucleoplasma distruggendo i nucleosomi. Quello che rimane è il nucleoide, costituito dalla matrice nucleare o dallo scaffold di acido ribonucleico insieme con il DNA. I vetrini con le cellule lisate vengono successivamente sottoposte alla corsa elettroforetica, ossia vengono sottoposti a un campo elettrico grazie al quale il DNA, carico negativamente, migra verso il polo positivo della camera elettroforetica. Il DNA integro migra in maniera compatta mentre il DNA danneggiato migra più velocemente costituendo una scia che si diparte dal nucleoide simile ad una cometa dal quale il test prende il nome. Al termine della corsa elettroforetica i vetrini subiscono un breve passaggio in successione in, acqua, tampone di neutralizzazione a pH 7, e metanolo, e vengono infine posti ad essiccare in forno a 50°C per circa un'ora. Questo processo consente di ridurre lo spessore del gel e porta tutte le comete approssimativamente su un singolo piano focale per l'analisi in microscopia.

Appena prima della lettura al microscopio, il gel essiccato di ogni campione viene colorato mediante l'utilizzo di una sonda fluorescente nucleare (Sybr Gold) che si intercala al DNA e consente la visualizzazione della cometa con una interferenza del background molto bassa rispetto ad altri coloranti del DNA. Quando il DNA risulta essere molto danneggiato, assume la forma di una vera e propria cometa nella quale il DNA

integro, di forma sferica, rappresenta la testa della cometa mentre il DNA non integro forma una scia che rappresenta appunto la coda della cometa e da cui prende il nome lo stesso saggio. Mediante l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza automatizzato (Lion Heart, Biotech) (fig.), la successiva cattura e elaborazione delle immagini [sviluppata utilizzando un software dedicato sviluppato su piattaforma Labview (National Instruments)] e consente di valutare il danno a DNA considerando essenzialmente tre parametri che lo descrivono:

- Tail length: lunghezza della coda della cometa;
- Tail intensity: percentuale di fluorescenza della coda in rapporto alla fluorescenza totale della cometa;
- Tail moment: parametro di sintesi che integra i primi due (fig.).

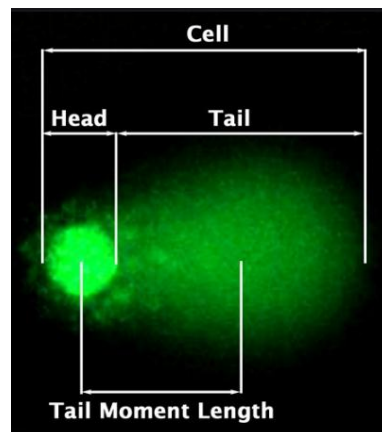


Fig. Riassunto dei parametri analizzati del comet assay.

Oltre alla versione alcalina del comet assay, è stata utilizzata anche la variante che prevede l'utilizzo di un'enzima, la Formamido Pirimidina Glicosidasi (FPG). Questo enzima, di origine batterica, per mezzo della sua attività glicosidasi, rimuove le purine danneggiate (ossidate) dalla doppia elica del DNA generando un

sito apurinico (AP) e, con l'attività di AP-liasi, rimuove il sito AP generando un gap. L'FPG è in grado di riconoscere il danno a carico della base purinica più rappresentativa (7,8-diidro-8-ossiguanina) che viene convertita nella rottura del filamento, aumentando così la sensibilità permettendo la determinazione non solo della rottura dei singoli e dei doppi filamenti. In questo modo il danno viene ulteriormente esaltato.

In particolare, la procedura del comet assay adottata è stata la seguente:

1. Per la preparazione della sospensione cellulare:

- dopo i trattamenti, distacco delle cellule dalla piastra mediante tripsina;
- conta cellulare e centrifugazione a ???;
- eliminazione del surnatante e risospensione in PBS;
- preparazione della soluzione di scongelamento con rapporto 1:1 rispetto alla sospensione cellulare;
- congelamento a -80°C con una soluzione cripreservante.

2. Preparazione dei vetrini:

- aggiunta del Normal Melting Agarose 1% (NMA) su vetrini High Throughput (Trevigen)
- essiccazione in stufa a 50°C

3. Scongelamento dei campioni e allestimento dei vetrini:

- aggiunta per ogni campione della soluzione di scongelamento in rapporto 1:1 con il volume totale contenuto in ogni eppendorf;
- prelievo di un'aliquota che contenga almeno 1500/2000 cellule per campione (per una corretta acquisizione delle immagini) e lavaggio con PBS;
- centrifugazione a 2000 rpm per 5 minuti a 4°C;
- rimozione del surnatante e aggiunta del Low Melting Agarose (LMA) allo 0.7%;stratificazione di 35 µL di LMA su ogni pozzetto del vetrino;
- solidificazione per 15 minuti in ghiaccio al buio;
- immersione dei vetrini nella soluzione di lisi a 4°C per 1 ora;
- due lavaggi da 15 minuti in Endo Buffer (EB) a 4°C;

- per ogni spot, in ghiaccio, aggiunta di 50 μ L FPG ricostituito in una soluzione di EB/HSA (Endo Buffer/Human Serum Albumin) ;
- incubazione in camera umida a 37°C per 45 minuti;
- incubazione a 4°C per 15 minuti;
- lavaggio in EB senza BSA;

I punti dove vengono menzionati l'Endo Buffer e la Human Serum Albumin sono specifici per l'uso della FPG, nel caso in cui l'enzima non venga utilizzato dopo lo step di lisi si passa immediatamente all'unwinding.

4. Unwinding e corsa elettroforetica:

- in camera fredda, disporre i vetrini in camera elettroforetica coprendoli con il tampone elettroforetico per 30 minuti;
- corsa elettroforetica per 20 minuti a 18 Volt;
- lavaggio in acqua a 4°C;
- neutralizzazione con soluzione tampone;
- lavaggio in metanolo per disidratare;
- essiccazione dei vetrini in stufa a 50°C per 1 ora.

5. Acquisizione ed elaborazione delle immagini

- Aggiunta di Sybr Gold ad ogni spot (15 μ L);
- Acquisizione delle immagini al Lion Heart (Biotech) tramite l'utilizzo del software Gen5 ed elaborazione delle immagini tramite il software del comet assay (Comet Assay).

Appendice

Soluzioni

Soluzione Presto Blue

Presto Blue ottenuto presso la ditta Invitrogen con una concentrazione 10x. Si prepara dunque una soluzione con Presto Blue e mezzo di cultura in base ai pozzetti da analizzare. Il presto blue diluito viene incubato con i campioni per x min a x temperatura e successivamente le piastre da 96 pozzetti vengono lette a...nm (non mi ricordo se in assorbanza o fluorescenza). I campioni non trattati di controlli vengono considerati 100% e conseguentemente viene calcolata la percentuale di cellule vive.

Soluzione DCFH-DA

Soluzione stock da 20 μ L a concentrazione 10 mM conservata al buio a -20°C. Per l'analisi al citofluorimetro la soluzione viene portata a una concentrazione di 10 μ M in PBS.

Soluzioni per il Comet Assay:

Soluzione di congelamento:

6 mL di PPS (albumina al 5%)

2 mL DMSO

2 mL Albumina al 20%

Soluzione di scongelamento:

5 mL di Destrano

3.75 mL di PBS

1.25 mL di Albumina al 20%

Soluzione LMA 0.7%:

Sciogliere 700 mg di LMA in 100 mL di acqua. Riscaldare la soluzione fino a dissoluzione della polvere e aliquotare. Conservare a 4°C.

Soluzione NMA 1%:

Sciogliere 1 g di NMA in 100 mL di acqua. Riscaldare la soluzione e aliquotare. Conservare a 4°C.

Tampone di neutralizzazione:

48.46 g/L di TRIS-HCl disciolti in acqua e portato a pH 7.5 con NaOH

Tampone elettroforetico:

Solubilizzare 10 mL di Na₂EDTA 0.2 M in 2 L di acqua e portare a pH 13 con NaOH 60%

Soluzione salina:

146.1 g di NaCl

1.21 g di TRIS-HCl

37.23 g di Na₂EDTA

Aggiungere i soluti nell'ordine elencato e portare a pH 10 con NaOH 60%

Soluzione di lisi:

50 mL di DMSO

5 mL di Triton X

e portare a volume fino a 500 mL con la soluzione salina

EB (Endo Buffer):

7.455 g di KCl

9.532 g di HEPES

0.186 g di EDTA

Portare a pH 8 con KOH 1 M

EB con BSA:

BSA 0.2 g/L oppure 1 mL di HSA 20%

Statistica

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante i test statistici Student t-test e One Way Anova, utilizzando il Tukey test come fattore di correzione nel caso delle comparazioni multiple. I dati sulla vitalità cellulare e sui livelli intracellulari di ROS sono rappresentati come istogrammi che illustrano la media più o meno l'errore standard (SEM) della percentuale di cellule a basso, medio ed elevato contenuto di ROS, mentre i dati del danno ossidativo al DNA sono illustrati come box plot che riassumono la distribuzione dei principali indici di danno al DNA calcolati dal comet assay. Nello specifico, la distribuzione della popolazione in relazione al danno è caratterizzata dai valori massimo e minimo, il 25° e il 75° percentile e il valore della mediana di ciascun indice. Le significatività delle variazioni tra i campioni sono state riportate come segue: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

7. Risultati

7.1 Vitalità Cellulare, Livelli Intracellulari Di ROS e Danno Ossidativo al DNA In HDF

Nel presente lavoro di tesi è stato valutato l'effetto della radiazione UVA, *in vitro* su cellule di derma umano neonatali (HDF, *Human dermal fibroblast*). Nello specifico sono stati valutati in esperimenti di dose risposta come diversi tempi di irraggiamento influenzavano la vitalità, la propensione all'apoptosi ed il contenuto intracellulare di ROS. Questi dati sono stati poi impiegati per identificare le dosi ottimali per valutare il danno al DNA indotto dalla radiazione UV, in termini di rotture al doppio filamento e come due composti innovativi fossero in grado di contrastarlo: un estratto idroalcolico di il polline (standardizzato in contenuto di polifenoli, ed espresso nei risultati come mg/mL di equivalenti di acido gallico) e la 5-tioistidina, un composto tiolico isolato e purificato dalle uova del riccio di mare.

A tal proposito, preliminarmente all'analisi dell'efficacia dei due composti, è stato messo a punto il modello di insulto ossidativo, valutando la vitalità cellulare, i livelli intracellulari delle specie reattive dell'ossigeno e il danno ossidativo al DNA indotti dalla sola esposizione ai raggi UVA delle HDF.

L'analisi citofluorimetrica della vitalità cellulare è stata effettuata tramite l'impiego di un'apposita miscela di due fluorocromi (ViaCount), in grado di discriminare le cellule vive da quelle apoptotiche e morte, con l'obiettivo di identificare il tempo ottimale di irraggiamento, in corrispondenza del quale si verifica una significativa diminuzione della vitalità cellulare rispetto al controllo non irraggiato. L'analisi è stata eseguita utilizzando un modello *in vitro* di cellule neonatali di derma umano, 24 ore dopo l'esposizione delle stesse ad una scala temporale di irraggiamento con raggi UVA per 5-15 minuti corrispondenti a 27.3 J/cm² e 9,1 J/cm² impiegando una lampada UVA (Philips Original Home Solarium). Come mostra la **figura 7.1**, a partire da 10 minuti di irraggiamento è possibile osservare una diminuzione significativa (-19.8 %; *p<0.05) della percentuale di cellule vitali (barre verdi) e un aumento altrettanto significativo di quella delle cellule apoptotiche (barre gialle), (+525%; *p<0.05), che aumenta in maniera dose dipendente fino a 15 minuti di

irraggiamento accompagnato da una diminuzione del -30.2% (* $p < 0.05$) di quelle vitali rispetto al campione non irraggiato (0 minuti).

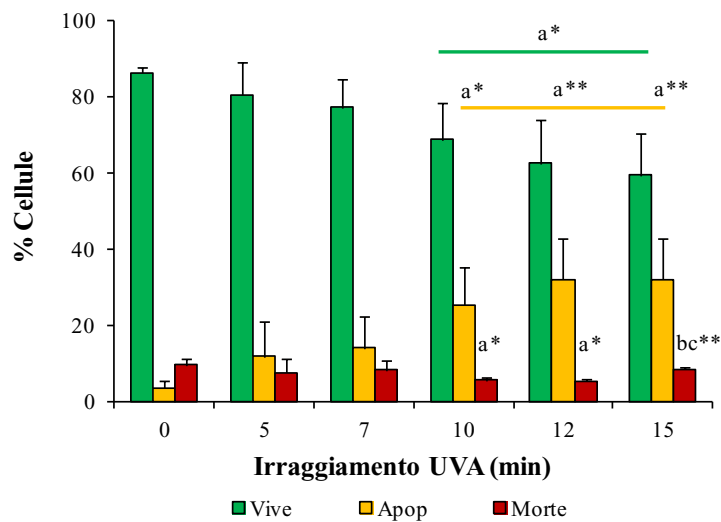


Figura 7.1 Vitalità cellulare espressa come percentuale (%) di cellule vive, apoptotiche e morte, analizzata in seguito a irraggiamento con lampada UVA per 5, 7, 10, 12 e 15 minuti. I dati sono espressi come media \pm SEM. a=0 minuti; b=10 minuti; c=12 minuti; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Contemporaneamente all'analisi della vitalità cellulare e con le stesse condizioni sperimentali, sono stati analizzati al citofluorimetro anche i livelli intracellulari delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), utilizzando la sonda *leuco* (DCF DH_2), una forma ridotta di fluoresceina la cui intensità di fluorescenza risulta direttamente proporzionale alla quantità di radicali liberi presenti all'interno delle cellule vitali, a loro volta discriminate tramite il simultaneo impiego di ViaCount. Per mettere meglio in evidenza la produzione dei ROS in seguito all'insulto ossidativo, rappresentato dall'irraggiamento a diversi tempi con raggi UVA, la popolazione cellulare è stata suddivisa in cellule con un basso (barre verdi), medio (barre gialle) e alto (barre rosse) contenuto di ROS. Le regioni sono state stabilite arbitrariamente, definendo su una popolazione non irraggiata (controllo negativo), la regione con alto contenuto ROS pari al 10% e quella con basso contenuto di ROS pari al 50% della popolazione totale. La **figura 7.2** mostra come, al contrario della vitalità cellulare, l'aumento della percentuale di cellule con un alto contenuto di ROS è risultato significativo già a partire da 5 minuti di irraggiamento (+61.5%; ** $p < 0.05$), diventando altamente significativo (+115.4%; *** $p < 0.001$) a partire da 10 minuti di irraggiamento, raggiungendo un massimo di +223.1% a 15 minuti, rispetto al campione di controllo non irraggiato (0 minuti).

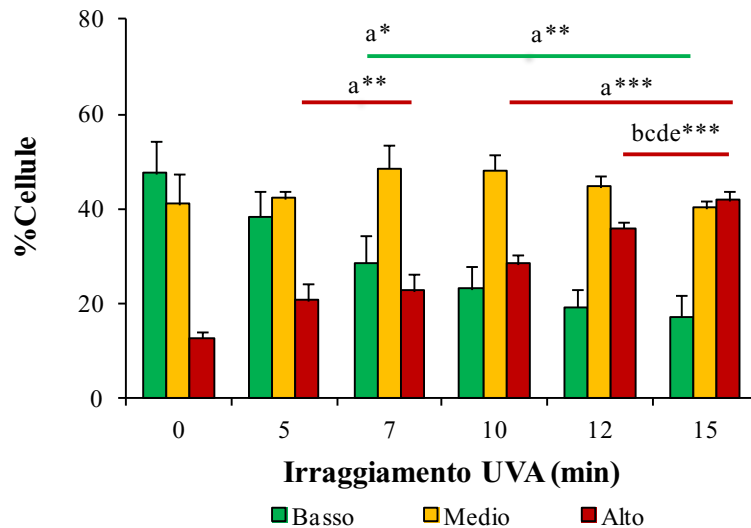


Figura 7.2 Livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS), espressi come percentuale (%) di cellule con un basso, medio e alto contenuto di ROS, analizzati in seguito a irraggiamento con lampada UVA per 5, 7, 10, 12 e 15 minuti. I dati sono espressi come media \pm SEM. a=0 minuti; b=5 minuti; c=7 minuti; d=10 minuti; e=12 minuti; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

E' stato altresì valutato, nelle medesime condizioni sperimentali, anche il danno ossidativo del DNA indotto dall'irraggiamento, mediante la metodica del Comet assay, al fine di individuare la dose (minuti di irraggiamento) di raggi UVA, necessaria per generare un aumento significativo del danno ossidativo a carico del DNA. La **figura 7.3** mostra come in questo caso l'aumento del danno, espresso come percentuale di DNA contenuto nella coda della cometa (*tail intensity*), sia altamente significativo (** $p < 0.001$) a partire da 18 minuti di esposizione ai raggi UVA, con un aumento del danno del 93.2% rispetto al campione di controllo non irraggiato. Questi dati si riferiscono al Comet assay alcalino condotto a pH 13, che è in grado di risolvere le rotture sul singolo, doppio filamento e sui siti alcali labili ma non sulle basi ossidate.

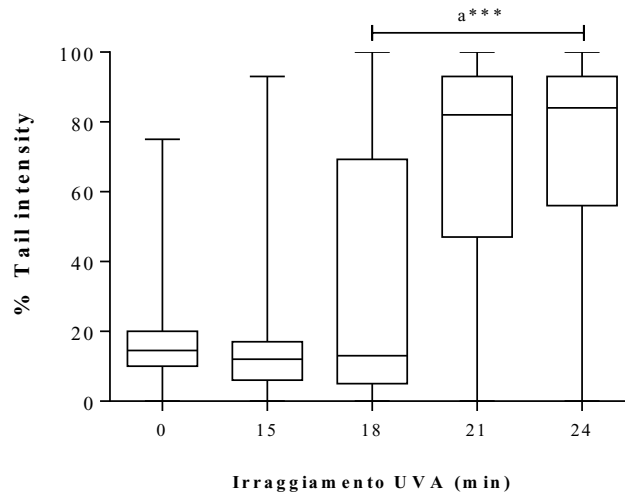


Figura 7.3 Livelli di danno ossidativo, espressi come percentuale (%) di tail intensity, analizzati in seguito a irraggiamento con lampada UVA per 15, 18, 21 e 24 minuti. I dati sono espressi come distribuzione della popolazione sottoforma di Box Plot che individua i valori minimo, massimo, il 25%, il 75% percentile e la mediana. a=0 minuti; *** $p < 0.001$.

Vista la diversa dose risposta tra l'aumento significativo dei livelli intracellulari di ROS e il danno ossidativo al DNA, risultati significativi rispettivamente a 15 e 18 minuti, il danno al DNA dovuto alla semplice esposizione ai raggi UVA, è stato valutato anche mediante l'adozione di una versione modificata del comet assay, che prevede l'impiego di specifici enzimi in grado di rilevare il danno ossidativo al DNA. A tal proposito, è stato utilizzato l'enzima FPG in grado di riconoscere il danno a carico della base purinica ossidata quantitativamente più rappresentativa (7,8-diidro-8-ossiguanina) che viene convertita nella rottura del filamento, aumentando quindi la sensibilità del classico saggio che in condizioni neutre permette di evidenziare solo rotture a singolo (Single Strand Break), a doppio filamento (Double Strand Break) e i siti alcali labili. La **figura 7.4** mostra infatti come ad una stessa dose di irraggiamento (15 minuti di UVA) la presenza nel saggio dell'enzima (UVA 15 min + FPG) sia in grado mettere in evidenza un danno ossidativo del DNA significativo che diversamente non viene invece osservato (UVA 15 min -FPG).

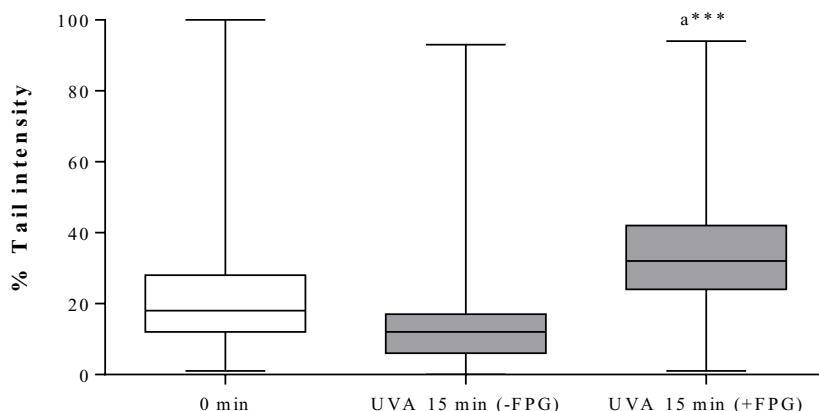


Figura 7.4 Livelli di danno ossidativo, espressi come percentuale (%) di tail intensity, analizzati in seguito a irraggiamento con lampada UVA per 15 minuti e con e senza l'enzima FPG nella procedura del comet assay. I dati sono espressi come distribuzione della popolazione sottoforma di Box Plot che individua i valori minimo, massimo, il 25%, il 75% percentile e la mediana. a=0 minuti; ***p<0.001.

7.2 Vitalità Cellulare in HDF dopo 24 Ore di Trattamento con la 5-Tioistidina o il Polline

Successivamente alla verifica del danno ossidativo indotto dalla sola esposizione ai raggi UVA delle cellule HDF, è stata valutata la vitalità cellulare delle stesse trattate per 24 ore con una scala di concentrazione dei due composti, da 7.8 a 1000 mg/mL per il polline (descritto in termini di contenuto di polifenoli totali espressi come milligrammi di acido gallico equivalente su millilitro di estratto etanologico) e da 1 a 100 μ M per la 5-Tioistidina. L'analisi della vitalità cellulare, effettuata tramite l'utilizzo di un saggio colorimetrico (PrestoBlue) ha messo in evidenza l'assenza di citotossicità sia del polline (**Figura 7.5**) che della 5-Tioistidina (**Figura 7.6**) in quanto, alle concentrazioni testate e in entrambi i casi, la vitalità resta al di sopra dell'80%.

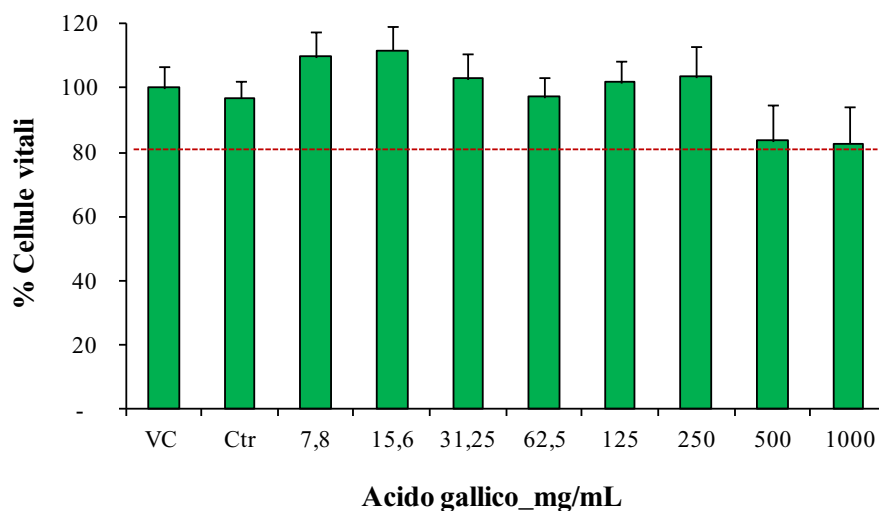


Figura 7.5 Vitalità cellulare espressa come percentuale (%) di cellule vitali, analizzata dopo 24 ore di trattamento a 37°C dei fibroblasti di derma umano con una scala di concentrazione del polline espresso in termini di equivalenti di acido gallico (7.8-15.6-31.25-62.5-125-250-500-1000 mg/mL). I dati sono espressi come media \pm SEM. VC= veicolante.

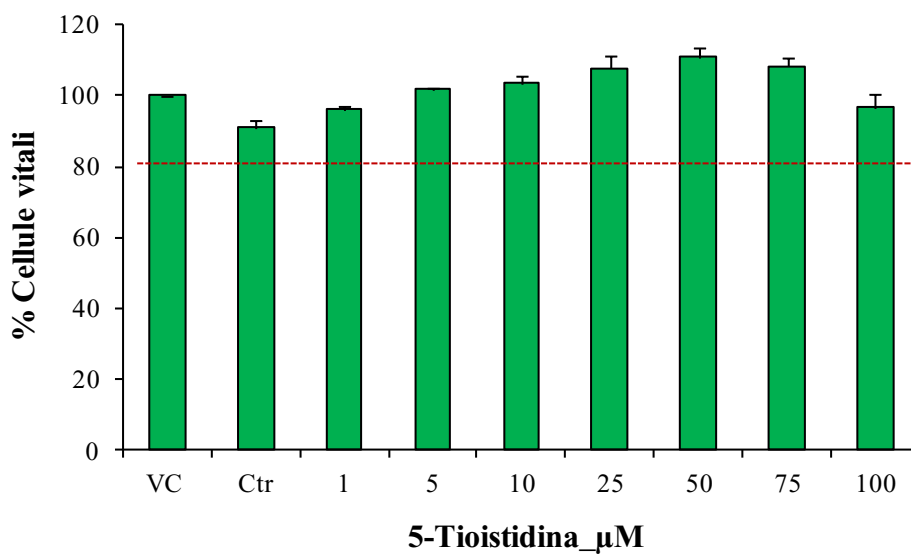


Figura 7.6 Vitalità cellulare espressa come percentuale (%) di cellule vitali, analizzata dopo 24 ore di trattamento a 37°C dei fibroblasti di derma umano, con una scala di concentrazione della 5-Thioistidina (1-5-10-25-50-100 μM). I dati sono espressi come media \pm SEM. VC = veicolante.

Dal profilo spettrale UV della 5-tioistidina (**figura 7.7**) prima e dopo irraggiamento a tempi crescenti di UVA, si osserva un aumento di assorbanza tra 290 nm e 370 nm, che comprende proprio il range degli UVB e UVA importanti dal punto di visto di protezione solare. Questo aumento di assorbanza è molto probabilmente dovuto a un cambiamento conformazionale della struttura della molecola indotto dall'esposizione ai raggi UVA, dove il prodotto risultante ha un assorbimento più alto della molecola di partenza. Sono ancora in corso studi per identificare la natura della molecola risultante dopo irraggiamento ma si ipotizza che la molecola sia un prodotto di dimerizzazione della 5-tioistidina a livello del suo gruppo sulfidrilico.

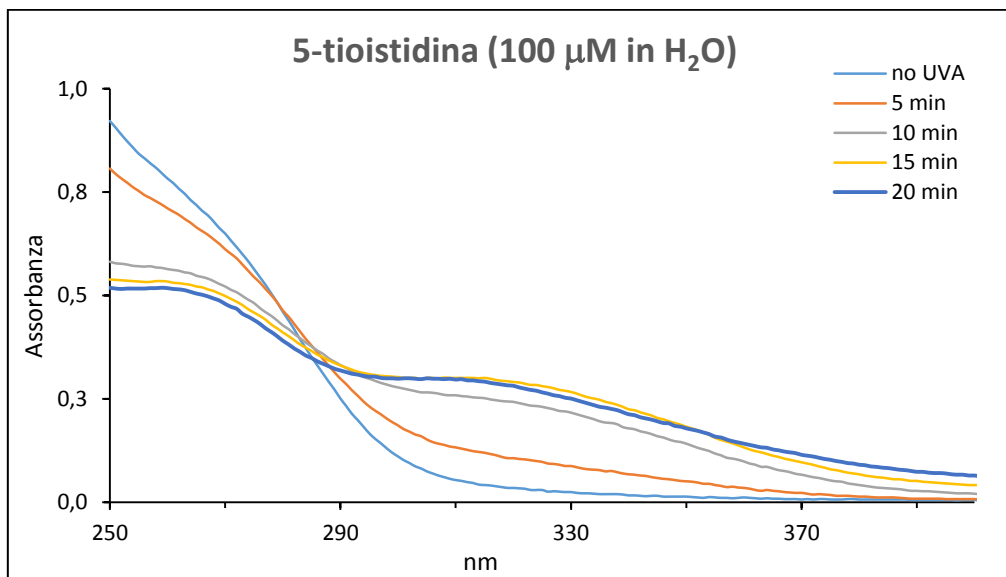


Fig. 7.7 Spettri di assorbanza di 5-tioistidina prima e dopo irraggiamento UVA

PREMESSA

In seguito alla verifica dell'assenza di citotossicità dei due composti, è stata valutata l'efficacia degli stessi nel proteggere e quindi prevenire, nelle cellule di derma umano esposte ai raggi UVA, l'aumento dei ROS intracellulari indotto da quest'ultimi. A tal proposito, i risultati illustrati di seguito sono un esempio delle possibili "strategie di protezione" relative a composti naturali con attività antiossidante, che abbiamo scelto di testare nell'ambito di questo progetto di tesi con l'obiettivo di mettere in evidenza le eventuali proprietà di prevenzione o di riduzione del danno ossidativo indotto dai raggi UVA. Per meglio valutare tali aspetti, al termine dello studio, entrambi i composti sono stati messi a confronto con un terzo, l'aspalatina, ossia il polifenolo maggiormente presente nelle foglie di *Aspalatus linearis* (noto anche come Rooibos), una leguminosa caratteristica del Sud Africa, dove viene tradizionalmente utilizzata nella preparazione di infusi consumati come i thè, ma che allo stesso tempo ha acquisito nell'ultimo decennio una popolarità in Europa e nel Mondo per le sue proprietà salutistiche. Di fatto, le proprietà antiossidanti sono ampiamente descritte in letteratura, in studi in vitro e in vivo, minori sono le informazioni circa l'impiego topico e l'utilizzo in contesti come il fotoinvecchiamento. Quest'ultimo, nel presente lavoro di tesi, è stato valutato intermini di analisi dei livelli intracellulari di ROS e del danno ossidativo al DNA, valutati entrambi dopo 24 ore dopo l'esposizione ai raggi UV, con l'intento di misurare lo steady state dei radicali ed il danno al DNA nella fase post acuta e quindi più rappresentativa delle alterazioni a medio-lungo termine dell'insulto UV.

Le strategie adottate e descritte di seguito sono:

1. Pre-incubazione con le sostanze per 24 ore e 15 minuti di irraggiamento
2. Post-incubazione con le sostanze per 24 ore e 15 minuti di irraggiamento
3. Pre-incubazione con le sostanze per 24 ore e 7 minuti di irraggiamento
4. Utilizzo della 5-tioistidina come filtro schermante mediante attivazione con i raggi UVA
5. Post-incubazione con le due sostanze e l'aspalatina per 24 ore e 15 minuti di irraggiamento

Strategia di protezione n°1: Pre-incubazione con le sostanze per 24 ore e 15 minuti di irraggiamento

Nella prima strategia adottata per valutare le proprietà antiossidanti di queste sostanze naturali in termini di livelli intracellulari di ROS, i fibroblasti sono stati trattati prima per 24 ore con 5-Tioistidina (1-10-50-100 µM) e una soluzione idroalcolica di polline (descritto nei risultati come contenuto in equivalenti di acido gallico), (0.5-1 mg/mL) e successivamente irraggiati e non per 15 minuti con i raggi UVA.

I risultati descritti nella **figura 7.8** mostrano come la sola presenza dei composti, alle concentrazioni descritte non sia in grado di indurre un aumento significativo della percentuale di cellule con un alto contenuto di ROS (barre rosse), mentre al contrario l'irraggiamento per 15 minuti determina un aumento dei ROS, significativo in tutte le condizioni testate (+17,4% in media, **p<0.01) rispetto al controllo non irraggiato (Ctr). Dagli stessi dati emerge anche come 100 µM di 5-Tioistidina sembra in grado di prevenire l'aumento della popolazione cellulare con un alto contenuto di ROS, in maniera significativa rispetto al campione di controllo positivo (Ctr UVA 15 minuti). Al contrario, il trattamento con il polline non sembra in grado di ostacolare l'aumento delle specie reattive dell'ossigeno. Anche variando le concentrazioni, in particolare della 5-Tioistidina (**Figura 7.9**) non è stata messa in evidenza la capacità di queste sostanze di prevenire l'aumento della popolazione cellulare con un alto contenuto di ROS, pretrattando le cellule per 24 ore prima dell'esposizione ai raggi UVA.

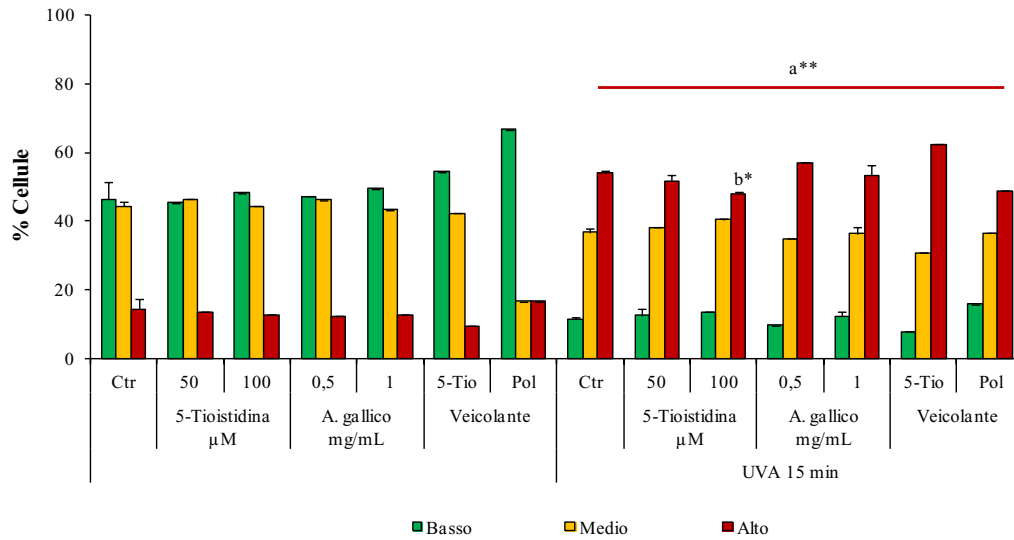


Figura 7.8 Livelli intracellulari di ROS espressi come percentuale (%) di cellule con un basso, medio o alto contenuto di ROS. I dati sono espressi come media \pm SEM. a=Ctr; b=Ctr UV 15 minuti; * p <0.05; ** p <0.01.

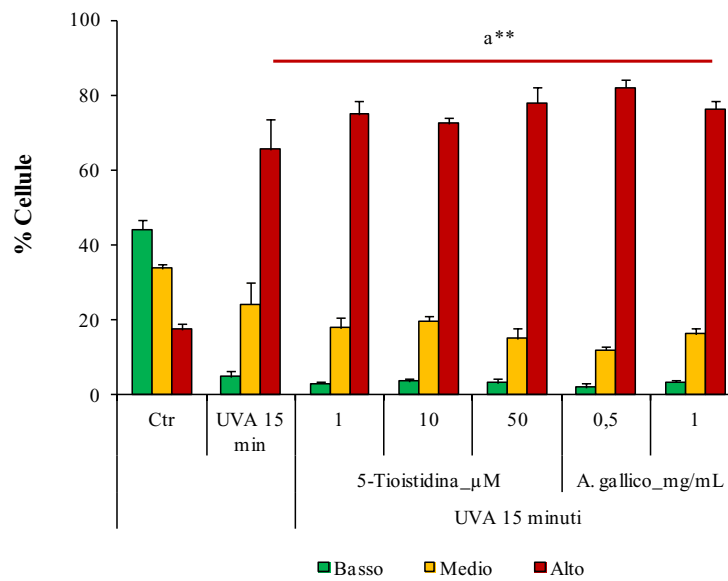


Figura 7.9 Livelli intracellulari di ROS espressi come percentuale (%) di cellule con un basso, medio o alto contenuto di ROS. I dati sono espressi come media \pm SEM. a=Ctr; ** p <0.01.

Strategia di protezione n°2: Post-incubazione con le sostanze per 24 ore e 15 minuti di irraggiamento

Nella seconda strategia adottata per valutare le proprietà antiossidanti di queste sostanze naturali in termini di livelli intracellulari di ROS, i fibroblasti sono stati prima irraggiati con i raggi UVA per 15 minuti e successivamente trattati per 24 ore con 5-Tioistidina (1-10-50 μ M) e una soluzione idroalcolica di polline (descritto nei risultati come contenuto in equivalenti di acido gallico) (0.5-1 mg/mL).

La **figura 9** mostra come anche in questo caso, è stato registrato un aumento altamente significativo della percentuale di cellule con un alto contenuto di ROS (barra rossa) (+282,4%, ** $p < 0,01$) del campione irraggiato (UVA 15 min), ma nessuno dei due composti, anche se aggiunto successivamente all'induzione dello stress, sembra essere stato in grado di contrastare il danno ossidativo indotto dagli UVA, nonostante il trend in diminuzione passando da 1 a 10 μ M di 5-Tioistidina e da 0.5 a 1 mg/mL di polline, descritto nel grafico come equivalenti di acido gallico.

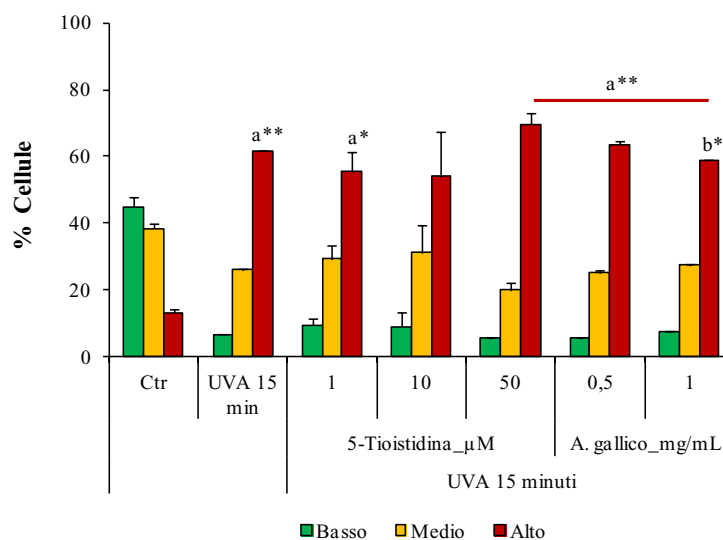


Figura 7.10 Livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno espressi come percentuale (%) di cellule con un basso, medio o alto contenuto di ROS. I dati sono espressi come media \pm SEM. a=Ctr; b=UVA 15 minuti; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Strategia di protezione n°3: Pre-incubazione con le sostanze per 24 ore e 7 minuti di irraggiamento

Valutando l'esito delle prove precedenti e tenendo presente sia il notevole incremento della percentuale di cellule con un alto contenuto di ROS, registrato dopo 15 minuti di esposizione dei fibroblasti ai raggi UVA, sia che l'aumento risulta essere significativo ($*p < 0.05$) già a partire da 7 minuti (**Figura 7.2**), i livelli intracellulari di ROS sono stati valutati pre-trattando per 24 ore le cellule ma irraggiando per 7 minuti e non 15. La **figura 7.11** mostra infatti come ad una riduzione dei tempi di irraggiamento corrisponda un aumento minore della percentuale di cellule con un alto contenuto di ROS, seppur sempre significativo ($*p < 0.05$). Inoltre, mentre il polline, descritto nel grafico come equivalenti di acido gallico, anche in questo caso non sembra in grado di contrastare l'aumento dei ROS, al contrario 10 μ M di 5-Tioistidina sembrano capaci di prevenire l'aumento della percentuale di cellule con un alto contenuto di ROS, anche in maniera altamente significativa ($**p < 0.01$) rispetto al controllo positivo (UVA 7 minuti).

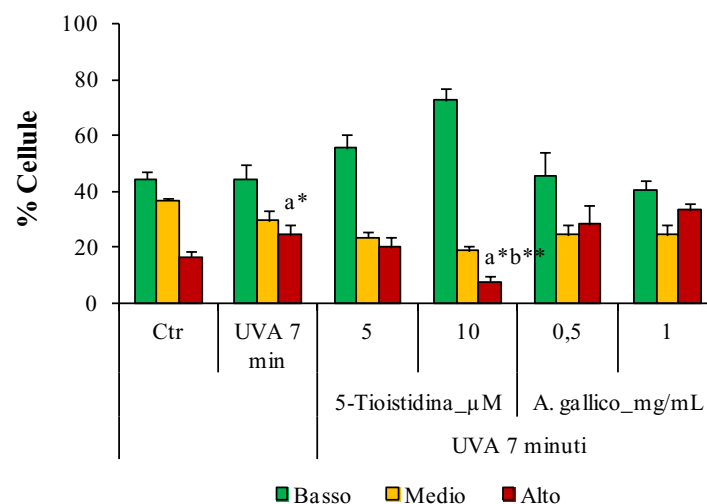


Figura 7.11 Livelli intracellulari di ROS espressi come percentuale (%) di cellule con un basso, medio o alto contenuto di ROS. I dati sono espressi come media \pm SEM. a=Ctr; b=UVA 7 minuti; $*p < 0.05$; $**p < 0.01$.

Strategia di protezione n°4: Utilizzo della 5-Tioistidina come filtro schermante attivato mediante i raggi UVA

Considerando le proprietà spettrofotometriche della 5-Tioistidina, è stata effettuata una prova irraggiando prima per 15 minuti il composto all'interno di petri di quarzo in maniera tale da attivarlo e poi irraggiando i fibroblasti per 15 minuti, ponendo la medesima petri al di sopra del pozzetto contenente le cellule al 90% di confluenza. Questa strategia è stata perseguita per determinare se la 5-tioistidina avesse un effetto schermante, come lo sono i filtri solari, proteggendo in tal modo i fibroblasti sottostanti dal danno ossidativo indotto dai raggi UVA. La **figura 7.12** illustra come il composto preventivamente attivato tramite i raggi UVA, sia in grado di prevenire l'aumento dei ROS in maniera quasi significativa ($p=0.075$) rispetto al controllo positivo irraggiato per 15 minuti ma in assenza di 5-Tioistidina (UVA 15 minuti).

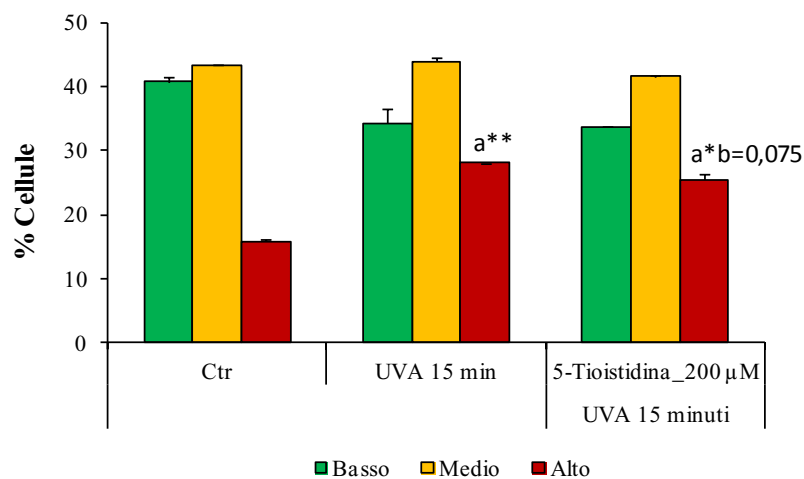


Figura 7.12. Livelli intracellulari di ROS espressi come percentuale (%) di cellule con un basso, medio o alto contenuto di ROS. I dati sono espressi come media \pm SEM. a=Ctr; b=UVA 15 minuti; * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

Strategia di protezione n°5: Post-incubazione con le due sostanze e l'aspalatina per 24 ore e 15 minuti di irraggiamento

Per meglio valutare le proprietà antiossidanti della 5-Tioistidina e del polline, al termine dello studio, entrambi i composti sono stati messi a confronto con un terzo, l'aspatatina, sia per quanto riguarda l'analisi dei livelli intracellulari di ROS che del danno ossidativo al DNA, valutato tramite il saggio del comet assay in presenza dell'enzima formamido-pirimidin glicosidasi (FPG). Entrambi i due saggi sono stati eseguiti in cronico, irraggiando le cellule per 15 minuti e trattandole successivamente per 24 ore con i composti suddetti, ad una sola concentrazione, ossia 5 μM di 5-Tioistidina, 0.250 mg/mL di polline (espresso nel grafico come equivalenti di acido gallico) e 250 μM di aspatatina. I risultati descritti nella **figura 7.13** dimostrano nuovamente come i composti oggetto di studio del presente lavoro di tesi, non sembrano in grado di contrastare gli effetti dell'insulto ossidativo a cui i fibroblasti sono stati sottoposti. Al contrario, l'aspatatina sembra ridurre in maniera significativa ($*p<0.05$) la percentuale di cellule con un alto contenuto di ROS (barra rossa), rispetto sia al controllo positivo (UVA 15 minti) che ai due composti testati, mentre in termini di danno ossidativo al DNA (**figura 7.14**), risulta significativamente diverso solo dal polline, nonostante non sia comunque significativamente in grado di proteggere le cellule dal danno al DNA (UVA 15 minuti).

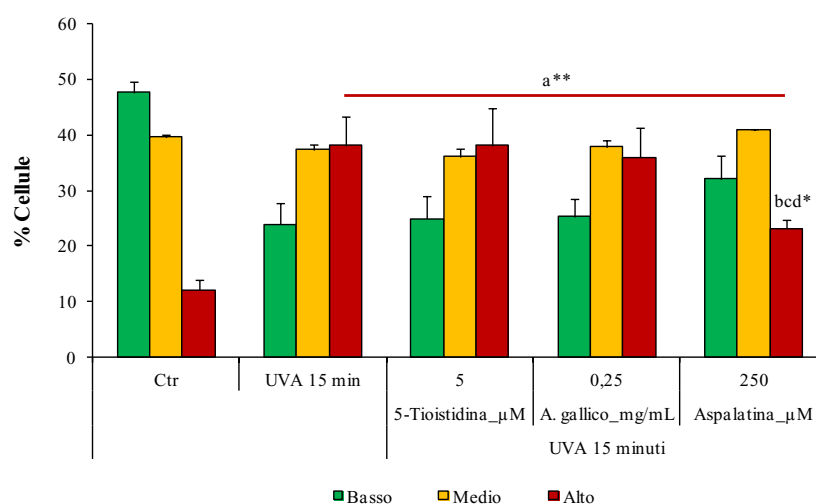


Figura 7.13 Livelli intracellulari di ROS espressi come percentuale (%) di cellule con un basso, medio o alto contenuto di ROS. I dati sono espressi come media \pm SEM. a=Ctrl; b=UVA 15 min; c=5 μM di 5-tioistidina; d=0.250 mg/mL di polline (descritto come equivalenti di acido gallico); $*p<0.05$; $**p<0.01$.

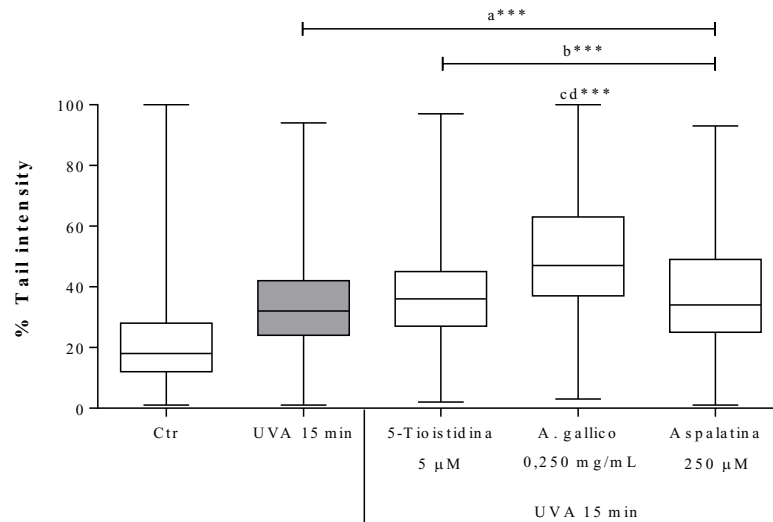


Figura 7.14 Livelli di danno ossidativo al DNA espressi come percentuale (%) di tail intensity. I dati sono illustrati come box plot dove sono riportati i valori massimo, minimo, il 25°, il 75° percentile e la mediana della distribuzione degli stessi. a=Ctrl; b=UVA 15 min; c=5 µM di 5-tioistidina; d= 250 µM di aspalatina; ***p<0.001.

8. Discussione e Conclusioni

Il fotoinvecchiamento è una delle conseguenze principali di una eccessiva esposizione ai raggi ultravioletti. Sebbene questo fenomeno non sia il più grave delle conseguenze dell'esposizione ai raggi UV, come invece possono esserlo di certo i tumori della pelle, non va ovviamente sottovalutato perché la senescenza non comporta semplicemente un effetto estetico ma evidentemente compromette la funzionalità di questo importante tessuto che costituisce la prima barriera del nostro organismo verso l'ambiente esterno. La compromissione di questa funzionalità comporta una maggiore sensibilità della pelle, suscettibilità alle irritazioni ed all'infiammazione oltre che un'alterazione delle fondamentali funzioni modulatorie della pelle in termini di termo regolazione e traspirazione. Tra i segnali più visibili del fotoinvecchiamento è riscontrabile sicuramente una alterazione istologica della cute. Quest'ultima può apparire come secca, corrugata, con pigmentazione anomala o con segni di elastosi e telangectasia. Queste caratteristiche sono tutte riconducibili a dei cambiamenti più profondi a livello di pathways metabolici innescati dai raggi ultravioletti. Tre sono le classi di molecole che partecipano al processo di fotoinvecchiamento: le metalloproteinasi (MMP), le protein chinasi attivate da mitogeni (MAPK) e le specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Poon F. *et al.*, 2014). Se le due prime classi di molecole agiscono proprio a livello del derma perché inibiscono la formazione di collagene a partire dai suoi precursori, i ROS hanno invece diverse molecole bersaglio. I ROS sono i principali responsabili dello stress ossidativo capaci di danneggiare DNA, proteine, lipidi e carboidrati fino ad alterare meccanismi complessi come l'espressione genica (Chaudhuri RK, 2005). L'obiettivo del presente studio ha riguardato proprio il ruolo dei ROS nel fotodanno su fibroblasti di derma umano ed i metodi per valutare il danno in questo modello sperimentale, al fine di poter studiare il possibile effetto fotoprotettivo di nuove molecole di origine sia naturali che di sintesi.

Il modello cellulare preso in considerazione per questa tesi è una coltura cellulare, quindi un modello *in vitro*, di fibroblasti del derma umano (HDF). La scelta di questo modello è strettamente connessa con il tipo di insulto biologico scelto, ovvero i raggi UVA. Questi ultimi sono quelli che riescono ad arrivare fino alla superficie terrestre, al contrario di una parte degli UVB e degli UVC, e hanno un alto potere penetrante perché riescono ad arrivare fino al derma.

Nel titolo di tesi, si parla di nuove strategie per la protezione dei fibroblasti dal fotodanno. Queste strategie riguardano l'utilizzo di due sostanze poco conosciute in letteratura ma con un possibile potere antiossidante: il polline e la 5-tioistidina. Per merito degli antiossidanti è infatti possibile arrestare la reazione a catena innescata dai ROS. Per far luce su questo aspetto, tre sono gli endpoint analizzati: la vitalità cellulare, la produzione di ROS intracellulari e il danno al DNA.

Il polline presente sui fiori di piante appartenenti a numerose specie. Le sue proprietà benefiche sull'uomo sono ben note già da tempo ma grazie allo sviluppo di tecniche analitiche è stato possibile ricostruire il profilo delle sostanze che lo compongono: i nutrienti (carboidrati, proteine e lipidi), gli aminoacidi, i minerali, gli acidi grassi e i loro esteri, le vitamine e i composti fenolici organici. Sono proprio questa ultima classe di composti di cui fanno parte i flavonoidi e gli acidi fenoli ad essere responsabili del potere antiossidante del polline stesso. Il quantitativo di queste sostanze varia profondamente a seconda di diversi fattori come l'origine botanica della pianta, il tempo di raccolta e la regione geografica come descritto da Feas X. *et al* (2012). Infatti, Mao G. *et al* (2012), su un modello cellulare di fibroblasti senescenti, misurando la proliferazione cellulare nelle cellule trattate con 1 mg/mL e 2 mg/mL il tasso di crescita aumenta drasticamente. Kocot J. *et al* (2018) hanno mostrato anche come il polline abbia delle proprietà epatoprotettive su modelli *in vivo*. I livelli dei marker del danno epatico (ALT e AST) nei ratti esposti a carbonio tetra clorato diminuiscono se trattati con il polline. Anche se il polline non è stato mai utilizzato per il trattamento di cellule sottoposte a fotodanno, in questo lavoro di tesi si è voluto testare una sua possibile ulteriore capacità antiossidante previo accertamento dell'assenza di citotossicità. Ottenuti valori di vitalità superiori all'80% in uno spettro di concentrazioni da 7.8 µg/mL a 1 mg/mL, attraverso il saggio per la determinazione di ROS intracellulari, il polline, espresso come equivalenti di acido gallico (mg/mL) per esprimere il contenuto di flavonoidi totali, alle concentrazioni (0.5 mg/mL e 1 mg/mL) non sembra efficace nel ridurre la percentuale di ROS prodotti dall'esposizione per 15 minuti ai raggi UVA. Nonostante le varie strategie applicate già elencate nei risultati, riducendo anche il tempo di irraggiamento a 7 minuti, il polline, aggiunto alle cellule sia prima dell'irraggiamento, quindi un pretrattamento, sia nella fase di recupero, ovvero dopo l'irraggiamento, non sembra mostrare alcun effetto antiossidante.

La 5-tioistidina è un composto bioattivo sintetizzato da alcune specie marine come le microalghe e gli invertebrati marini. In questi stessi organismi la 5-tioistidina funge da messaggero molecolare per il signaling inter- e intracellulare, ma anche come scavenger di perossidi riducendoli mediante attacco nucleofilo (Weaver K.H. *et al.*, 1995). Nell'ambito di questa tesi, la 5-tioistidina proviene da cellule uovo di riccio marino. L'uso di questo composto per la protezione da fotodanno contro i raggi UVA su fibroblasti del derma umano non è ancora molto documentato in letteratura. Ma altri impieghi in contesti anche patologici sembrano promettenti. Un esempio è la diminuzione di proliferazione e attivazione del processo autofagico in modelli cellulari di epatocarcinoma (Hep-G2) con incubazione per 24 ore a diverse concentrazioni (Russo G. L. *et al.*, 2014) o anche in modelli *in vivo* di fibrosi epatica in cui i topi vengono divisi in gruppi e la fibrosi epatica viene indotta tramite iniezione intraperitoneale di carbonio tetracloride e iniezione di 5-tioistidina pari a 50 µg/g i marker epatici nel siero diminuiscono così come il deposito di collagene e di marker fibrogenici (Brancaccio M. *et al.*, 2018). Per quanto riguarda il suo potere antiossidante, ovvero la sua capacità di neutralizzare i ROS, alcuni risultati sono stati ottenuti in modelli di disfunzione endoteliale *in vitro* in cui è stata indotta l'iperglicemia. La 5-tioistidina sembra agire sul sistema glutatione ridotto e glutatione ossidato (GHS/GSSG) (Castellano I. *et al.*, 2018). Nel presente lavoro di tesi, è stata verificata innanzitutto l'assenza di citotossicità testando un range di concentrazioni da 1µM a 100 µM, preservando la vitalità al di sopra dell'80% e successivamente è stata misurata la capacità di prevenire o ridurre il danno ossidativo indotto dai raggi UVA. Nel corso dei saggi effettuati con l'utilizzo di diverse strategie già precedentemente descritte, sottoponendo le cellule a un irraggiamento pari a 15 minuti non si riscontrò, a nessuna concentrazione testata, una diminuzione nella produzione di ROS. Per questo motivo, la dose di irraggiamento è stata abbassata fino a 7 minuti di esposizione poiché la dose precedente poteva essere troppo alta affinché le sostanze potessero avere un effetto. Sono stati scelti 7 minuti in quanto in un saggio preliminare senza le sostanze le cellule mostravano comunque un significativo aumento dei livelli di ROS intracellulari.

Il comet assay è tra gli altri endpoint misurati. Anche in questo caso si è cercato di standardizzare il tempo di irraggiamento sempre a 15 minuti, ma questi parametri (DCF e comet assay) presentano cinetiche diverse. A dosi subletali si osservavano alterazioni dello stato redox intracellulare in termini di contenuto

totale di ROS nel citosol già dopo 7 min di irraggiamento. Questa dose non sembra essere sufficiente per causare danni evidenti al DNA in termini di SSB. Al contrario, aumentando il potere risolutivo della metodica con l'utilizzo di enzimi, quali FPG, per quantificare anche le basi ossidate, già dopo 15 minuti di irraggiamento si evidenzia una variazione significativa del danno. In conclusione, questi dati possono essere utili per individuare le dosi ottimali di irraggiamento UVA in un contesto sperimentale in vitro e la scala temporale di risposte evocate che possono essere utilizzate per valutare gli effetti protettivi. Anche nel caso degli effetti antiossidanti dei composti testati nel proteggere il DNA dal danno fotoindotto le sostanze in analisi non sembrano essere in grado di proteggere i fibroblasti dal fotodanno in termini di danno ossidativo al DNA. Per verificare quanto emerso dai saggi svolti, le due sostanze, 5-tioistidina e polline (espresso come equivalenti di acido gallico), sono stati messi a confronto con un terzo composto, l'aspatina, sia per l'analisi della produzione di ROS sia per il danno ossidativo al DNA. Questo composto proveniente dalle foglie di *Asplatatus Linearis* è stato già studiato in letteratura e le sue proprietà antiossidanti sono ben note in diversi studi *in vivo* e *in vitro* come riportato da Cavinato M. *et al.* (2017).

Questi risultati poco soddisfacenti possono essere dovuti a diverse variabili quali la possibile inadeguatezza delle concentrazioni testate, la peculiarità del modello cellulare impiegato che essendo costituito da cellule neonatali risulta essere più sensibile rispetto a linee primarie dell'adulto e pertanto non ottimale per questo tipo di indagine. In questo contesto potrebbe essere necessario modulare le dosi di irraggiamento per ottimizzare il test. In conclusione, il presente lavoro di tesi ha contribuito ad identificare efficacemente un modello di fotoesposizione di fibroblasti neonatali del derma umano per descrivere variazioni significative dei livelli intracellulari di ROS e relativo danno al DNA. L'impianto sperimentale è stato successivamente testato su alcuni composti naturali con potenziale interesse nella fotoprotezione ma tuttavia questa seconda parte dello studio non è stata in grado di metterne in evidenza un significativo effetto nonostante le promettenti evidenze riportate in letteratura. A riguardo non possiamo considerare queste osservazioni conclusive per alcune possibili limitazioni sperimentali che purtroppo non è stato possibile approfondire nel presente lavoro di tesi ma i dati nel loro insieme forniscono importanti indicazioni per successive indagini che verranno condotte alla luce dell'indubbio interesse verso un impiego innovativo di queste molecole naturali.

Bibliografia

Asta Juzeniene and Johan Moan 'Beneficial effects of UV radiation other than via vitamin D production'
Dermatoendocrinol. 2012 Apr 1; 4(2): 109–117.DOI: 10.4161/derm.20013

M. Berneburg, H. Plettenberg, J. Krutmann'Photoaging of human skin' Photodermatol Photoimmunol
Photomed2000;16: 239–244

Bevzo V., Grygor'eva N. P., 1997.' Effect of bee pollen extract on glutathione system activity in mice liver
under X-ray irradiation.' Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal 69 (4): 115-117

Brancaccio M., D'argenio G., Lembo V., Palumbo A., Castellano I. 'Antifibrotic Effect of Marine Ovothiol in
an in vivo Model of Liver Fibrosis' (2018), Oxidative medicine and Cellular Longevity

Brozyna Anna, PhD, Zbytek Blazej, MD, PhD, Granese Jacqueline, MD, Carlson J. Andrew, MD, Ross Jeffrey,
MD, and Slominski Andrzej, MD, PhD 'Mechanism of UV-related carcinogenesis and its contribution to
nevi/melanoma' Expert Rev Dermatol. 2007; 2(4): 451–469

Castellano, P. Florian, P. Seebeck 'On ovotiol biosynthesis and biological roles: from life in the ocean to
therapeutic potential

Maria Cavinato . Birgit Waltenberger . Giorgia Baraldo . Carla V. C. Grade . Hermann Stuppner . Pidder
Jansen-Du"rr (2017) 'Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging'
Biogerontology (2017) 18:499–516 DOI 10.1007/s10522-017-9715-7

Chaudhuri R.K. 'Sunscreens: Regulation and Commercial Development' Third Edition 2005, 604-609

Chen VL, Fleischmajer R, Schwartz E, Palaia M, Timpl R. Im-munochemistry of elastotic material in sun-damaged skin. J In-vest Dermatol 1986;87: 334–337

E.-M. Choi, 'Antinociceptive and anti-inflammatory activities of pine (*pinus densiflora*) pollen extract', Phytoterapy Research, vol. 21, no.5, pp. 471-475, 2007

Diffley B.L. 'Sunscreens: Regulation and Commercial Development' Third Edition. 2005, 46-47

P.V.Dludla, C.J.F.Muller, J.Louw, E.Joubert, R.Salie, A.R.Opoku, R.Johnson (2014) 'The cardioprotective effect of an aqueous extract of fermented rooibos (*Aspalathus linearis*) on cultured cardiomyocytes derived from diabetic rats' Phytomedicine, Volume 21, Issue 5, 15 April 2014, Pages 595-601

K.H. Erlwanger and K.G. Ibrahim. Aspalathin a unique phytochemical from the South African rooibos plant (*Aspalathus linearis*): A mini Review J. Afr. Ass. Physiol. Sci 5 (1): 1-6, July 2017

Fisher G.J., Talwar H.S., Lin J.Y. et al 'Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo' J clin Invest 1998; 101: 1432-1440

Gaspar LR, Camargo FB, Gianeti MD, Maia Campos PMBG (2008) Evaluation of dermatological effects of cosmetic formulations containing *Saccharomyces cerevisiae* extract and vitamins. Food Chem Toxicol 46:3493–3500. doi:10. 1016/j.fct.2008.08.028

Ialomiteanu M., Daghie V., Nicolau N., Radulescu M., 1976 Behandlung von Hepatitiden mit Pollen und Bienenbrot Neues in der Apitherapie, Apimondia; Bukarest; pp 292-302

Kang S., Fisher G.J., Voorhees J. 'Photoageing and topical tretinoin: therapy pathogenesis and prevention' Arch Dermatol 1997; 133: 1280-1284

V. Kassyanenko, I. Komisarenko and E. Dubtsova, 'Influence of honey, pollen and bee bread on serum cholestrin of patient with pathological lipid metabolism' in Beekeeping, Apitherapy and Life Quality, pp. 81-82, International Industrial Academy, Moscow, Russia, 2010

Joanna Kocot, Małgorzata Kieczykowska, Dorota Luchowska-Kocot, Jacek Kurzepa, and Irena Musik 'Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application' Oxid Med Cell Longev. 2018; 2018: 7074209

Kondo, M., Hirano, Y., Nishio, M. and Furuya, Y. (2013) Xanthine oxidase inhibitory activity and hypouricemic effect of aspalathin from unfermented rooibos, Journal of Food. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1750-3841.12304/full> (Accessed: 24 May 2017)

Tandeka Magcwebeba, Pieter Swart, Sonja Swanevelder, Elizabeth Joubert and Wentzel Gelderblom (2016) 'Anti-Inflammatory Effects of Aspalathus linearis and Cyclopia spp. Extracts in a UVB/Keratinocyte (HaCaT) Model Utilising Interleukin-1 α Accumulation as Biomarker' Molecules 2016, 21, 1323; doi:10.3390/molecules21101323

Gen-Xiang Mao, Ling-Di Zheng, Yong-Bao Cao, Zhuo-Mei Chen, Yuan-Dong Lv, Ya-Zhen Wang, Xi-Lian Hu, Guo-Fu Wang, and Jing Yan 'Antiaging Effect of Pine Pollen in Human Diploid Fibroblasts and in a Mouse Model Induced by D-Galactose' Oxid Med Cell Longev. 2012; 2012: 750963

Mitchell RE. Chronic solar elastosis: A light and electron micro-scopic study of the dermis. *J Invest Dermatol* 1967;48: 203–220

Moyal D¹, Chardon A, Kollias N ‘Determination of UVA protection factors using the persistent pigment darkening (PPD) as the end point. (Part 1). Calibration of the method.’

Flora Poon Anna L. Chien ‘Mechanisms and treatments of photoaging’ (2014)

Rosati P., Colombo R. ‘I tessuti’ 1997; 19-30 e 95-121 e 146-151.

G.L. Russo, M. Russo, I. Castellano, A. Napolitano and A. Palumbo, *Mar. Drugs*, 2014, 12, 4069-4085

Xesús Feás, M. Pilar Vázquez-Tato, Leticia Estevinho, Julio A. Seijas, and Antonio Iglesias ‘Organic Bee Pollen: Botanical Origin, Nutritional Value, Bioactive Compounds, Antioxidant Activity and Microbiological Quality’ *Molecules*. 2012 Jul; 17(7): 8359–8377

Hani Yousef; Mandy Alhajj; Sandeep Sharma *Anatomy, Skin (Integument), Epidermis* (2019)

