



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata
Curriculum Tecnologie Biologiche

**BIODISPONIBILITÀ COMPARATA DI DIVERSE ISOFORME DI
COENZIMA Q *IN VITRO* IN DIFFERENTI MODELLI CELLULARI.**

**COMPARED BIOAVAILABILITY OF DIFFERENT COENZYME Q
ISOFORMS IN *IN VITRO* CELLULAR MODELS.**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Roberta Di Romualdo

Relatore:

Chiar.mo Prof. Luca Tiano

Correlatore:

Dott.ssa Sonia Silvestri

Sessione di Laurea Autunnale

Anno Accademico 2021/2022

Quando ci entri dentro, la scienza, come tutte le altre cose che la gente fa per vivere, non è molto complicata. Quello che devi fare è risolvere un enigma. E con gli enigmi, quello che devi fare è rifletterci per un po', considerare tutti i fatti che puoi scoprire e poi formulare un'ipotesi. Proporre una soluzione. Il passo successivo è fare quanto possibile per confutarla. Mostrare che i pezzi non si incastrano nel modo in cui avevi proposto: se ci riesci, proponi un'altra soluzione. E poi riprovi.

Kary Mullis, da *Ballando nudi nel campo della mente*.

Sommario

Capitolo I: INTRODUZIONE	5
1.1 Panoramica sull'invecchiamento	5
1.2 Invecchiamento demografico e “invecchiamento attivo”	5
1.3 Strategie per favorire un invecchiamento sano e attivo	7
1.4 Il coenzima Q₁₀ come “terapia anti-età”	8
Capitolo II: BIOCHIMICA DEL COENZIMA Q	11
2.1 Il coenzima Q	11
2.2 Biosintesi del coenzima Q	12
2.3 Distribuzione del coenzima Q	15
2.4 Funzioni del coenzima Q	17
2.5 Il problema della biodisponibilità del coenzima Q₁₀ esogeno	19
2.6 Applicazioni cliniche	21
2.6.1 Deficienza primaria	21
2.6.2 Deficienza secondaria	22
Capitolo III: OBIETTIVO DELLA TESI	25
Capitolo IV: MATERIALI E METODI	26
4.1 Preparazione delle aliquote di coenzima Q ossidato e ridotto	26
4.2 Colture cellulari	27
4.2.1 Specifiche di mantenimento e semina delle linee cellulari	27
4.2.2 Trattamento con coenzima Q esogeno delle linee cellulari	28
4.3 Quantificazione delle isoforme di coenzima Q mediante HPLC-ECD	30
4.4 Quantificazione della concentrazione delle proteine cellulari tramite BCA assay	33
4.5 Analisi statistica	34

Capitolo V: RISULTATI	35
<i>5.1 Ruolo dello stato ossidativo del CoQ</i>	36
<i>5.2 Ruolo delle isoforme di coenzima Q</i>	41
<i>5.3 Ruolo del modello cellulare</i>	44
Capitolo VI: DISCUSSIONE	46
Capitolo VII: CONCLUSIONI	54
Bibliografia	57

Capitolo I: INTRODUZIONE

1.1 Panoramica sull'invecchiamento

Per invecchiamento si intende l'insieme dei cambiamenti che avvengono all'interno delle cellule e dei tessuti a causa del progredire dell'età. È un processo fisiologico, continuo e irreversibile di mutazione naturale che inizia nella prima età adulta ed è caratterizzato da un progressivo deterioramento dei meccanismi di difesa e di mantenimento dell'equilibrio omeostatico dell'organismo, con graduale decadimento funzionale di organi e apparati. Infatti, l'avanzare dell'età predispone ad un maggior rischio di problematiche legate all'invecchiamento, ossia probabilità di sviluppare malattie croniche, comorbilità e condizioni di fragilità che si riflettono sulla sfera biologica, psicologica e sociale del soggetto anziano e che ne compromettono l'autonomia e l'indipendenza.

1.2 Invecchiamento demografico e “invecchiamento attivo”

L'invecchiamento della popolazione è un processo che investe gran parte dei Paesi, soprattutto quelli più sviluppati. A partire dalla seconda metà del ventesimo secolo, in Occidente si è riscontrato un aumento progressivo dell'aspettativa di vita. Tuttavia, se la longevità è di per sé una conquista, a ciò spesso non corrisponde un aumento speculare della qualità della vita, che rischia pertanto di assumere i connotati di un processo di decadimento funzionale involutivo.

L'invecchiamento in buona salute, ossia la posticipazione o la riduzione degli effetti indesiderati legati all'avanzare dell'età, è tra le sfide più difficili che la medicina moderna deve affrontare. Gli obiettivi di un invecchiamento sano sono il mantenimento della salute fisica e mentale, la prevenzione dei disturbi e il rimanere attivi e indipendenti. Inoltre, ipertensione arteriosa, sarcopenia, diabete, malattie cardiovascolari e respiratorie sono delle vere e proprie minacce per l'autonomia dell'anziano e rischiano di avere un impatto finanziario negativo all'interno delle famiglie e sui sistemi sanitari.

È pertanto necessario fornire evidenze e indicazioni circa la progettazione e l'implementazione di politiche a sostegno di un buon invecchiamento, basate su un'azione pubblica finalizzata alla gestione clinica e sociale e al superamento della visione dell'anzianità come una "fase passiva" dell'esistenza, ossia come un periodo di disabilità e decadimento fisico, a favore invece di un *invecchiamento attivo*, cioè "un processo di ottimizzazione delle opportunità per la salute, la partecipazione e la sicurezza al fine di migliorare la qualità della vita man mano che le persone invecchiano" (*World health organization, 2002*) (1).

I fattori che favoriscono un invecchiamento attivo sono da ricercarsi nel modo di vivere e nella qualità delle esperienze e opportunità accumulate durante tutto l'arco della vita del singolo, come anche nel perpetuarsi di queste nell'età adulta e anziana.

In virtù dei suoi effetti positivi sugli individui, l'invecchiamento attivo può essere considerato un efficiente strumento di prevenzione per aspirare quanto più possibile ad un invecchiamento in salute.

1.3 Strategie per favorire un invecchiamento sano e attivo

Tra le strategie utili a favorire un invecchiamento sano e attivo, lo stile di vita gioca un ruolo fondamentale in quanto contribuisce sia a prevenire le patologie che possono affliggere la terza età sia a gestire l'eventuale presenza.

Forti evidenze scientifiche testimoniano che uno stile di vita sano abbia effetti benefici sulla prevenzione primaria e secondaria di patologie come infarto del miocardio, ipertensione arteriosa e diabete e a rallentare la perdita progressiva e generalizzata di massa muscolare (processo noto come sarcopenia) a cui si va incontro con l'avanzare dell'età.

In particolare, per l'adozione di uno stile di vita salutare, è opportuno preferire una dieta varia che includa frutta e verdure perché fonti di vitamine, antiossidanti, fibre e sali minerali; tenere sotto controllo il peso in quanto un aumento di peso è associato ad un rischio maggiore per tutte le patologie; evitare il fumo e/o smettere di fumare e praticare attività fisica costante e moderata che contribuisce sia al consumo energetico sia al mantenimento e incremento della massa muscolare e al miglioramento del metabolismo.

Inoltre l'approccio nutraceutico, basato sull'integrazione di sostanze come flavonoidi, catechine e coenzima Q₁₀(CoQ₁₀), note per la loro attività di stimolazione dei meccanismi alla base della longevità e del benessere, rappresenta ad oggi una realtà sempre più importante e una delle più interessanti aree di sviluppo della medicina preventiva e anti-età, consentendo in molti casi di supportare la funzionalità dei diversi organi, migliorare le prestazioni fisiche e cognitive e ridurre i fattori di rischio per le malattie croniche, favorendo un invecchiamento di successo.

1.4 Il coenzima Q₁₀ come “terapia anti-età”

È una molecola lipofila ubiquitaria in tutti gli Eucarioti, un componente essenziale della catena di trasporto degli elettroni mitocondriale dotato di capacità antiossidanti e anti-apoptotiche. Il Coenzima Q₁₀ è l'unico antiossidante liposolubile sintetizzato nel nostro corpo in modo endogeno ed è essenziale per il corretto funzionamento dei mitocondri e per il sostegno delle principali funzioni cellulari.

Tuttavia, è ormai noto che nel corso della vita, così come in alcune particolari malattie età-correlate, si assiste ad una significativa e progressiva riduzione del tasso di biosintesi endogena del CoQ₁₀. Infatti, uno studio condotto da *A. Kalén et al.* (1989) ha evidenziato che nel pancreas e nel surrene umano concentrazioni massime di coenzima Q si rilevano a 2 anni di età mentre negli altri organi intorno a 20 anni e poi, con l'avanzare dell'età, si ha una graduale e progressiva riduzione dei livelli tissutali che interessa tutti gli organi, soprattutto cuore, polmoni, milza, pancreas, surrene e, in misura minore, reni e fegato e che contribuisce ad uno stato di esaurimento energetico a livello cellulare. Un *pattern* simile è stato osservato nel ratto, in cui la concentrazione più alta di ubiquinone si rileva a 30 giorni di età (2).

Organ	Age group (years)	Ubiquinone-10 ($\mu\text{g/g ww}$)
Lung	1-3 days	2.2 \pm 0.3
	0.7-2 years	6.4 \pm 0.4
	19-21 years	6.0 \pm 0.4
	39-43 years	6.5 \pm 0.6
	77-81 years	3.1 \pm 0.4
Heart	1-3 days	36.7 \pm 1.8
	0.7-2 years	78.5 \pm 4.6
	19-21 years	110.0 \pm 9.4
	39-43 years	75.0 \pm 8.3
	77-81 years	47.2 \pm 3.9
Spleen	1-3 days	20.7 \pm 3.2
	0.7-2 years	30.2 \pm 2.7
	19-21 years	32.8 \pm 2.6
	39-43 years	28.6 \pm 2.3
	77-81 years	13.1 \pm 1.8
Liver	1-3 days	12.9 \pm 1.5
	0.7-2 years	45.1 \pm 5.2
	19-21 years	61.2 \pm 7.3
	39-43 years	58.3 \pm 6.1
	77-81 years	50.8 \pm 7.1
Kidney	1-3 days	17.4 \pm 2.1
	0.7- 2 years	53.4 \pm 6.6
	19-21 years	98.0 \pm 10.4
	39-43 years	71.1 \pm 6.8
	77-81 years	64.0 \pm 6.6
Pancreas	1-3 days	9.2 \pm 1.2
	0.7-2 years	38.2 \pm 4.1
	19-21 years	21.0 \pm 3.0
	39-43 years	19.3 \pm 2.1
	77-81 years	6.5 \pm 0.5
Adrenal	1-3 days	17.5 \pm 2.1
	0.7-2 years	57.9 \pm 6.8
	19-21 years	16.1 \pm 2.3
	39-43 years	12.2 \pm 1.5
	77-81 years	8.5 \pm 1.0

Figura 1: variazione delle concentrazioni di CoQ₁₀ negli organi umani in funzione dell'età. (Fonte: A. Kalén et al. 1989).

Essendo le caratteristiche bioenergetiche e antiossidanti del CoQ₁₀ essenziali nel supporto della funzionalità mitocondriale e nel sostegno della fisiologia cellulare soprattutto durante la fase di senescenza, la supplementazione di coenzima Q₁₀, unitamente ad uno stile di vita sano, potrebbe alleviare e/o rallentare i processi legati al declino fisiologico.

Per questo, negli ultimi decenni è emersa l'ipotesi di utilizzare il CoQ₁₀ come "terapia anti-età", in quanto il mantenimento dei suoi livelli funzionali a livello delle membrane cellulari tramite l'assunzione esogena di integratori alimentari potrebbe rappresentare una valida

strategia per rallentare il processo di invecchiamento e migliorare lo stato di salute e la qualità della vita nei soggetti anziani, aiutando a contrastare l'insorgenza di tutte quelle condizioni patologiche e non patologiche ma comunque invalidanti, come la sarcopenia, che aumentano la loro incidenza proprio con il progredire dell'età.

Capitolo II: BIOCHIMICA DEL COENZIMA Q

2.1 Il coenzima Q

Il coenzima Q è una molecola lipofila universalmente presente nelle cellule degli Eucarioti in tutte le membrane biologiche e soprattutto nei mitocondri, dove svolge il ruolo di *shuttle* di elettroni tra i complessi I e III della catena respiratoria e tra il complesso II e il complesso III, ma è anche cofattore di molte deidrogenasi ed un forte antiossidante.

È stato isolato nel 1957 da *Frederick Crane* e dal suo team dell'*Enzyme Institute* da mitocondri di cuore di manzo, ma la sua struttura chimica è stata caratterizzata solo nel 1958 da *Wolf* e collaboratori e consta di un anello benzoico collegato ad una catena laterale isoprenoica di lunghezza variabile (3). Nei mitocondri umani l'isoforma di CoQ maggiormente presente è il coenzima Q₁₀ con 10 unità isoprenoidi.

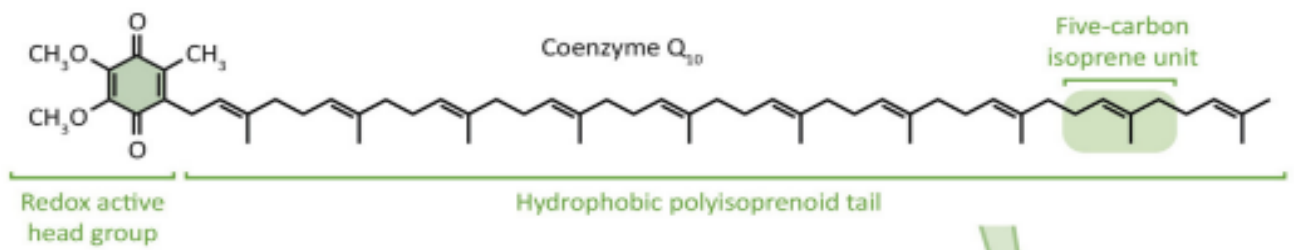


Figura 2: struttura chimica del CoQ₁₀ (Fonte: J. A. Stephely et al. 2017).

Può esistere in tre stati di ossidazione: la forma completamente ridotta (altresì nota come ubiquinolo), l'intermedio semichinone e la forma ossidata (ubichinone).

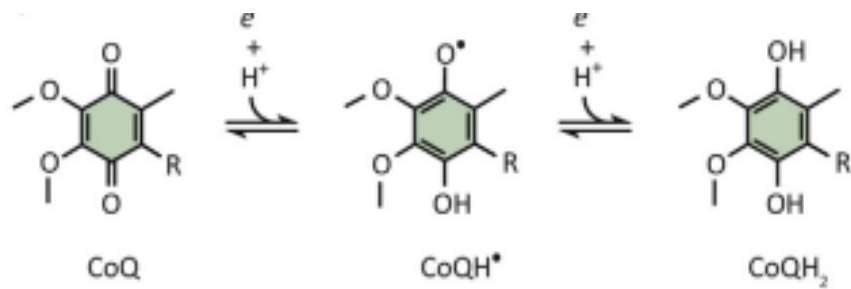


Figura 3: reazioni di riduzione-ossidazione del CoQ₁₀ (Fonte: J. A. Stephely et al. 2017).

2.2 Biosintesi del coenzima Q

Il coenzima Q è sintetizzato principalmente nei mitocondri e la biogenesi richiede la sintesi dell'anello benzoico, la sintesi della catena laterale, l'unione delle due unità funzionali e modifiche successive a livello della testa. Nei mammiferi, l'anello benzoico deriva dall'amminoacido essenziale fenilalanina, che viene convertito nel citosol prima in tirosina e poi in 4-idrossibenzoato.

La sintesi della catena laterale avviene attraverso la via del mevalonato che porta alla produzione di Farnesil pirofosfato (FPP) a partire dall'Acetil-CoA. Negli Eucarioti la parte iniziale della via del mevalonato comporta la condensazione di tre acetil-CoA in 3-idrossi-3-metilglutaril-coenzima A da parte dell'HMG-CoA reduttasi, il principale enzima regolatore nella biosintesi del colesterolo. Il mevalonato viene poi fosforilato in due step dalla mevalonato chinasi (MVK) e dalla fosfomevalonato chinasi.

La successiva decarbossilazione produce isopentenil pirofosfato (IPP), che è il precursore di FPP e anche l'elemento costitutivo della biosintesi del dolicolo e della catena

laterale del CoQ. Dall'isomerizzazione dell'IPP deriva il dimetilallil pirofosfato, la FPP-sintasi utilizza l'IPP e il dimetilallil pirofosfato per produrre l'FPP con la formazione intermedia di geranyl pirofosfato (GPP). L'FPP viene convertito in colesterolo, dolicoli e CoQ. L'HMG-CoA reduttasi, che converte l'HMG-CoA in mevalonato, è inibita dalle *statine*, una classe di composti ampiamente utilizzata per il trattamento dell'ipercolesterolemia.

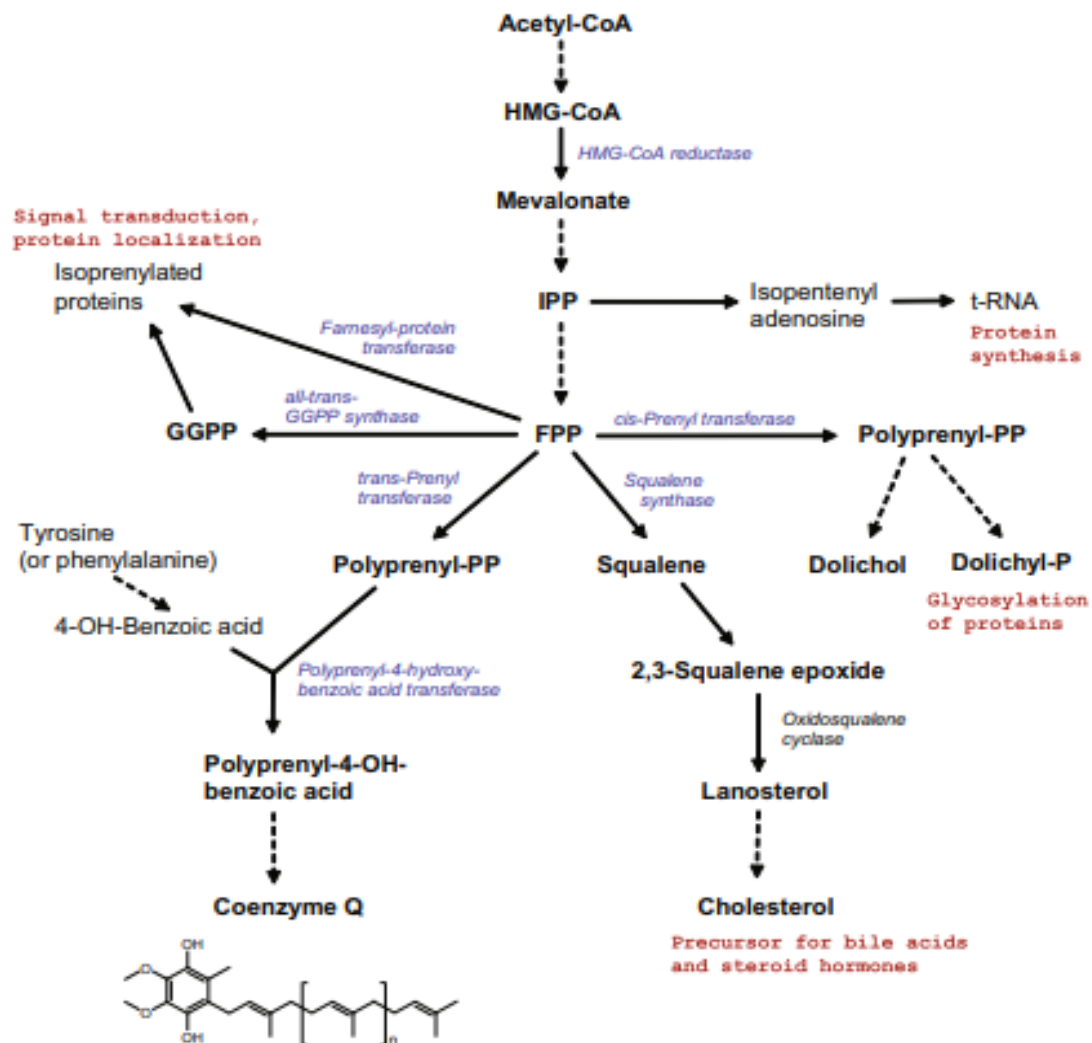


Figura 4: conversione enzimatica e condensazione dell'acetyl-CoA in farnesil-PP e successiva biosintesi di CoQ, colesterolo e dolicolo. (Fonte: M. Bentinger; M. Tekle; G. Dallner 2010).

Gli intermedi di reazione sono quindi trasportati a livello della membrana mitocondriale interna ma i meccanismi che mediano questo processo non sono ancora noti. Secondo *J. A.*

Stefely e D. J. Pagliarini (2017), è possibile che esistano dei trasportatori, non ancora identificati, che consentano il passaggio delle molecole di IPP altamente polari dal citosol alla matrice mitocondriale (4).

Le subunità isoprenoiche sono legate insieme attraverso reazioni di polimerizzazione e unite all'anello benzoico per sostituzione elettrofila aromatica.

La trans-preniltransferasi (CoQ1p) catalizza la condensazione di FPP con diverse IPP, tutte in configurazione trans, per formare una lunga catena isoprenoide. L'enzima appartiene agli enzimi di classe III della famiglia delle transpreniltransferasi: mentre gli enzimi di classe I producono catene isoprenoidi corte e quelli di classe II catene medie e lunghe, gli enzimi di classe III sono responsabili della produzione solo di catene isoprenoidi lunghe.

Nella fase terminale della biosintesi del CoQ, l'anello benzoico viene ulteriormente modificato da una reazione di decarbossilazione e da una serie di idrossilazioni e metilazioni.

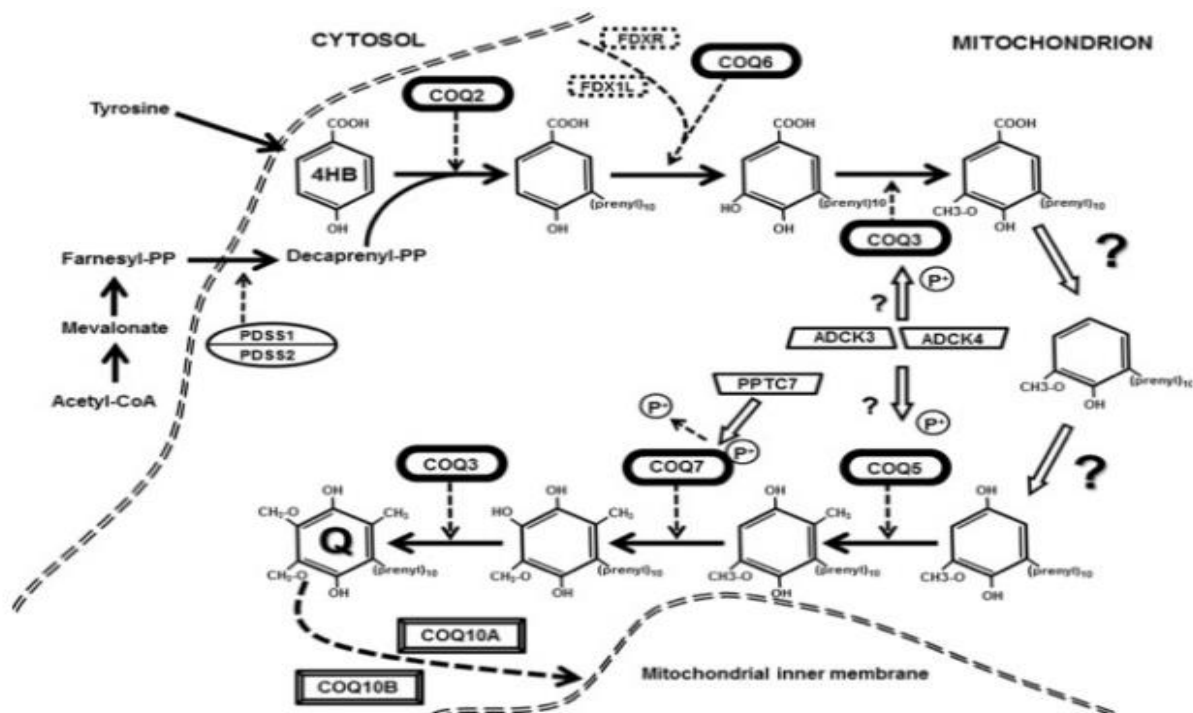


Figura 5: pathway di biosintesi del CoQ₁₀ nelle cellule di mammifero. I punti interrogativi indicano gli step enzimatici non ancora caratterizzati. (Fonte: M. J. Acosta et al. 2016).

2.3 Distribuzione del coenzima Q

Il CoQ è presente in tutti i tessuti e cellule ma in quantità variabile. La forma principalmente presente negli animali murini (topi e ratti) è il CoQ₉, la cui quantità varia da 17 µg/g nel tessuto polmonare a 202 µg/g nel cuore. Solo il 10-20% del CoQ totale è rappresentato dal CoQ₁₀, ad eccezione di cervello, milza e intestino dove la concentrazione ammonta a circa il 30-40%.

Nell'uomo la forma più diffusa è il CoQ₁₀ che varia da 8 µg/g nel polmone a 114 µg/g nel cuore. Piccole quantità, pari a 2-7% di CoQ₉, si trovano anche nei tessuti umani.

	Rat			Human		
	CoQ9	CoQ10	% Reduced	CoQ9	CoQ10	% Reduced
Heart	202	17	22	3	114	47
Kidney	124	22	42	3	67	73
Liver	131	21	87	2	55	95
Muscle	43	3	40	1	40	60
Brain	37	19	27	1	13	23
Pancreas	37	3	62	2	33	100
Spleen	23	9	18	1	25	87
Lung	17	2	12	1	8	24
Thyroidea	44	7	45	1	25	68
Testis	32	5	49	1	11	78
Intestine	51	19	67	1	12	93
Colon	48	8	52	1	11	83
Ventricle	56	5	52		12	59

Figura 6: Quantità, tipo e grado di riduzione del Coenzima Q nei tessuti umani e di ratto. I risultati riportati sono espressi nell'ordine di µg/g di tessuto. (Fonte: M. Turunen et al. 2004).

Tuttavia, come riportato da *M. Turunen et al.* (2004), la concentrazione di CoQ varia notevolmente non solo tra diversi organi ma anche tra regioni dello stesso organo, come nel cervello bovino (6). Differenze in termini di concentrazione di CoQ₁₀ sono riconducibili a specializzazioni sia strutturali che funzionali.

	CoQ10
Temporal cortex	10
Parietal cortex	15
Hippocampus	6
Striatum	25
Medulla oblongata	5
White matter	3

Figura 7: concentrazioni di CoQ₁₀ in diversi distretti di cervello. I risultati riportati sono espressi nell'ordine di µg/g di tessuto. (Fonte: M. Turunen et al. 2004)

A livello intracellulare, quantità alte di CoQ si trovano nelle membrane mitocondriali esterne ed interne, nei lisosomi e nelle vescicole del Golgi. La localizzazione nelle membrane biologiche è fortemente influenzata dallo stato redox: l'ubichinolo è presente tra le teste dei fosfolipidi che costituiscono il *bilayer* e contribuisce all'interazione con diversi metaboliti; l'ubichinone è invece localizzato tra le code e funge da accettore/donatore di elettroni per la catena di trasporto mitocondriale. Tra i due strati fosfolipidici è presente un pool di CoQ responsabile del mantenimento delle concentrazioni nei due distretti.

2.4 Funzioni del coenzima Q

Oltre all'essenziale ruolo bioenergetico di *shuttle* di elettroni all'interno della catena di trasporto elettronico mitocondriale, possiede molte altre funzioni. Esso è infatti dotato di un'efficace azione antiossidante utile nel prevenire l'ossidazione di proteine, lipidi e DNA.

Impedisce inoltre l'apertura dei pori di transizione della membrana mitocondriale che consentirebbero la traslocazione di molecole di dimensioni fino a 1500 Da con conseguente collasso delle funzioni mitocondriali. Il coenzima Q è in grado infatti di contrastare eventi pro-apoptotici come deplezione di ATP, rilascio del citocromo c nel citosol, attivazione della caspasi-9 e depolarizzazione del potenziale di membrana mitocondriale.

Il CoQ esercita molteplici effetti antinfiammatori influenzando l'espressione di geni NFκB-1-dipendenti codificanti per fattori coinvolti in molteplici processi cellulari come la risposta immunitaria, la flogosi, l'apoptosi e la crescita cellulare: secondo *M. Bentinger et al* (2010), l'assorbimento di CoQ nei linfociti e nei monociti avvia il rilascio di mediatori e di sostanze segnale nel sangue in grado di modificare tale espressione in una varietà di tessuti (5)

Proteggendo le lipoproteine a bassa densità (LDL) dall'ossidazione, questo lipide ha anche proprietà anti-aterosclerotiche e aiuta a contrastare la disfunzione endoteliale stimolando il rilascio di ossido nitrico.

Infine, contribuisce all'attività di proteine disaccoppianti (UCPs) presenti nella membrana mitocondriale interna e capaci di traslocare H⁺ dall'esterno verso l'interno dei mitocondri. Il gradiente protonico costruito dalla catena respiratoria quando è disaccoppiato dalla fosforilazione ossidativa produce calore anziché energia. Sono note 5 UCPs nell'uomo di cui l'UCP1, la più studiata, è presente nel tessuto adiposo bruno e partecipa alla termogenesi.

Tuttavia, *Turunen et al.* (2004) (6), suggeriscono che le UCPs potrebbero essere coinvolte anche nella soppressione dei radicali dell'ossigeno e alterazioni della loro espressione sembrerebbero correlate a malattie come obesità e diabete.

Echtay e collaboratori, nel 2000, (7) hanno dimostrato che il CoQ è un cofattore necessario per la funzione delle UCPs, perché capace di sottrarre H^+ agli acidi grassi e consegnarli al gruppo accettore di H^+ delle proteine disaccoppianti.

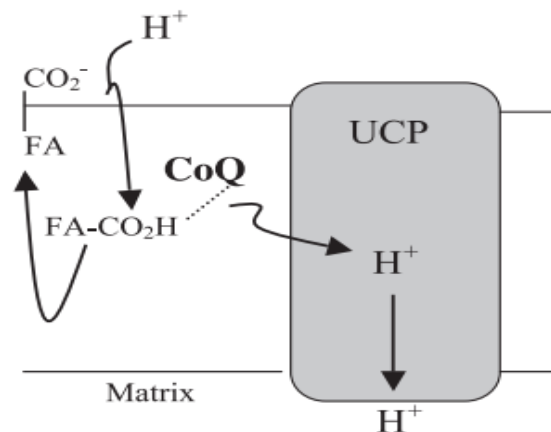


Figura 8: ruolo del CoQ nel funzionamento dell'UCP. Il protone è consegnato dall'acido grasso all'UCP attraverso il CoQ. (Fonte G. Dallner et al. 2004)

Soprattutto nell'ultimo ventennio l'attenzione della comunità scientifica si è focalizzata sul ruolo antiossidante del CoQ e sulla capacità che esso ha di inibire la perossidazione lipidica sia prevenendo la produzione di radicali perossilici sia riducendo il radicale perferrile nelle fasi iniziali della perossidazione con formazione di ubisemichinone e H₂O₂.

Questo spegnimento dei radicali perferrilici che impedisce la propagazione della perossidazione lipidica protegge non solo i lipidi, ma anche le proteine dall'ossidazione (*cross-linking*). Inoltre, la forma ridotta di CoQ rigenera efficacemente la vitamina E dal radicale α -tocoferossilico come ulteriore meccanismo di prevenzione del danno.

Infine, dall'interazione di H_2O_2 con gli ioni metallici si generano radicali idrossilici altamente reattivi soprattutto verso il DNA: il CoQ è in grado di prevenire l'ossidazione delle basi del DNA mitocondriale, meno protetto dal danno ossidativo rispetto al DNA genomico.

2.5 Il problema della biodisponibilità del coenzima Q_{10} esogeno

Considerate le funzioni essenziali per la fisiologia e la vitalità cellulare svolte dal CoQ e poiché la sua biosintesi endogena diminuisce con l'età, la supplementazione nutraceutica in aggiunta ad uno stile di vita sano potrebbe essere uno strumento efficace nel supportare la funzionalità dell'organismo durante il processo di invecchiamento. Tuttavia, i meccanismi che sono alla base della biodisponibilità del coenzima Q_{10} esogeno non sono ancora stati del tutto compresi.

Come nutraceutico, il coenzima Q_{10} , in quanto lipofilico, deve essere necessariamente disciolto in una sostanza veicolante lipidica e viene tipicamente incapsulato in capsule di gelatina bovina che, una volta ingerite, si dissolvono nello stomaco in pochi minuti, rilasciando il loro contenuto. *D. Mantle et al.* (2020), suggeriscono che il transito del CoQ dallo stomaco all'intestino richieda circa 5-8h (8). Nel duodeno avviene il processo di micellizzazione, ossia la formazione di micelle che contengono al loro interno CoQ e altre sostanze liposolubili che devono essere assorbite. Gli enterociti, che rivestono i villi dell'intestino tenue, assorbono il coenzima attraverso un processo di diffusione facilitata e lo incorporano nei chilomicroni, rilasciati dalle cellule per esocitosi. I chilomicroni nel sangue sono trasportati al fegato e da qui

il coenzima Q, con l'ausilio di lipoproteine plasmatiche, viene trasportato alle cellule attraverso il plasma, prevalentemente sotto forma di ubiquinolo.

Tuttavia, è noto che il rilascio del CoQ e il conseguente assorbimento variano molto in funzione del tipo di tessuto. I trasportatori responsabili della veicolazione del Coenzima Q dall'ambiente extracellulare a quello intracellulare ad oggi non sono ancora stati identificati.

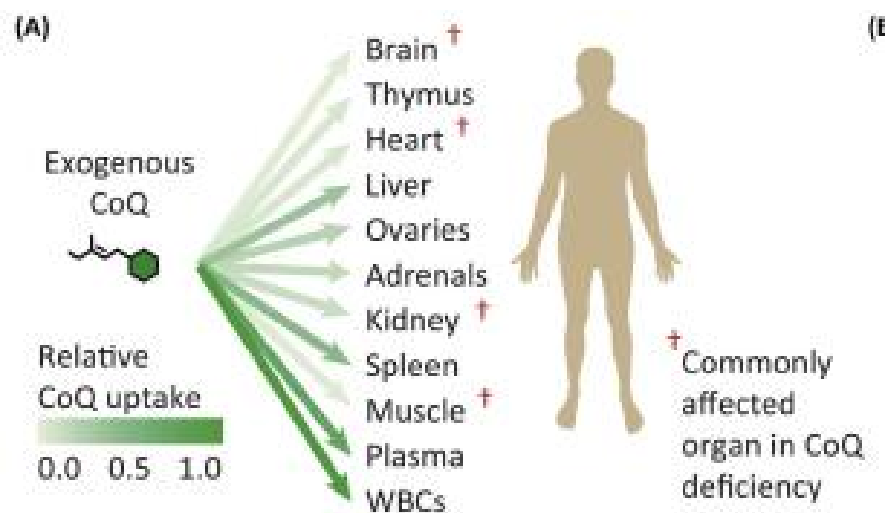


Figura 9: differenti livelli di *uptake* di CoQ esogeno (Fonte: Stefely e Pagliarini 2017).

Pertanto, sono necessari ulteriori studi finalizzati alla comprensione dei meccanismi alla base della veicolazione del CoQ dall'ambiente extracellulare a quello intracellulare, al fine di massimizzare l'*uptake* di coenzima Q₁₀ esogeno in tutti quei tessuti, come quello muscolare, in cui l'assorbimento risulta ridotto ma in cui l'integrazione di CoQ potrebbe avere un ruolo centrale nel supporto della funzionalità soprattutto durante la fase di invecchiamento.

2.6 Applicazioni cliniche

La supplementazione di coenzima Q₁₀, eventualmente in aggiunta alle terapie convenzionali, potrebbe apportare molteplici benefici atti a ridurre gli effetti avversi sulla salute di molte malattie e a supportare il processo di invecchiamento, favorendo un invecchiamento attivo e sano.

L'integrazione è necessaria in tutte quelle condizioni in cui la sintesi di CoQ è ridotta o assente. Nella pratica clinica, è possibile distinguere due diversi tipi di deficienza: la deficienza primaria e la deficienza secondaria.

2.6.1 Deficienza primaria

Il deficit primario della sintesi endogena del coenzima Q₁₀ deriva da mutazioni a carico di geni che codificano per enzimi direttamente coinvolti nel pathway biosintetico del coenzima Q e che determinano l'insorgenza di molte situazioni patologiche a carico di diversi organi come cuore, cervello e reni.

Nell'uomo, ad oggi, sono state identificate mutazioni in 9 di questi geni, ossia PDSS1 (codificante per la subunità 1 della fenil difosfato sintasi), PDSS2 (codificante per la subunità 2 della decaprenil difosfato sintasi), COQ4 (complesso multienzimatico), COQ6 (codificante per una monoossigenasi), COQ7 (codificante per la DMG idrossilasi), ADCK3 (codificante per una proteina chinasi), ADCK4 (codificante per una proteina chinasi) e COQ9 (codificante per una proteina legante i lipidi).

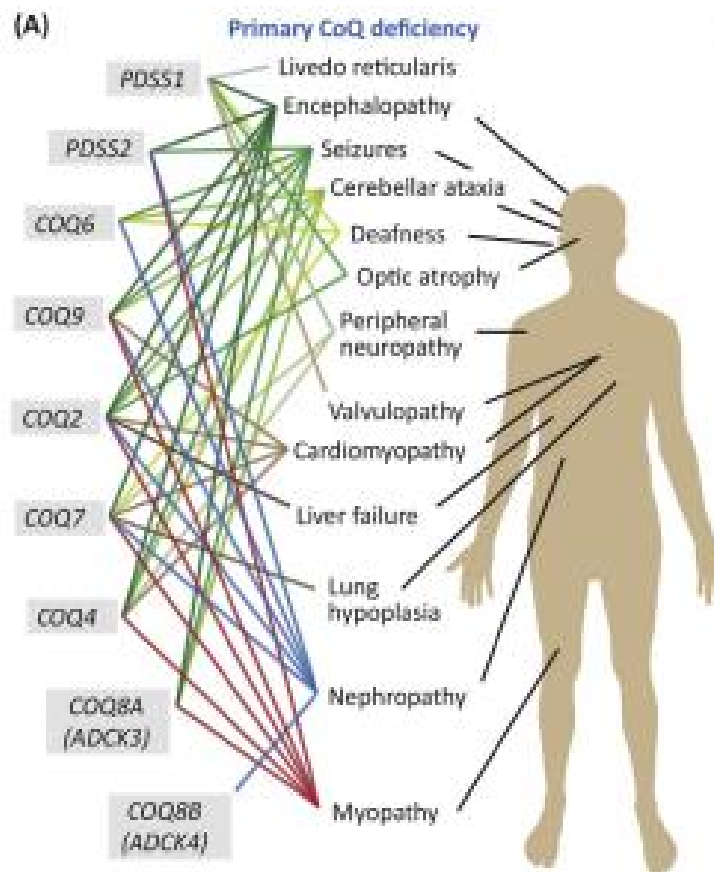


Figura 10: Network di fenotipi e geni responsabili della deficienza primaria di CoQ. (Fonte: Stefely e Pagliarini 2017).

2.6.2 Deficienza secondaria

Il deficit secondario di CoQ deriva da mutazioni e delezioni a carico del DNA mitocondriale o in geni nucleari che codificano per enzimi che non sono direttamente coinvolti nella via biosintetica del coenzima Q (ad esempio i geni ETFDH, MUT, APTX e BRAF) o da fattori non genetici associati a vari disturbi come trattamenti farmacologici con statine responsabili di effetti miopatici o malattie neurodegenerative e cardiovascolari. Nella

deficienza secondaria rientra anche la riduzione fisiologica delle concentrazioni di CoQ che si verifica durante l'invecchiamento.

In particolare, lo stress ossidativo gioca un ruolo centrale nella patogenesi di malattie cardiache che spesso affliggono la terza età come l'insufficienza cardiaca, caratterizzata da una perdita della funzione contrattile del miocardio dovuta ad uno stato di esaurimento energetico nei mitocondri e dalla riduzione dei livelli di coenzima Q. L'integrazione in questi pazienti può tradursi in un miglioramento della qualità della vita, in un potenziamento della contrattilità miocardica e, grazie alla sua potente azione antiossidante, nella prevenzione dell'ossidazione delle lipoproteine LDL con un diretto effetto anti-aterogeno.

Nei soggetti con ipertensione, il coenzima Q₁₀ contribuisce alla diminuzione della pressione sanguigna: in questi pazienti spesso si registra un'aumentata produzione di anione superossido che inattiva l'ossido nitrico, dotato di azione vasodilatatrice. Il CoQ₁₀, in virtù delle sue proprietà antiossidanti, può prevenire l'inattivazione dell'ossido nitrico con conseguente effetto ipotensivo.

Lo stress ossidativo, la disfunzione mitocondriale con metabolismo energetico anomalo, la deficienza di coenzima Q e l'aumento del danno ossidativo giocano un ruolo fondamentale anche in diverse malattie neurodegenerative che spesso riguardano l'anziano. Il CoQ₁₀, in quanto potente antiossidante e nutriente mitocondriale, sulla base di quanto riportato da *J. Garrido-Maraver et al.* (2014) può essere un promettente neuroprotettore per rallentare la progressione di malattie come il morbo di Alzheimer e il morbo di Parkinson (9).

L'integrazione di coenzima Q è un'efficiente strategia anche per rallentare la progressione di processi fisiologici come la sarcopenia, che rientra nelle forme di deficienza secondaria e che costituisce un rischio crescente per la salute pubblica a causa del progressivo invecchiamento della popolazione mondiale, in quanto è caratterizzata da una perdita graduale

di massa muscolare che determina sia una riduzione della mobilità che una perdita di resistenza allo sforzo da parte del soggetto anziano. Infatti, l'aumento della produzione di specie radicaliche e l'inefficienza dei sistemi di difesa antiossidante sembrano essere importanti fattori che contribuiscono alla compromissione muscolare.

Secondary CoQ deficiency	Genes
mtDNA mutations	APT1
mtDNA depletion	PTX1
Statin treatment	BRAF
Methylmalonic aciduria	ETFDH
Parkinson's disease	MUT
Cardiomyopathy	MUT
Aging	

Figura 11: possibili cause di deficienza secondaria di CoQ. (Fonte: Stefely e Pagliarini 2017).

Capitolo III: OBIETTIVO DELLA TESI

Secondo quanto descritto dalla letteratura scientifica, il coenzima Q₁₀ esogeno, assunto quindi come nutraceutico, potrebbe avere un ruolo chiave nel miglioramento dello stato di salute dei soggetti affetti sia da deficienza primaria che secondaria di CoQ₁₀, quest'ultima legata principalmente all'invecchiamento, alla sarcopenia, all'assunzione di statine o all'avanzamento di malattie neurodegenerative come l'Alzheimer o il Parkinson.

È altresì noto come l'*uptake* del coenzima Q₁₀ esogeno e quindi la sua biodisponibilità a livello cellulare, sia altamente influenzata dalla tipologia di formulato e dalla dose alla quale viene assunto, dalla presenza di lipoproteine plasmatiche, dalla capacità individuale di assorbirlo a livello intestinale e dai meccanismi alla base del suo trasporto, nonché del suo trasferimento da un ambiente cellulare all'altro, ancora oggi in parte sconosciuti.

In virtù di quanto appena ribadito, l'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di comparare la biodisponibilità *in vitro* di diverse isoforme di coenzima Q (coenzima Q₉ e coenzima Q₁₀) esogeno, nella forma sia ridotta (CoQH₂) che ossidata (CoQ), in tre modelli cellulari quali fibroblasti di derma umano (HuDE), cardiomioblasti di tessuto muscolare cardiaco di ratto (H9c2) e mioblasti di tessuto muscolare scheletrico di topo (C2C12), al fine di approfondire i meccanismi alla base del trasporto del coenzima Q dall'esterno all'interno e viceversa della cellula e migliorarne l'assorbimento in tessuti e organi che svolgono un ruolo chiave nel supportare l'organismo durante l'invecchiamento, come quello muscolare scheletrico.

Capitolo IV: MATERIALI E METODI

4.1 Preparazione delle aliquote di coenzima Q ossidato e ridotto

Il protocollo di preparazione del CoQ₁₀ ossidato, CoQ₁₀ ridotto e CoQ₉ ossidato, direttamente disponibili in polvere (Kaneka, Giappone), prevede lo scioglimento di 10 mg di coenzima Q in 12 ml di etanolo assoluto in una falcon a bagnomaria, alla temperatura di circa 60°C.

Sono stati quindi aggiunti 30 mg di Cremophor (emulsionante costituito da PEG-*hydrogenated castor oil*) e 18 mg di glicerolo sulla base della proporzione di 10 (Cremophor): 4 (CoQ): 6 (glicerolo) a 60°C e il campione è stato aliquotato in eppendorf conservate a -80°C, fino al momento dell'uso.

La forma ridotta del coenzima Q₉, non essendo disponibile direttamente in polvere come le altre, è stata ottenuta dalla sua forma ossidata attraverso uno step di riduzione.

Al CoQ₉ ossidato disciolto in etanolo, nelle proporzioni descritte precedentemente, è stata aggiunta una miscela composta da 2,4 ml di acqua milliQ e sodio boroidruro (circa 1/3 di spatola) necessario per ottenere la riduzione del CoQ₉ ossidato, e quindi 4,8 ml di esano per il recupero della frazione di interesse, rispettivamente alla proporzione di 0,5 (acqua):1 (esano):2,5 (Etanolo). Trascorsi 15 minuti per la separazione di fase, l'esano è stato fatto evaporare mediante un flusso d'azoto sotto cappa chimica.

Come per il CoQ₁₀ ossidato, il CoQ₁₀ ridotto e il CoQ₉ ossidato, anche al CoQ₉ ridotto ottenuto sono stati aggiunti Cremophor e glicerolo nelle stesse proporzioni precedenti a circa 60°C e il campione è stato infine aliquotato in eppendorf conservate a -80°C.

La concentrazione finale delle madri di coenzima Q₁₀, ossidato e ridotto erano rispettivamente di 1,1 mg/mL e 8,7 mg/mL e di coenzima Q₉, ossidato e ridotto erano invece rispettivamente di 1 mg/mL e 0,9 mg/mL.

Precedentemente alla supplementazione delle cellule, la concentrazione delle madri è stata valutata e verificata analiticamente tramite analisi cromatografica (HPLC).

4.2 Colture cellulari

4.2.1 Specifiche di mantenimento e semina delle linee cellulari

I fibroblasti di derma umano (HuDE) sono stati acquistati dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (Brescia) e provengono da un pool di campioni appartenenti a soggetti femminili. Sono stati coltivati in MEM (*Minimum Essential Medium*) supplementato con il 10% di siero fetale bovino (FBS), 1% di penicillina (10000 U/mL) e streptomina (10 mg/mL), 1% di glutammina (100 U/mL) e 1% di amfotericina in condizioni di atmosfera umidificata al 5% di CO₂ a 37°C.

I cardiomioblasti (H9c2) e i mioblasti (C2C12) sono stati acquistati presso l'American Type Culture Collection (ATCC) e sono stati invece coltivati in DMEM-HG (*Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose*) contenente 4500 mg/L di glucosio supplementato con

il 10% di siero fetale bovino (FBS), inattivato mediante il calore (56°C per almeno 30 minuti), 1% di penicillina (10000 U/mL) e streptomicina (10 mg/mL) e 1% di glutammina (100 U/mL) in condizioni di atmosfera umidificata al 5% di CO₂ a 37°C.

4.2.2 Trattamento con coenzima Q esogeno delle linee cellulari

Le colture cellulari sono state coltivate in fiasche di mantenimento sterili da 25 o 75 cm² con una densità di semina tra 1*10⁵ e 5*10⁵. Al raggiungimento del 90% di confluenza, le cellule sono state staccate e seminate in piastre multiwell con una densità di semina compresa tra 5*10⁴ e 1*10⁵ e supplementate, al raggiungimento dello stesso grado di confluenza, con coenzima Q₉ o coenzima Q₁₀, nelle forme ossidate o ridotte, aggiunti al mezzo di coltura per 24 ore alle seguenti concentrazioni: 0,6 µg/ml, 1,2 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml e 10 µg/ml. È stata dapprima preparata la condizione di 10 µg/ml e poi sono state effettuate delle diluizioni seriali fino alla concentrazione di 0,6 µg/ml, come riportato nella seguente tabella.

	10 µg/ml (condizione 1)	5 µg/ml (condizione 2)	2,5 µg/ml (condizione 3)	1,2 µg/ml (condizione 4)	0,6 µg/ml (condizione 5)
CoQ ₉ ridotto [stock 0,9 mg/mL]	66 µL CoQ ₉ ridotto + 5,934 mL di mezzo di coltura completo	3 mL condizione 1 + 3 mL di mezzo di coltura completo	3 mL condizione 2 + 3 mL di mezzo di coltura completo	3 mL condizione 3 + 3 mL di mezzo di coltura completo	3 mL condizione 4 + 3 mL di mezzo di coltura completo

CoQ ₉ ossidato [stock 1 mg/mL]	60 µL CoQ ₉ ossidato + 5,940 mL di mezzo di coltura completo	3 mL condizione 1 + 3 mL di mezzo di coltura completo	3 mL condizione 2 + 3 mL di mezzo di coltura completo	3 mL condizione 3 + 3 mL di mezzo di coltura completo	3 mL condizione 4 + 3 mL di mezzo di coltura completo
CoQ ₁₀ ridotto [stock 8,7 mg/mL] Pre-diluizione di 87 volte -> 11,5 µL in 988,5 mL	600 µL della pre-diluizione + 5,400 mL di mezzo di coltura completo	3 mL condizione 1 + 3 mL di mezzo di coltura completo	3 mL condizione 2 + 3 mL di mezzo di coltura completo	3 mL condizione 3 + 3 mL di mezzo di coltura completo	3 mL condizione 4 + 3 mL di mezzo di coltura completo
CoQ ₁₀ ossidato [stock 1,1 mg/mL]	54 µL CoQ ₁₀ ossidato + 5,946 mL di mezzo di coltura completo	3 mL condizione 1 + 3 mL di mezzo di coltura completo	3 mL condizione 2 + 3 mL di mezzo di coltura completo	3 mL condizione 3 + 3 mL di mezzo di coltura completo	3 mL condizione 4 + 3 mL di mezzo di coltura completo

Alle cellule di controllo, non trattate quindi con il coenzima Q, è stato aggiunto solo il veicolante nel quale è stato sciolto, ossia Cremophor + glicerolo, alla stessa concentrazione presente nel 10 µg/ml.

Al termine dell'incubazione, le cellule di ciascuna condizione sono state staccate mediante l'utilizzo di tripsina-EDTA scaldata a 37°C, lasciata agire per 5-7 minuti e successivamente neutralizzata mediante l'impiego di mezzo di coltura completo, secondo il rapporto di 1:3. Le cellule sono state poi raccolte in eppendorf e centrifugate a 500 g per 5 minuti a temperatura ambiente. Il pellet è stato risospeso in 100 µl di tampone fosfato salino (PBS) e diviso in due aliquote: 50 µl di sospensione cellulare sono stati destinati all'analisi in *high performance liquid chromatography* (HPLC) e 50 µl di pellet cellulare (500 g per 5 minuti)

alla quantificazione delle proteine mediante la metodica del *Bicinchoninic acid assay* (BCA assay). Le aliquote sono state successivamente conservate a -80°C fino al momento delle analisi.

4.3 Quantificazione delle isoforme di coenzima Q mediante HPLC-ECD

La quantificazione delle isoforme di coenzima Q, a livello cellulare, è stata eseguita mediante l'impiego di un *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) con rivelatore elettrochimico (ECD).

La sospensione cellulare (50 μL), preservata a -80°C , è stata velocemente scongelata a temperatura ambiente e addizionata di propanolo (250 μL) che è in grado di estrarre le molecole lipofile dalle cellule e di indurre la precipitazione delle proteine. Dopo aver vortexato per circa 1 minuto per favorire l'estrazione del coenzima Q, il campione è stato sottoposto a centrifugazione a 20.900 g per 2 minuti a 4°C . Infine, 40 μL di surnatante sono stati iniettati all'HPLC-ECD ed è stata avviata la corsa cromatografica

Il sistema cromatografico utilizzato è dotato di un detector elettrochimico (ECD) Shiseido Co.Ltd 3005, di due pompe Shiseido-M 3201, di un campionatore automatico refrigerato Shiseido-M 3023 e di una valvola switch Shiseido-M 3012. La peculiarità risiede nell'utilizzo di 3 colonne cromatografiche: una colonna concentrante Capcel I Pack C8 DD che permette di concentrare l'analita rendendolo più facilmente rilevabile, una colonna analitica Capcel I Pack C18 AQ (150 mm x 2.6 mm I.D.) che separa le molecole di interesse in virtù delle loro caratteristiche chimico-fisiche, e una colonna riducente (CQ; 20 mm x 2.0 mm I.D)

che ha la funzione di ridurre le forme ossidate del coenzima Q₉ e coenzima Q₁₀ presenti nel campione. In questo modo il detector, con un potenziale elettrochimico di 650 mV è in grado di rilevare solo le forme ridotte delle molecole, discriminando i due stati ossidativi del coenzima Q separati attraverso la colonna analitica.

Il campione raggiunge la colonna analitica tramite l'impiego di due fasi mobili con le seguenti caratteristiche:

1. Fase mobile 1 [50 mM Sodio Perclorato in Metanolo/Acqua distillata (95/5, v/v) con un flusso di 80 μ L/min] necessaria per caricare e trasportare il campione nella colonna concentrante;
2. Fase mobile 2 [50 mM Sodio Perclorato in Metanolo/Isopropanolo (70/30, v/v) con un flusso di 240 μ L/min] che trasporta il campione dalla colonna concentrante a quella analitica.

Una singola corsa cromatografica presenta una durata pari a 36 minuti. I tempi di ritenzione sono i seguenti:

- Q₉ ridotto = 20,3 minuti
- Q₁₀ ridotto = 23 minuti
- Q₉ ossidato = 24,8 minuti
- Q₁₀ ossidato = 30,4 minuti

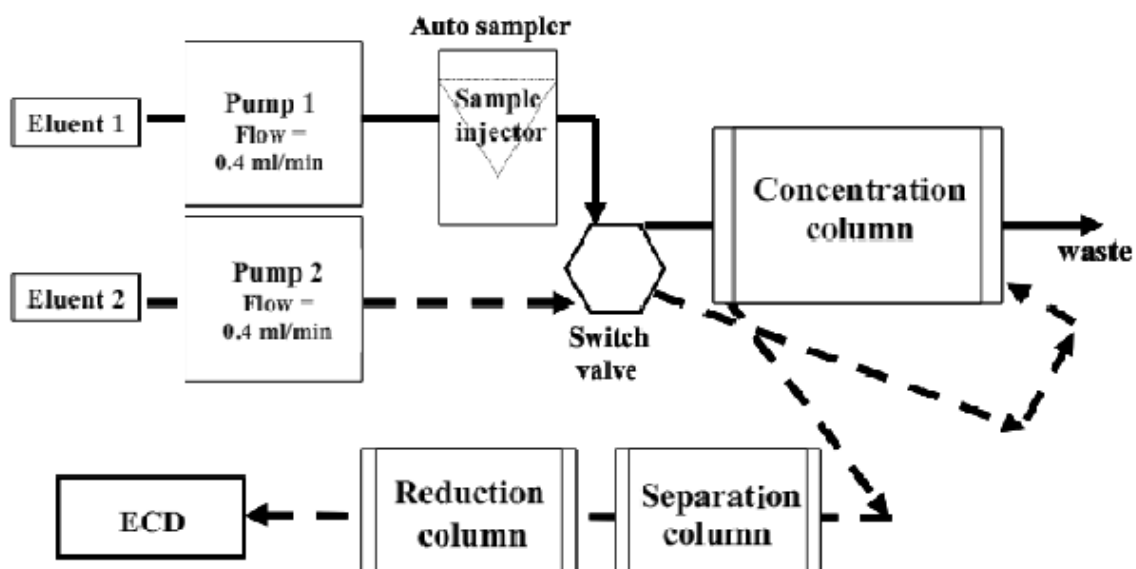


Figura 12: schema di funzionamneto del sistema HPLC-ECD.

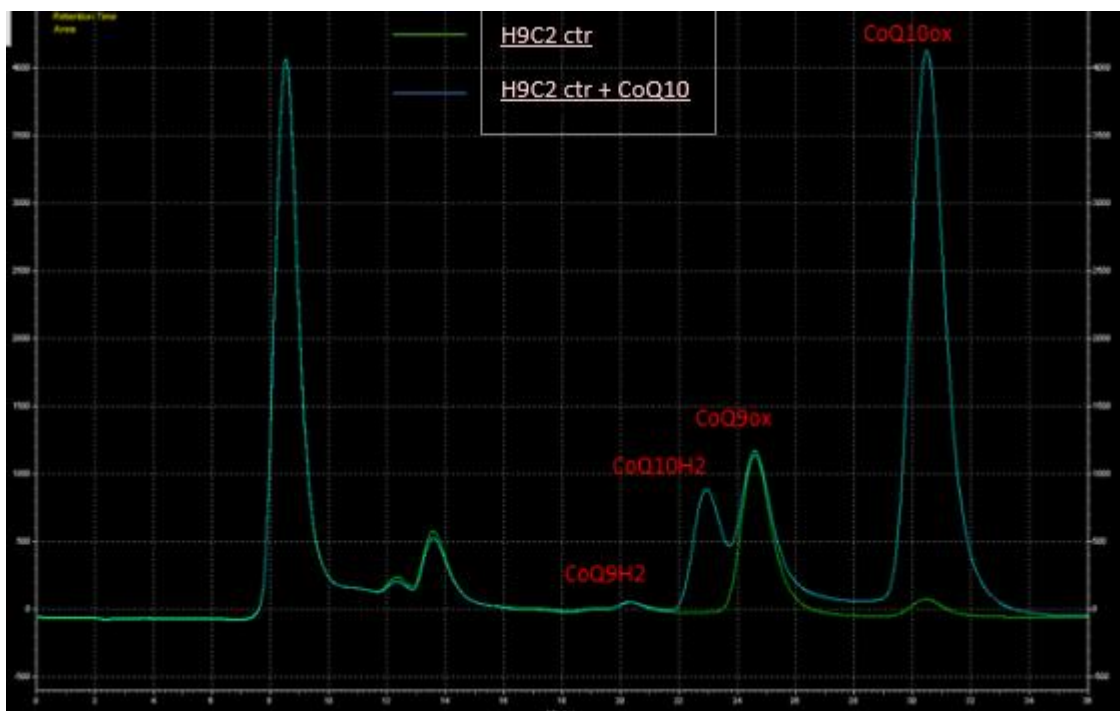


Figura 13: esempio di cromatogramma ottenuto in seguito all'analisi HPLC di un campione di sospensione cellulare di cellule H9c2.

4.4 Quantificazione della concentrazione delle proteine cellulari tramite BCA assay

Il metodo dell'acido bicinconinico (BCA assay) è uno dei metodi colorimetrici utilizzati per la determinazione della concentrazione delle proteine in campioni biologici: il suo impiego nello studio di biodisponibilità delle diverse isoforme di CoQ risulta indispensabile per ottenere una comparazione accurata e precisa dei livelli di *uptake* del Coenzima nei diversi tipi cellulari, in quanto consente di normalizzare i livelli di Q in funzione del contenuto cellulare, espresso in termini di proteine. Il contenuto finale viene infatti riportato come μg di Coenzima Q/mg di proteine.

Questo metodo combina la riduzione da Cu^{2+} a Cu^+ da parte delle proteine in ambiente alcalino con il rilevamento colorimetrico sensibile e selettivo del catione rameoso, impiegando un unico reagente contenente acido bicinconinico.

Il prodotto che si ottiene di colore viola è dato dalla chelazione di due molecole di acido bicinconinico con uno ione rameoso e mostra un forte assorbimento a 562 nm che è quasi lineare a concentrazioni proteiche crescenti in un ampio intervallo di lavoro (20-2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Le concentrazioni proteiche incognite sono determinate sulla base di una curva standard allestita utilizzando l'albumina sierica bovina (BSA) che funge da proteina di riferimento: sono state preparate una serie di diluizioni a concentrazione nota della BSA analizzate insieme ai campioni incogniti e sulla base delle quali è stato possibile risalire alle concentrazioni dei campioni di interesse.

I pellet cellulari, conservati a -80°C , sono stati scongelati a temperatura ambiente e risospesi in 10 μL di tampone di lisi (Radioimmunoprecipitation buffer/RIPA con inibitore

delle proteasi), vortexati per 30 secondi e sottoposti a centrifugazione a 13.000 g per 5 minuti a 4°C.

Il surnatante di ciascun campione è stato diluito 10 volte in acqua deionizzata e trasferito in una microplate well (25 µL). In ciascun pozzetto sono stati quindi addizionati 200 µL del Working Reagent (Thermo Scientific), ottenuto mescolando 50 parti del BCA Reagent A con 1 parte del BCA Reagent B (50:1, Reagent A:B). Dopo aver incubato la microplate a 37 °C per 30 minuti ed aver fatto raffreddare per altri 10 minuti a temperatura ambiente, è stata letta l'assorbanza a 562 nm al lettore di piastre (Biotek).

4.5 Analisi statistica

Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato sperimentale e in duplicato tecnico. I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il test statistico One-way ANOVA utilizzando il *software Graphpad* (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) e sono stati rappresentati come istogrammi che illustrano la media ± deviazione standard (media ± DS). Le significatività delle variazioni tra i campioni sono state riportate come segue: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Capitolo V: RISULTATI

Al fine di approfondire i meccanismi che regolano l'ingresso del coenzima Q all'interno della cellula, la biodisponibilità *in vitro* è stata valutata in funzione dei seguenti aspetti:

- Stato ossidativo del coenzima Q: ossidato *vs* ridotto;
- Lunghezza della catena isoprenoide: CoQ₉ *vs* CoQ₁₀;
- Modello cellulare: HuDE *vs* H9c2 *vs* C2C12.

La quantificazione del Coenzima Q a livello cellulare è stata eseguita mediante un sistema di cromatografia liquida ad alta prestazione provvisto di detector elettrochimico. Le concentrazioni totali di coenzima Q₉ e coenzima Q₁₀ sono state espresse come µg di coenzima normalizzati su mg di proteine cellulari, quantificati mediante il saggio della BCA.

I livelli cellulari di coenzima Q sono stati misurati dopo aver supplementato le cellule *in vitro* per 24h a 37°C con concentrazioni crescenti di CoQ₉ e CoQ₁₀, nella forma ossidata o ridotta, pari a 0,6-1,2-2,5-5-10 µg/mL. Le cellule di controllo sono state trattate solo con il veicolante nel quale sono state disciolte in fase di preparazione (cremophor + glicerolo) le varie molecole, ad una concentrazione paragonabile a quella presente nel 10 µg/mL di coenzima Q.

5.1 Ruolo dello stato ossidativo del CoQ

Il **grafico 1** descrive l'uptake di coenzima Q esogeno in seguito a supplementazione con dosi crescenti di CoQ₉ e CoQ₁₀ nelle forme ossidate e ridotte, in cellule di fibroblasti di derma umano. I dati illustrati mettono subito in rilievo come la supplementazione con le forme ridotte di entrambi i coenzimi risulti nettamente più biodisponibile rispetto alla forma ossidata. In entrambi i casi è stato osservato un aumento dose dipendente dell'*uptake* di coenzima Q, che risulta altamente significativo già a partire da 0,6 µg/mL (**p<0,01), rispetto alla biodisponibilità della forma ossidata alla stessa concentrazione. Diversamente dalla forma ridotta del coenzima Q₉, che alla massima concentrazione somministrata (10 µg/mL) ha determinato un aumento dei livelli cellulari di coenzima pari a 24 volte la concentrazione del campione di controllo, alla medesima concentrazione, quella ridotta del coenzima Q₁₀ è risultata molto più biodisponibile determinando un aumento di 49 volte (da 0,01 µg/mg del Ctr (0) a 0,49 µg/mg).

Contrariamente alle forme ridotte, l'*uptake* delle forme ossidate è risultata molto limitata e indipendentemente dall'isoforma utilizzata per il trattamento, non è stato osservato nessun aumento significativo.

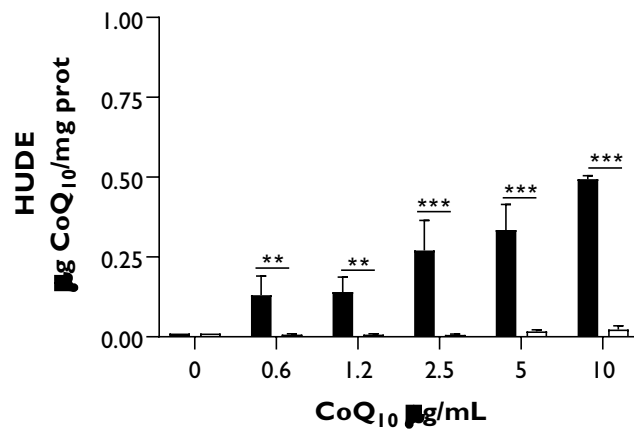
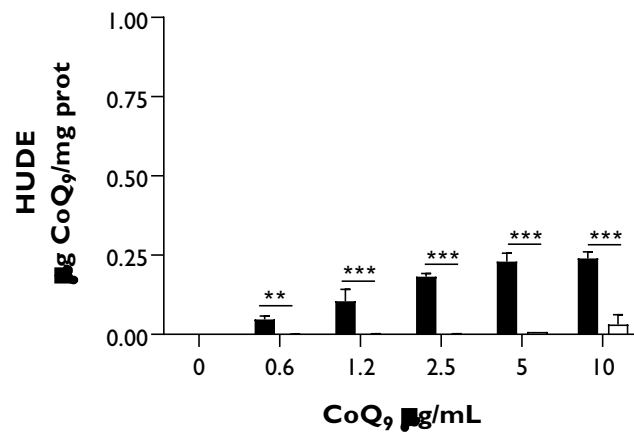


Grafico 1. Livelli cellulari totali di coenzima Q₉ (sopra) e Q₁₀ (sotto) in fibroblasti di derma umano (HuDE), espressi come µg di coenzima Q₉-Q₁₀/mg di proteine cellulari, valutati in seguito a supplementazione per 24 h a 37°C con una scala di concentrazioni di 0,6-1,2 -2,5-5-10 µg/mL, nella forma ridotta (barre nere) e nella forma ossidata (barre bianche). Dati espressi come media ± DS. **p<0,01; ***p<0,001

I cardiomioblasti di tessuto muscolare cardiaco di ratto hanno mostrato lo stesso andamento di biodisponibilità dei fibroblasti umani (**grafico 2**). Infatti, anche in questo modello cellulare le forme ridotte sono risultate più biodisponibili di quelle ossidate raggiungendo, diversamente dai fibroblasti, un contenuto cellulare maggiore in corrispondenza della concentrazione più alta

somministrata (da 0,06 $\mu\text{g}/\text{mg}$ del Ctr (0) a 0,74 $\mu\text{g}/\text{mg}$), in particolare nel caso del coenzima Q₉ ridotto. I dati illustrati sottolineano inoltre, come nonostante la forma di coenzima Q principalmente presente nelle cellule murine sia il Q₉, il coenzima Q₁₀ ridotto risulti molto più biodisponibile già a partire da 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0,17 $\mu\text{g}/\text{mg}$ per il CoQ₉H₂ rispetto a 0,29 $\mu\text{g}/\text{mg}$ per il CoQ₁₀H₂), con un'inversione di tendenza solo in corrispondenza della concentrazione più alta (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

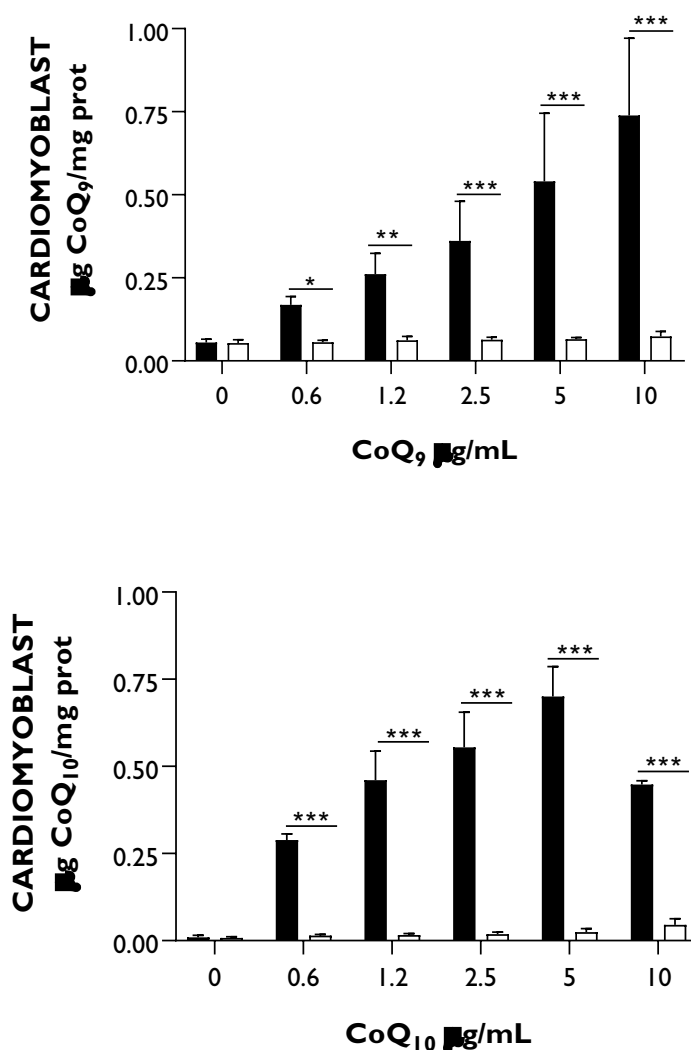


Grafico 2. Livelli cellulari totali di coenzima Q₉ (sopra) e Q₁₀ (sotto) in cardiomioblasti di ratto (H9c2), espressi come μg di coenzima Q₉-Q₁₀/mg di proteine cellulari, valutati in seguito a

supplementazione per 24 h a 37°C con una scala di concentrazioni di 0,6-1,2 -2,5-5-10 µg/mL, nella forma ridotta (barre nere) e nella forma ossidata (barre bianche). Dati espressi come media ± DS. *P<0,1; **p<0,01; ***p<0,001

Parallelamente ai fibroblasti e ai cardiomioblasti, anche nei mioblasti di tessuto muscolare scheletrico di topo (C2C12), i dati illustrati nel **grafico 3** mostrano come le forme ridotte siano sempre più biodisponibili di quelle ossidate, diversamente dagli altri modelli con aumenti significativi solo a partire da 1,2 µg/ml (*p<0,05). I dati raccolti hanno messo inoltre in evidenza come gli aumenti dei livelli cellulari, già a partire dalle concentrazioni più basse somministrate alle cellule, siano molto minori rispetto sia ai fibroblasti che ai cardiomioblasti, per entrambi i coenzimi impiegati nello studio. Infatti, in corrispondenza di 0,6 µg/mL di CoQ₉H₂ e di CoQ₁₀H₂ supplementati, il contenuto cellulare di coenzima Q totale raggiunto nei mioblasti è stato rispettivamente di 0,09 µg/mg e 0,03 µg/mg di proteine, contro i 0,17 µg/mg e i 0,29 µg/mg di proteine dei cardiomioblasti e i 0,06 µg/mg e i 0,13 µg/mg di proteine dei fibroblasti.

Anche per questo modello cellulare, l'assorbimento delle forme ossidate di entrambi i coenzimi si è dimostrato limitato e non significativo a tutte le concentrazioni testate.

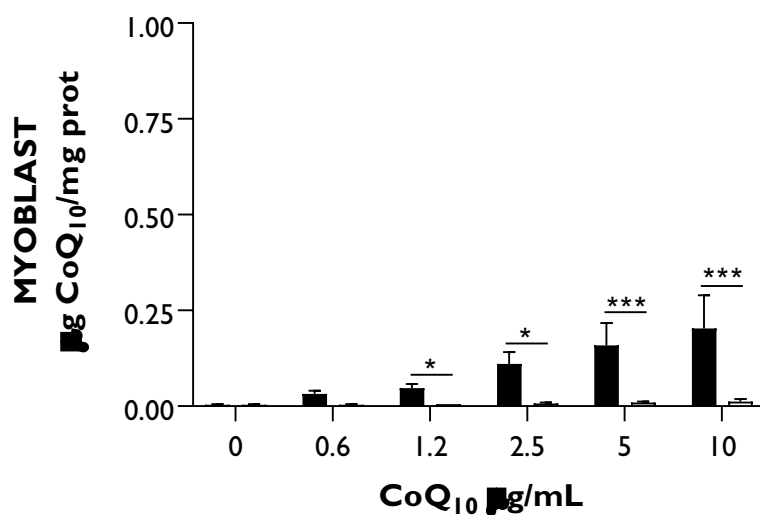
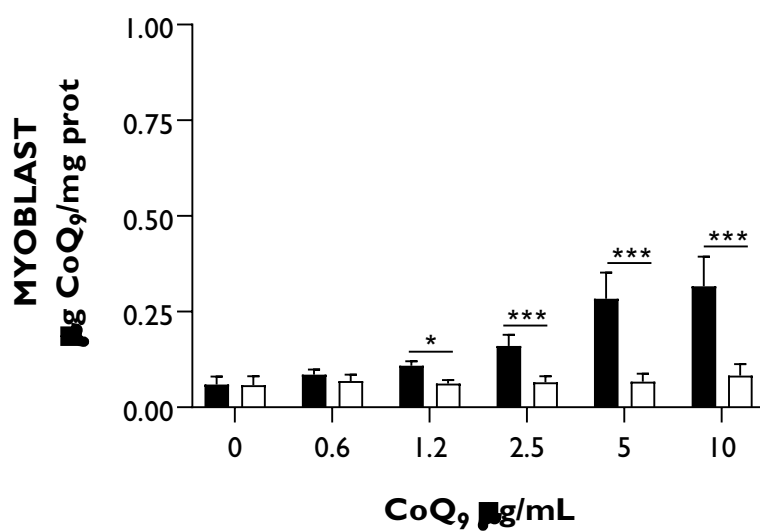


Grafico 3. Livelli cellulari totali di coenzima Q₉ (sopra) e Q₁₀ (sotto) normalizzati per il contenuto di proteine (µg di coenzima Q₉-Q₁₀/mg di proteine cellulari) in cellule di mioblasti di tessuto muscolare scheletrico di topo in seguito a supplementazione per 24h a 37°C con una scala di concentrazioni di 0,6-1,2-2,5-5-10 µg/mL nella forma ridotta (barre nere) e nella forma ossidata (barre bianche). Dati espressi come media ± DS. *p<0.05, ***p<0,001.

L'analisi dei dati, relativi all'assorbimento del coenzima Q in funzione del suo stato ossidativo, ha messo in evidenza come in tutti e tre i modelli cellulari impiegati nello studio, la forma ridotta sia del coenzima Q₉ che del coenzima Q₁₀, sia significativamente più biodisponibile della rispettiva forma ossidata, in corrispondenza di tutte le concentrazioni utilizzate in fase di supplementazione.

In particolare, la forma ridotta del coenzima Q₁₀ sembra indurre incrementi dei livelli cellulari totali superiori a quelli indotti dall'altra isoforma, anche nei cardiomioblasti e nei mioblasti dove il coenzima Q₉ risulta essere la forma principalmente presente.

5.2 Ruolo delle isoforme di coenzima Q

Dopo aver osservato che la forma ridotta è assorbita in modo più efficiente rispetto a quella ossidata in tutti i modelli cellulari utilizzati nello studio, sono stati messi a confronto i livelli cellulari di coenzima Q totali, espressi come percentuale di variazione dei µg di CoQ/mg di proteine, in seguito a trattamento con solo le forme ridotte del coenzima Q₉ e del coenzima Q₁₀.

I dati illustrati nel **grafico 4**, che descrivono la variazione percentuale dei livelli totali di coenzima Q nei cardiomioblasti, in seguito a supplementazione con le sole forme ridotte, hanno messo in evidenza in entrambi i casi un aumento dose dipendente che è risultato però significativamente più alto (*p<0,05) in seguito a trattamento con il coenzima Q₁₀ ridotto, ad eccezione della massima concentrazione dove non sono state riscontrate differenze significative tra i due coenzimi.

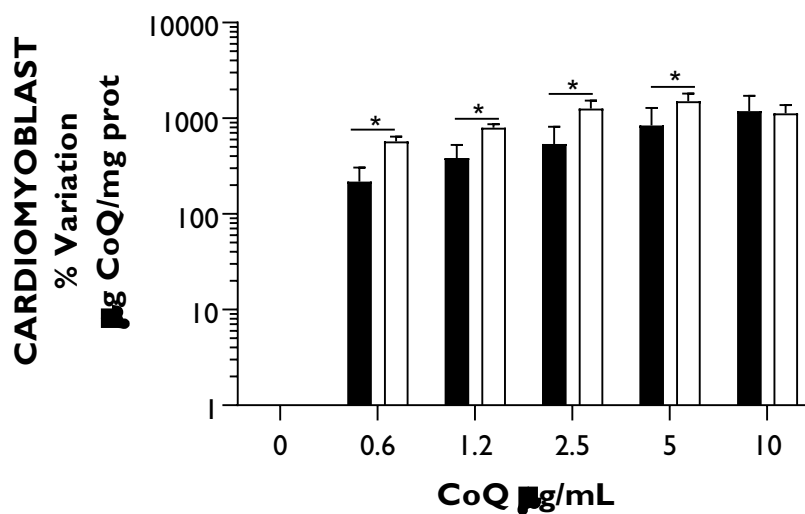
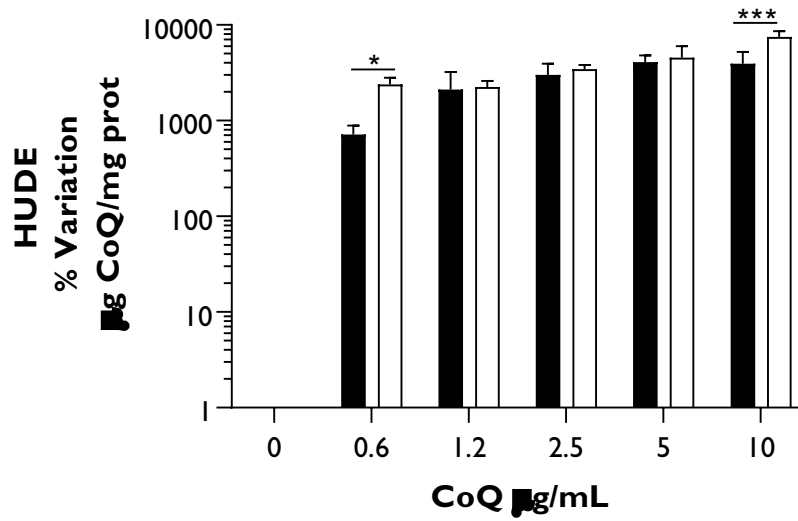


Grafico 4. Variazione percentuale dei livelli totali di coenzima Q cellulari nei cardiomioblasti di muscolo cardiaco di ratto, espressi come μg di coenzima Q/mg di proteine cellulari, in seguito a supplementazione per 24 h a 37°C con una scala di concentrazioni di 0,6-1,2-2,5-5-10 $\mu\text{g/mL}$ di CoQ₉ ridotto (barre nere) e CoQ₁₀ ridotto (barre bianche). Dati espressi come media \pm DS. * $p < 0,05$.

Parallelamente ai cardiomioblasti, anche nei fibroblasti di derma umano (**grafico 5 A**) e nei mioblasti di muscolo scheletrico murino (**grafico 5 B**), è stato osservato un andamento dose dipendente dell'*uptake* delle due forme ridotte, ma quella del coenzima Q₁₀ è risultata significativamente più alta, rispettivamente alla minima (* $p < 0,05$) e alla massima concentrazione somministrata (** $p < 0,001$; * $p < 0,05$) e per i mioblasti anche a 1,2 $\mu\text{g/mL}$ (* $p < 0,05$).

A



B

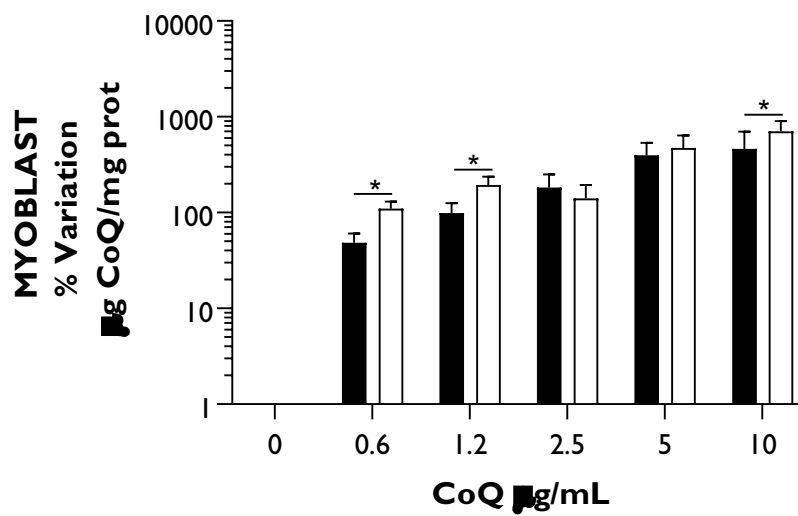


Grafico 5. Variazione percentuale dei livelli totali di coenzima Q cellulari nei fibroblasti di derma umano (A) e nei mioblasti di muscolo cardiaco di topo (B), espressi come µg di coenzima Q/mg di proteine cellulari, in seguito a supplementazione per 24 h a 37°C con una scala di concentrazioni di 0,6-1,2-2,5-5-10 µg/mL di CoQ₉ ridotto (barre nere) e CoQ₁₀ ridotto (barre bianche). Dati espressi come media ± DS. *p<0,05; ***p<0,001.

I dati relativi alla variazione percentuale dei livelli cellulari di coenzima Q totale in seguito a supplementazione con le forme ridotte di coenzima Q₉ e Q₁₀, hanno messo in evidenza come gli incrementi, alle dosi utilizzate nello studio, siano stati significativamente più alti in seguito alla somministrazione con coenzima Q₁₀ ridotto, in tutti e tre i modelli cellulari oggetto di studio. Inoltre, la valutazione dell'*uptake* in termini di variazione percentuale rispetto al proprio campione di controllo ha fatto emergere come i fibroblasti rappresentino il modello cellulare caratterizzato da un assorbimento significativamente maggiore di CoQ esogeno, confermando invece la maggiore refrattarietà delle cellule di muscolo scheletrico.

5.3 Ruolo del modello cellulare

Al fine di verificare quale fosse il modello cellulare oggetto di studio caratterizzato da una maggiore capacità di assorbire le forme ridotte dei due coenzimi, è stata analizzata la variazione percentuale dei livelli cellulari totali di coenzima, espressi come µg di coenzima Q/mg di proteine, in seguito a supplementazione con un'unica concentrazione della molecola, ossia 5 µg/ml.

Come mostrato nel **grafico 6**, entrambe le forme ridotte del coenzima Q₉ e del coenzima Q₁₀ hanno fatto registrare un aumento significativamente maggiore nei fibroblasti di derma umano (4103%; 5172%; ###p<0,001), rispetto sia ai cardiomioblasti di muscolo cardiaco (997%; 1507%) che ai mioblasti di muscolo scheletrico (396%; 379%). In quest'ultimi inoltre, l'*uptake* di coenzima Q₁₀ ridotto, è risultato significativamente (*p<0,05) più basso rispetto a

quello registrato nei cardiomioblasti, sottolineando nuovamente la minore propensione delle cellule di muscolo scheletrico ad assorbire il coenzima Q esogeno.

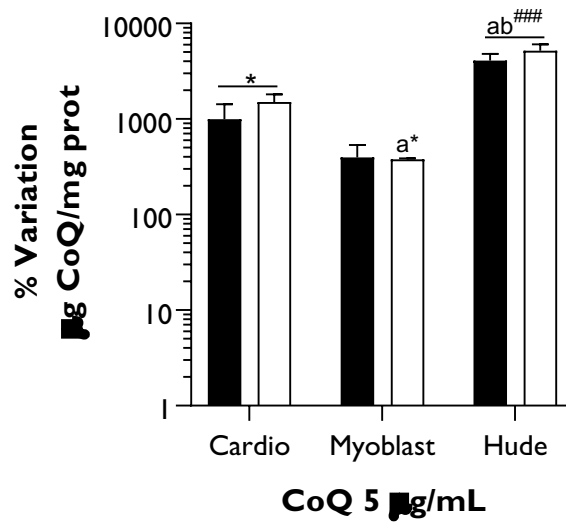


Grafico 6. Variazione percentuale dei livelli totali di coenzima Q cellulari nei cardiomioblasti di muscolo cardiaco di ratto, nei mioblasti di muscolo cardiaco di topo e nei fibroblasti di derma umano, espressi come µg di coenzima Q/mg proteine cellulari, in seguito a supplementazione per 24 h a 37°C con 5 µg/mL di CoQ₉ ridotto (barre nere) e CoQ₁₀ ridotto (barre bianche). Dati espressi come media ± DS. *p<0,05; ###p<0,001 a: cardiomioblasti; b: mioblasti.

Capitolo VI: DISCUSSIONE

L'invecchiamento demografico è un fenomeno tanto rilevante quanto diffuso nelle nostre società. Negli anni 2000 nel mondo si contavano circa 600 milioni di persone con più di 60 anni di età, nel 2025 si stima che verrà raggiunta la soglia di 1,2 miliardi con un andamento destinato a crescere fino a raggiungere i 2 miliardi nel 2050¹.

Tuttavia, se la longevità è di per sé un elemento positivo, è scientificamente evidente che l'aumento della durata della vita predisponga ad un maggior rischio di problematiche legate all'invecchiamento, ossia all'insorgenza di patologie croniche e degenerative, che con l'avanzare dell'età possono portare ad una drastica riduzione dell'autosufficienza e della qualità della vita nei soggetti anziani, contribuendo significativamente ad aumentare i costi di gestione all'interno delle famiglie prima e a carico del sistema sanitario dopo (10).

Negli ultimi decenni i Paesi industrializzati, hanno orientato la loro politica verso l'adozione di misure preventive atte a favorire un “**invecchiamento attivo**”, ponendo particolare attenzione al sostegno del benessere fisico e mentale delle persone che invecchiano, al fine di garantire e supportare quanto più possibile un invecchiamento di successo. Secondo *L. Partridge et al.* (2018), all'interno della sfera della salute, tra le possibili strategie per fronteggiare le sfide globali legate all'invecchiamento attivo, rientra la promozione di uno stile di vita sano basato su un'alimentazione bilanciata ed orientata alla restrizione calorica,

1. ¹ *Invecchiare è un privilegio e una meta della società*, EpiCentro – Istituto superiore di Sanità, <https://www.epicentro.iss.it/>

l'abolizione del fumo, il ridotto consumo di alcol e la pratica di attività fisica moderata e costante (11). Inoltre, l'assunzione di sostanze nutraceutiche, con un comprovato beneficio fisiologico, ha dimostrato di contribuire significativamente al benessere dell'organismo, soprattutto durante le prime fasi dell'invecchiamento (12, 13, 14).

Tra le molecole nutraceutiche scientificamente riconosciute per avere un ruolo chiave nel preservare il buon funzionamento dell'organismo, soprattutto durante le prime fasi dell'invecchiamento, c'è anche il coenzima Q (CoQ), un cofattore lipofilico endogeno, localizzato a livello di tutte le membrane biologiche, in quanto possiede sia un'azione antiossidante che bioenergetica e soprattutto all'interno della centrale energetica della cellula, ossia il mitocondrio (15, 16, 17). Il coenzima Q è costituito da un anello benzoico legato ad una catena laterale isoprenoide, la cui lunghezza varia nelle diverse specie esistenti. Nell'uomo l'isoforma maggiormente presente è quella con 10 unità isoprenoidi (CoQ₁₀), mentre negli animali murini (ratti e topi) quella con 9 unità (CoQ₉).

Considerato il ruolo centrale all'interno della cellula e in particolare a livello del mitocondrio, non sorprende che la deficienza di coenzima Q sia associata alla patogenesi di diversi disturbi (18, 19). È noto infatti in letteratura che la biosintesi endogena di questa molecola subisca una drastica riduzione in condizioni fisiologiche a partire dai 20 anni di età o in presenza di condizioni patologiche età-correlate come malattie cardiovascolari, morbo di Alzheimer e di Parkinson e sarcopenia (20, 21, 22). La deficienza di coenzima Q₁₀ viene distinta in primaria e secondaria. La primaria si manifesta in seguito alla presenza di difetti genetici che determinano a valle alterazioni nel processo biochimico di sintesi del CoQ₁₀, mentre quella secondaria può verificarsi come conseguenza di altre malattie croniche o in seguito a processi fisiologici naturali come l'invecchiamento (23, 24, 25, 26).

Pertanto, la supplementazione con coenzima Q₁₀, abbinata ad uno stile di vita sano e attivo, potrebbe rappresentare una valida strategia per contribuire al mantenimento del buon funzionamento dell'organismo durante l'avanzare dell'età, promuovendo un invecchiamento di successo.

Alla luce di tutte queste evidenze, l'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di confrontare la biodisponibilità *in vitro* di diverse isoforme di coenzima Q (coenzima Q₉ e coenzima Q₁₀) esogeno, nella forma sia ridotta (CoQH₂) che ossidata (CoQ), in tre modelli cellulari quali fibroblasti di derma umano (HuDE), cardiomioblasti di tessuto muscolare cardiaco di ratto (H9c2) e mioblasti di tessuto muscolare scheletrico di topo (C2C12), al fine di approfondire le conoscenze alla base dei meccanismi che mediano l'assorbimento di CoQ dall'ambiente extracellulare a quello intracellulare e viceversa. L'approfondimento della conoscenza di tali meccanismi infatti potrebbe costituire una valida strategia per migliorare l'assorbimento del coenzima Q esogeno a livello di tutti i tessuti, in particolare a carico di quelli particolarmente coinvolti nel processo di invecchiamento come il muscolo scheletrico, il cuore e il cervello, il cui corretto funzionamento è alla base di un invecchiamento di successo e di un miglioramento della qualità della vita, soprattutto nell'età più avanzata.

In tal senso, il coenzima Q in virtù delle sue caratteristiche antiossidanti e bioenergetiche, potrebbe fornire un valido contributo a sostegno della fisiologia di tutti i tessuti e gli organi dell'organismo (27).

Tutti e tre i modelli cellulari oggetto di studio sono stati incubati *in vitro* per 24h a 37°C con una scala di concentrazione di CoQ₉ o CoQ₁₀ pari a 0,6-1,2-2,5-5-10 µg/mL, nella forma ossidata (CoQ) o in quella ridotta (CoQH₂), considerando che alcuni studi di supplementazione *in vivo* con coenzima Q hanno mostrato incrementi dei livelli plasmatici totali fino a 5 µg/ml (28).

La quantificazione del contenuto totale di coenzima Q cellulare è stata effettuata mediante cromatografia liquida ad alta prestazione con detector elettrochimico (HPLC-ECD) e i valori ottenuti sono stati normalizzati per il contenuto di proteine cellulari ed espressi quindi come µg di coenzima Q/mg di proteine e come percentuale di variazione degli stessi valori.

È noto in letteratura che la biodisponibilità *in vivo* del CoQ esogeno sia influenzata da molteplici fattori, tra questi il dosaggio della supplementazione, l'apporto di grassi con la dieta, l'assunzione di vitamina E, la formulazione del nutraceutico e dallo stato ossidativo del coenzima Q (29). Recenti studi hanno infatti messo in evidenza come la forma ridotta del coenzima Q₁₀ risulti essere più biodisponibile rispetto a quella ossidata, probabilmente perché questo le consente di saltare la fase di riduzione a livello delle lipoproteine plasmatiche, eliminando un ulteriore fattore in grado di ridurre l'assorbimento a livello cellulare (30, 31, 32). I dati *in vitro* ottenuti nel presente lavoro di tesi hanno confermato questa tendenza sottolineando un significativo incremento dose-dipendente dei livelli cellulari totali in seguito a supplementazione con le forme ridotte di entrambi i coenzimi rispetto alle corrispondenti ossidate, a tutte le concentrazioni testate e indipendentemente dal modello cellulare supplementato. Ulteriori evidenze in letteratura scientifica suggeriscono che la forma ridotta sia quella più biodisponibile. *Marcheggiani et al.* nel 2021, valutando l'effetto anti-invecchiamento dell'ubichinone e dell'ubichinolo in un modello *in vitro* di deprivazione del coenzima Q₁₀ su fibroblasti di derma umano mediante l'impiego di simvastatina, hanno osservato come la forma ridotta, a parità di dose somministrata (15 µg/mL) sia risultata più biodisponibile rispetto a quella ossidata, migliorando significativamente i parametri di ossidazione legati all'invecchiamento indotto tramite deprivazione del coenzima Q₁₀ (33).

La maggiore biodisponibilità del coenzima Q ridotto rispetto a quello ossidato trova riscontro anche in alcuni studi condotti *in vivo*. *P. H. Langsjoen et al.*, nel 2014, misurando i

livelli di CoQ plasmatici e il suo stato ossidativo, dopo 4 settimane di supplementazione con 200 mg/die di ubiquinone o ubiquinolo (CoQ₁₀) in soggetti sani, hanno osservato che quest'ultimo era in grado di indurre un aumento significativamente più alto dei livelli plasmatici del coenzima Q, nonché una riduzione del suo stato ossidativo (% CoQ ridotto/CoQ totale), rispetto al coenzima Q₁₀ ossidato (34).

Risultati analoghi sono stati ottenuti nello studio *in vivo* condotto da *Prangthip et al.* nel 2016 i quali, somministrando 5mg/kg di peso corporeo di CoQ₁₀ ossidato o ridotto per 1 e 4 settimane a ratti diabetici, hanno dimostrato un paragonabile effetto protettivo dallo stress ossidativo, nonostante la forma ridotta fosse stata maggiormente incorporata sia dal fegato che dal pancreas (35).

La supplementazione con la forma ridotta del coenzima Q potrebbe quindi rappresentare una valida alternativa a quella ossidata, ampiamente utilizzata anche in molti studi clinici (36, 37, 38), per incrementare la sua biodisponibilità a livello di tessuti e organi, colmando la ridotta biosintesi endogena legata alle deficienze primarie e/o secondarie. La differenza nel grado di *uptake* dei due stati di ossidazione potrebbe risiedere nel fatto che la forma ridotta è quella prontamente disponibile nonché quella biologicamente attiva, riuscendo pertanto a fornire un migliore e più immediato supporto bioenergetico e antiossidante alla cellula.

In particolare, l'integrazione del coenzima Q in forma ridotta, anziché in quella ossidata, potrebbe risultare più efficiente nella regolazione dei meccanismi alla base della longevità e del benessere dell'organismo umano, soprattutto nei soggetti anziani nei quali i meccanismi di riduzione, micellizzazione a livello intestinale e di assorbimento risultano più compromessi. Infatti, *M. Evans et al.* nel 2009, hanno confrontato la biodisponibilità di una singola dose da 100 mg di coenzima Q₁₀ ridotto e ossidato in individui di età >60 anni, osservando un

incremento delle concentrazioni plasmatiche, significativamente maggiore nelle ore successive in seguito a supplementazione con l'ubichinolo anziché con l'ubichinone (39).

Nel presente studio sono state messe altresì a confronto le biodisponibilità solo delle forme ridotte delle due isoforme di coenzima Q, quella con 9 unità isoprenoidi (CoQ₉H₂), tipica degli animali murini e quella con 10 unità (CoQ₁₀H₂), tipica dell'uomo. I dati relativi a questo aspetto, espressi come variazione percentuale dei µg di coenzima Q totale/mg di proteine, illustrano come la forma ridotta del coenzima Q₁₀ sia stata preferita a quella ridotta del Q₉ in tutte e tre le linee cellulari oggetto di studio. Il dato è particolarmente rilevante se consideriamo che tale incremento è stato registrato anche in seguito al trattamento dei cardiomioblasti di ratto e dei mioblasti di topo, nei quali l'isoforma nativa non è rappresentata dal coenzima Q₁₀ ma bensì dal coenzima Q₉.

Sebbene nella letteratura scientifica non siano al momento presenti altri studi di biodisponibilità che mettano a confronto le isoforme di coenzima Q, i dati del presente studio forniscono una chiara indicazione sul maggior *uptake* cellulare della forma ridotta del coenzima Q₁₀, anche nelle cellule murine, probabilmente dovuta alla presenza di un gruppo isoprenoide in più, che ne aumenta la lipofilità, favorendone l'assorbimento a livello della membrana cellulare.

In ultimo, al fine di valutare quale fosse il modello cellulare maggiormente in grado di incorporare il coenzima Q esogeno, è stata valutata anche la variazione percentuale del contenuto di CoQ cellulare totale in seguito a supplementazione con le sole forme ridotte di entrambi i coenzimi, confrontando un'unica dose di supplementazione, ossia 5 µg/mL. Indipendentemente dalla forma ridotta somministrata, i fibroblasti di derma umano si sono dimostrati essere il modello cellulare più propenso ad assorbire il coenzima Q, con un incremento maggiore e significativamente diverso sia dai cardiomioblasti di muscolo scheletrico di ratto che dai mioblasti di muscolo scheletrico murino.

L'elevato grado di assorbimento e la notevole risposta dei fibroblasti al trattamento con CoQ esogeno trova riscontro anche in altri lavori riportati in letteratura scientifica. *Zhang et al.* (2012) (40) hanno osservato che il trattamento con CoQ₁₀ è in grado di promuovere una maggiore proliferazione dei fibroblasti in coltura, inducendo un aumento dell'espressione di collagene di tipo IV e di elastina, inibendo la produzione di specie radicaliche (ROS) dopo irradiazione con raggi UVA-UVB, probabilmente grazie all'aumentata biodisponibilità di questa molecola a livello cellulare in seguito a supplementazione.

Knott et al. nel 2015 (41), in uno studio condotto *in vivo*, hanno dimostrato che l'applicazione dell'ubichinone su 73 volontarie sane (20-66 anni) ha determinato un aumento significativo della biodisponibilità di ubichinolo nella pelle, indicando quindi un assorbimento e una riduzione efficaci a livello del derma. Inoltre, nella sezione *in vitro* dello stesso studio, gli autori hanno osservato anche che il trattamento con 18 µM di ubichinone (quantità paragonabile a quella trovata nell'epidermide umana dopo 2 settimane di applicazione topica di una formulazione di prova contenente 870 µM di ubichinone) era in grado di stimolare significativamente il metabolismo energetico anche nei cheratinociti umani in coltura.

Diversamente dai fibroblasti e dai cardiomioblasti, i mioblasti sono risultati invece particolarmente refrattari all'*uptake* di Coenzima Q esogeno, facendo registrare incrementi dei livelli totali di coenzima Q non sempre significativi alle concentrazioni somministrate e ben al di sotto di quelle registrate negli altri due modelli cellulari. Pur essendo allineati agli altri tipi cellulari nel preferire l'*uptake* della forma ridotta del coenzima Q₁₀ a quella fisiologica del Q₉, in particolare in corrispondenza delle concentrazioni più basse (0,6 e 1,2 µg/mL) e di quella più alta (10 µg/mL), l'analisi della variazione percentuale dei livelli totali di coenzima Q alla sola concentrazione di 5 µg/mL, ha messo in evidenza come l'assorbimento sia comunque significativamente più basso rispetto ai cardiomioblasti di muscolo scheletrico.

Benché sia noto infatti che le cellule muscolari, sia scheletriche che cardiache, abbiano un maggiore contenuto di mitocondri e di conseguenza un maggiore *storage* di CoQ al loro interno rispetto ai fibroblasti, i risultati relativi all'internalizzazione di coenzima Q esogeno risultano più limitati, soprattutto nelle prime.

Il muscolo scheletrico rappresenta uno dei principali bersagli del processo di invecchiamento (42) e l'incremento del contenuto cellulare di coenzima Q, in condizioni patologiche o durante la fisiologica diminuzione della sua biosintesi endogena, potrebbe contribuire significativamente a sostenere il metabolismo energetico a livello cellulare, migliorando la fisiologia di tutto l'organismo e quindi lo stato di salute dei soggetti più fragili.

Pertanto, nell'ambito di questa tematica, i risultati ottenuti suggeriscono l'approfondimento di molti altri aspetti relativi all'assorbimento del coenzima Q esogeno, in particolare a livello muscolare, al fine di comprendere meglio il ruolo dei mitocondri, i meccanismi alla base della regolazione del suo ingresso all'interno della cellula e soprattutto come poterli modulare a livello sia intra che extra-cellulare in modo da contrastare le deficienze primarie e secondarie di coenzima Q nonché tutti i disturbi che ne derivano, migliorando in ultimo la qualità della vita e promuovendo un invecchiamento di successo.

Capitolo VII: CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di tesi è stata comparata la biodisponibilità *in vitro* di due isoforme di coenzima Q, il coenzima Q₉ e il coenzima Q₁₀, nella forma sia ossidata che ridotta, mediante supplementazione con diverse concentrazioni (0,6-1,2-2,5-5-10 µg/mL) per 24h a 37°C, di tre diversi modelli cellulari quali fibroblasti di derma umano, cardiomioblasti di tessuto muscolare cardiaco di ratto e mioblasti di tessuto muscolare scheletrico di topo.

I dati ottenuti hanno messo in evidenza che indipendentemente dall'isoforma utilizzata e dal modello cellulare, la forma ridotta risulta quella maggiormente biodisponibile rispetto alla forma ossidata a tutte le concentrazioni testate, aumentando significativamente i livelli di CoQ cellulari totali (µg/mg proteine).

In particolare, in termini di valore assoluto (µg di coenzima Q totale/mg proteine), confrontando solo le forme ridotte delle due isoforme, quella del CoQ₁₀ risulta essere quella più biodisponibile, soprattutto nei cardiomioblasti che hanno fatto registrare un aumento maggiore rispetto alle altre due linee cellulare a tutte le concentrazioni testate, nonostante la forma fisiologicamente presente sia il coenzima Q₉. Questo andamento potrebbe essere legato alla maggiore lipofilità del coenzima Q₁₀, dovuta alla presenza di un gruppo isoprenoide in più rispetto al coenzima Q₉, che ne consente una più facile veicolazione attraverso le membrane biologiche.

Analizzando però lo stesso dato in termini di variazione percentuale, quindi ogni linea cellulare rispetto al proprio basale di riferimento, l'incremento dei livelli totali di coenzima Q in seguito a supplementazione con le forme ridotte, risulta significativamente maggiore nei

fibroblasti di derma umano. Questo dato conferma una diversa capacità di assorbire il CoQ esogeno suggerendo la presenza di sistemi regolativi, al momento ignoti, in grado di modulare la traslocazione di CoQ esogeno in diversi modelli cellulari. Tra i meccanismi alla base di una diversa capacità di incorporazione è ipotizzabile una sua associazione con il minor contenuto basale di coenzima Q nei fibroblasti, a sua volta legata al minor contenuto di mitocondri, rispetto ai cardiomioblasti di muscolo cardiaco e ai mioblasti di muscolo scheletrico. Una scarsa incorporazione di CoQ è difatti frequentemente associata a tessuti con elevato metabolismo aerobico ed elevato numero di mitocondri, suggerendo un ruolo della massa mitocondriale nel regolare la quantità massima di coenzima Q presente nelle cellule che compongono questi tessuti.

L'analisi della variazione percentuale dei livelli cellulari totali di coenzima Q totale, alla sola dose di supplementazione di 5 µg/mL, ha in ultimo confermato la maggior propensione dei fibroblasti ad internalizzare entrambe le forme ridotte, in maniera altamente significativa, sia rispetto ai cardiomioblasti che ai mioblasti. Parallelamente, lo stesso dato, ha sottolineato la scarsa affinità delle cellule muscolari scheletriche nei confronti dell'assorbimento di Coenzima Q esogeno, facendo registrare un aumento che è risultato significativamente più basso non solo rispetto ai fibroblasti ma anche rispetto ai cardiomioblasti.

Pertanto, il presente studio fornisce nuove informazioni circa i fattori alla base della biodisponibilità del CoQ, quali l'influenza del suo stato ossidativo, il potenziale ruolo della lunghezza della catena isoprenoide e il differente grado di *uptake* in tre diversi modelli cellulari.

Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per comprendere meglio i meccanismi che regolano il passaggio del coenzima Q dall'esterno all'interno della cellula e viceversa, il contributo del contenuto mitocondriale nonché l'esistenza di sistemi di regolazione dei suoi livelli intracellulari, al fine di fornire nuove strategie utili, sia in fase di prevenzione primaria

che in quella secondaria, a migliorare la gestione dei sintomi legati alla deficienza primaria o secondaria di coenzima Q₁₀, promuovendo quindi un invecchiamento di successo.

Bibliografia

1. *Invecchiamento Attivo e condizioni di vita degli anziani in Italia*, Istat, produzione editoriale 2020.
2. A. Kalén; E.-L. Appelkvist; G. Dallner, *Age-related changes in the lipid compositions of rat and human tissues*, *Lipids* 24 (7), 579–584, 1989.
3. F.L. Crane; Y. Hatefi; R.L. Lester; C. Widmer, *Isolation of a quinone from beef heart mitochondria*, *Biochimica et Biophysica Acta* 25 (1), 220-221, 1957.
4. J. A. Stephely; D. J. Pagliarini, *Biochemistry of Mitochondrial Coenzyme Q Biosynthesis*, *Trends in Biochemical Sciences* 42 (10), 824-843, 2017.
5. M. Bentinger; M. Tekle; G. Dallner, *Coenzyme Q – Biosynthesis and functions*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396 (1), 74–79, 2010.
6. M. Turunen; J. Olsson; G. Dallner, *Metabolism and function of coenzyme Q*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1660 (1-2), 171-199, 2004.
7. K.S. Echtay; E. Winkler; M. Klingenberg, *Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function*, *Nature* 408 (6812), 609–613, 2000.
8. D. Mantle; A. Dybring, *Bioavailability of Coenzyme Q10: An Overview of the Absorption Process and Subsequent Metabolism*, *Antioxidants* 9 (5), 386, 2020.
9. J. Garrido-Maraver; M. D. Cordero; M. Oropesa-Avila; M. de la Mata; A. Fernandez Vega; A. D. Pavon; E. Alcocer-Gomez; C. P. Calero; M. Villanueva Paz; M. Alanis; I. de Lavera; D. Cotan; J. A. Sanchez Alcazar, *Clinical applications of coenzyme Q₁₀*, *Frontiers in Bioscience* 19 (4), 619–633, 2014.

10. C. Schmeer; A. Kretz; D. Wengerodt; M. Stojiljkovic; O. W. Witte, *Dissecting Aging and Senescence-Current Concepts and Open Lessons*, *Cells* 8 (11), 1446, 2019.
11. L. Partridge; J. Deelen; P.E. Slagboom, *Facing up to the global challenges of ageing*, *Nature* 561 (7721), 45–56, 2018
12. V Sachdeva; A. Roy; N. Bharadvaja, *Current prospective of nutraceuticals: A review*, *Current Pharmaceutical Biotechnology* 21 (10), 884-896, 2020.
13. P. Coppens, *The Importance of Food Supplements for Public Health and Well-Being*, *World review of nutrition and dietetics* 121, 66-72, 2020.
14. H. B. Stähelin, *The Impact of Antioxidants on Chronic Disease in Ageing and in Old Age*, *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 69 (3), 146–149, 1999.
15. G. P. Littarru; L. Tiano, *Clinical aspects of coenzyme Q10: An update*, *Nutrition* 26 (3), 250-254, 2010.
16. A. Varela-López; F. Giampieri; M. Battino; J. Quiles (2016). *Coenzyme Q and Its Role in the Dietary Therapy against Aging*, *Molecules* 21 (3), 373, 2016.
17. M. Arenas-Jal; J. M. Suñé-Negre; E. García-Montoya, *Coenzyme Q10 supplementation: Efficacy, safety, and formulation challenges*, *Comprehensive reviews in food science and food safety* 19 (2), 574-594, 2020.
18. M. J. Acosta; L. Vazquez Fonseca; M. A. Desbats; C. Cerqua; R. Zordan; E. Trevisson; L. Salviati, *Coenzyme Q biosynthesis in health and disease*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1857 (8), 1079-1085, 2016.
19. I. Hargreaves; A. R. Heaton; D. Mantle, *Disorders of Human Coenzyme Q10 Metabolism: An Overview*, *International Journal of Molecular Sciences* 21 (18), 6695, 2020.

20. L. Testai; A. Martelli; L. Flori; A. F. G. Cicero; A. Colletti, *Coenzyme Q10: Clinical Applications beyond Cardiovascular Diseases*, *Nutrients* 13 (5), 1697, 2021.
21. M. Mancuso; D. Orsucci; V. Calsolaro; A. Choub; G. Siciliano, *Coenzyme Q10 and Neurological Diseases*, *Pharmaceuticals* 2 (3), 134–149, 2014.
22. M. Guescini; L. Tiano; M. L. Genova; E. Polidori; S. Silvestri; P. Orlando; C. Fimognari; C. Calcabrini; V. Stocchi; P. Sestili, *The Combination of Physical Exercise with Muscle-Directed Antioxidants to Counteract Sarcopenia: A Biomedical Rationale for Pleiotropic Treatment with Creatine and Coenzyme Q10*, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017 (7083049), 1–19, 2017.
23. P. Navas; M. V. Cascajo; M. Alcázar-Fabra; J. D. Hernández-Camacho; A. Sánchez-Cuesta; A. B. Cortés Rodríguez; M. Ballesteros-Simarro; A. Arroyo-Luque; J. C. Rodríguez-Aguilera; D. J. M. Fernández-Ayala; G. Brea-Calvo; G. López-Lluch; C. Santos-Ocaña, *Secondary CoQ10 deficiency, bioenergetics unbalance in disease and aging*, *Biofactors* 47 (4), 551-569, 2021.
24. L. Salviati; E. Trevisson; M. Doimo; P. Navas, *Primary Coenzyme Q10 Deficiency*, *Gene Reviews*, (), -, 2017.
25. M. E. Díaz-Casado; J. L. Quiles; E. Barriocanal-Casado; P. González-García; M. Battino; L. C. López; A. Varela-López, *The Paradox of Coenzyme Q10 in Aging*, *Nutrients* 11 (9), 2221, 2019.
26. R. Montero; D. Yubero; M.C. Salgado; M. J. González; J. Campistol; M. D. M. O’Callaghan; M. Pineda; V. Delgadillo; J. Maynou; G. Fernandez; J. Montoya, E. R. Pesini; S. Meavilla; V. Neergheen; A. García-Carzola; P. Navas; I. Hargreaves; R. Artuch, *Plasma coenzyme Q10 status is impaired in selected genetic conditions*, *Scientific Reports* 9 (1), 793, 2019.

27. D. Mantle; A. Dybring, *Bioavailability of Coenzyme Q10: An Overview of the Absorption Process and Subsequent Metabolism*. *Antioxidants* 9 (5), 386–398, 2020.
28. H. N. Bhagavan; R.K. Chopra, *Plasma Coenzyme Q10 response to oral ingestion of Coenzyme Q10 formulations*, *Mitochondrion* 7S, 78-88, 2007.
29. N. Gueguen; O. Baris; G. Lenaers; P. Reynier; M. Spinazzi, *Secondary coenzyme Q deficiency in neurological disorders*, *Free Radical Biology and Medicine* 165, 203–218, 2021.
30. D. Alf; M.E. Schmidt; S.C. Siebrecht, *Ubiquinol supplementation enhances peak power production in trained athletes: a double-blind, placebo controlled study*, *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 10 (1), 24, 2013
31. Y. Zhang; J. Liu; X. Chen; O. Chen, C.-Y. Oliver Chen, *Ubiquinol is superior to ubiquinone to enhance Coenzyme Q10 status in older men*, *Food & Function* 9, 5653, 2018.
32. F. M. Gutierrez-Mariscal; A.P. Arenas-de Larriva; L. Limia-Perez;; J. L. Romero-Cabrera; E .M. Yubero-Serrano; J. López-Miranda, *Coenzyme Q10 Supplementation for the Reduction of Oxidative Stress: Clinical Implications in the Treatment of Chronic Diseases*, *International Journal of Molecular Sciences* 21 (21), 7870. 2020.
33. F. Marcheggiani; S. Kordes; I. Cirilli; P. Orlando; S. Silvestri; A. Vogelsang; L. Tiano, *Anti-ageing effects of ubiquinone and ubiquinol in a senescence model of human dermal fibroblasts*, *Free Radical Biology and Medicine* 165, 282–288, 2021.
34. P.H. Langsjoen; A. M. Langsjoen, *Comparison study of plasma coenzyme Q 10 levels in healthy subjects supplemented with ubiquinol versus ubiquinone*, *Clinical Pharmacology in Drug Development* 3 (1), 13–17, 2014.

35. P. Prangthip; A. Kettawan; J. Posuwan; M. Okuno; T. Okamoto, *An Improvement of Oxidative Stress in Diabetic Rats by Ubiquinone-10 and Ubiquinol-10 and Bioavailability after Short- and Long-Term Coenzyme Q10 Supplementation*, *Journal of Dietary Supplements* 13 (6), 647–659, 2016.
36. N. Ferrara; P. Abete; G. Ambrosio; P. Landino; P. Caccese; P. Cirillo, A. Oradei; G. P. Littarru; M. Chiariello; F. Rengo, *Protective role of chronic ubiquinone administration on acute cardiac oxidative stress*, *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 274 (2), 858-865, 1995.
37. N. V. Larijani; N. Ahmadi; I. Zeb; F. Khan; F. Flores; M. Budoff, *Beneficial effects of aged garlic extract and coenzyme Q10 on vascular elasticity and endothelial function: The FAITH randomized clinical trial*, *Nutrition* 29 (1), 71–75, 2013
38. B. J. Lee; Y.-C. Huang; S.-J. Chen; P.-T. Lin, *Coenzyme Q10 supplementation reduces oxidative stress and increases antioxidant enzyme activity in patients with coronary artery disease*, *Nutrition* 28 (3), 250–255, 2012.
39. M Evans; J. Baisley; S. Barss; N. Guthrie, *A randomized, double-blind trial on the bioavailability of two CoQ10 formulations*, *Journal of functional foods* 1 (1), 65–73, 2009.
40. M. Zhang; L. Dang; F. Guo; X. Wang; W. Zhao; R. Zhao, *Coenzyme Q10 enhances dermal elastin expression, inhibits IL-1 α production and melanin synthesis in vitro*, *International Journal of Cosmetic Science* 34 (3), 273–279, 2012.
41. A. Knott; V. Achterberg; C. Smuda; H. Mielke; G. Sperling; K. Dunckelmann; A. Vogelsang; A. Kruger; H. Schwengler; M. Behtashet al., *Topical treatment with coenzyme Q10-containing formulas improves skin's Q10 level and provides antioxidative effects*, *Biofactors* 41 (6), 383–390, 2015.

42. A. Fischer; S. Onur; P. Niklowitz; T. Menke; M. Laudes; G. Rimbach; F. Doring,
*Coenzyme Q10 Status as a Determinant of Muscular Strength in Two Independent
Cohorts*, PLoS One 11 (12), 2016.