



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI

SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di laurea magistrale in

BIOLOGIA MOLECOLARE APPLICATA

Curriculum Scienze della Nutrizione

OVERTRAINING E STRESS OSSIDATIVO:

ELETTROSTIMOLAZIONE COME MODELLO DI ESERCIZIO FISICO *IN VITRO*

OVETRAINING AND OXIDATIVE STRESS:

ELECTRICAL PULSE STIMULATION AS A MODEL OF PHYSICAL EXERCISE *IN VITRO*

Tesi di Laurea di:

Emanuele Buri

Relatore:

Prof. Patrick Orlando

Correlatore:

Dott.ssa Loredana Rao

Sessione estiva

Anno Accademico 2023/2024

A mia Nonna,

Angelina

*Il successo è l'abilità
di passare da un fallimento
all'altro senza perdere
l'entusiasmo*

(Winston Churchill)

Sommario

1. INTRODUZIONE	3
1.1 ESERCIZIO FISICO	3
1.2 BENEFICI DELL'ATTIVITÀ FISICA	4
1.3 LO STRESS OSSIDATIVO E IL MITOCONDRIO	7
1.4 L'ESERCIZIO FISICO E LO STRESS OSSIDATIVO	12
1.5 ESERCIZIO FISICO, COENZIMA Q E STATINE	18
2. SCOPO DELLA TESI	22
3. MATERIALI E METODI	23
3.1 LINEA CELLULARE	23
3.2 MEZZI DI COLTURA	24
3.3 MANTENIMENTO DELLA COLTURA CELLULARE	25
3.4 LA TECNICA DELL'ELECTRICAL PULSE STIMULATION (EPS)	25
3.5 STRUMENTAZIONE PER LA STIMOLAZIONE ELETTRICA	26
3.6 ANALISI DELLA VITALITA' CELLULARE	30
3.6.1 PROTOCOLLO DEL PRESTOBLUE	31
3.6.2 PROTOCOLLO DELLA LDH	32
3.7 ANALISI DELLA PEROSSIDAZIONE LIPIDICA	33
3.7.1 PROTOCOLLO DEI TBARS	34
3.8 ANALISI DEI GRUPPI CARBONILICI	35
3.8.1 PROTOCOLLO DEI DNPH	36
3.9 QUANTIFICAZIONE DELLE PROTEINE TOTALI	37
3.10 TRATTAMENTO CON STATINE	38
3.11 ESTRAZIONE E QUANTIFICAZIONE DEI LIVELLI DI CoQ9	38
3.12 ANALISI STATISTICA	41
4. RISULTATI	42
4.1 MESSA A PUNTO DEL PROTOCOLLO EPS AD ALTA INTENSITÀ	42
4.2 TRATTAMENTO CON STATINE: MODELLO DI MIOPATIA PER EPS	47
4.3 DANNO OSSIDATIVO	50
5. DISCUSSIONE	56
6. CONCLUSIONE	62
7. BIBLIOGRAFIA	63

1. INTRODUZIONE

1.1 ESERCIZIO FISICO

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) definisce l'attività fisica come “qualsiasi movimento corporeo prodotto dai muscoli scheletrici che richiede un dispendio energetico: sollevare pesi, fare esercizio, giocare, viaggiare, camminare, andare in bicicletta, ballare, fare giardinaggio, lavori domestici, sono tutti esempi di attività fisica (Physical activity, PA)”.

L'importanza dell'esercizio fisico come parte della vita quotidiana è un dato di fatto: anche un minimo incremento di attività fisica, come l'aggiunta di un'ora di camminata settimanale, potrebbe migliorare significativamente la salute generale e ridurre il rischio di mortalità [1].

Esistono diverse forme di attività fisica, che si classificano in base alla tipologia e al carico di allenamento, come anche al tipo di metabolismo che attivano: ad esempio, le attività aerobiche intense, anche definite di resistenza o cardio (nuoto, corsa/camminata veloce di 150 minuti a settimana), coinvolgono grandi gruppi muscolari e si basano principalmente sul metabolismo aerobico, ossia dipendono dall'ossigeno per produrre energia; la loro durata varia da pochi minuti a diverse ore ed è inversamente proporzionale all'intensità dell'esercizio.

Gli individui allenati possono allenarsi più intensamente per periodi di tempo più lunghi.

Questo tipo di attività fisica aumenta la respirazione e la frequenza cardiaca, riducendo l'ipertensione, migliorando il profilo lipidico e diminuendo il rischio di insorgenza di malattie cardiovascolari.

L'esercizio fisico anaerobico, detto anche di forza o potenza (come salto con la corda, esercizi di sollevamento pesi e con attrezzature all'aperto) implica un allenamento con sforzi intensi ma di breve durata, a corpo libero o associato a un carico esterno come pesi, macchinari, bande elastiche, etc.

L'attività fisica anaerobica determina un aumento della massa muscolare e ossea, un miglioramento della funzione e della forza muscolare e più in generale della fitness muscoloscheletrica.

1.2 BENEFICI DELL'ATTIVITÀ FISICA

Numerosi lavori scientifici presenti in letteratura dimostrano che uno stile di vita sedentario, la scarsa attività fisica e un indice di massa corporea (BMI) superiore a 30 possono portare nel lungo periodo a una riduzione della qualità della vita, a un aumento del rischio di sviluppare patologie croniche come l'ipertensione, il diabete, le malattie cardiovascolari (CVD), il cancro, la malattia polmonare cronica ostruttiva (COPD), e, più in generale, ad un più alto tasso di mortalità [2-3].

Al contrario, l'esercizio fisico regolare comporta numerosi e comprovati benefici per la salute: studi scientifici hanno dimostrato come l'esercizio sia in grado di ridurre il rischio di sviluppare malattie cardiache e di infarto, la sindrome metabolica, il diabete di tipo 2 e molte altre patologie, aumentando sia l'aspettativa e la qualità della vita [1-3].

Secondo il Ministero della Salute, i benefici per la salute attribuiti all'attività fisica regolare, oltre alla riduzione della frequenza di malattie croniche, sono:

- Il miglioramento della mineralizzazione ossea, che contribuisce alla prevenzione dell'osteoporosi;
- Il miglioramento della funzione digestiva e della regolazione del ritmo intestinale;
- L'aumento del dispendio energetico favorendo il controllo del peso corporeo;
- Il mantenimento delle funzioni cognitive e la riduzione del rischio di insorgenza di depressione e demenza;
- La riduzione dello stress e dell'ansia;
- Il miglioramento della qualità del sonno e dell'autostima.

Come è stato già evidenziato, l'esercizio fisico gioca un ruolo chiave nella prevenzione e nell'attenuazione dei sintomi di malattie cronicodegenerative come il diabete mellito di tipo 2 (T2DM) una malattia cronica caratterizzata da elevati livelli di glucosio nel sangue dovuti a una scarsa secrezione di insulina da parte delle cellule β delle isole pancreatiche e dalla resistenza all'insulina (IR) nei tessuti, determinando un deficit nel mantenimento dell'omeostasi del glucosio con conseguente iperglicemia (Figura 1).

Si differenzia dal diabete mellito di tipo 1 che è, invece, una patologia cronica, di tipo autoimmune, in grado di distruggere le cellule β del pancreas che producono insulina [fonte Ministero della Salute].

Nei pazienti affetti da T2DM, spesso sedentari e obesi, il grasso corporeo in eccesso si distribuisce prevalentemente nella regione addominale promuovendo l'insorgenza di insulino resistenza (IR) attraverso vari meccanismi infiammatori, tra cui l'aumento del rilascio di acidi grassi liberi (FFA) e la deregolazione nella produzione di adipochine (citochine secrete dal tessuto adiposo) che, insieme ad altre molecole proinfiammatorie come l'interleuchina 6 (IL-6), la proteina C-reattiva (CRP), il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α) o interleuchina 1 (IL-1), vengono rilasciate nel circolo sanguigno e nei tessuti, inducendo uno stato infiammatorio cronico.

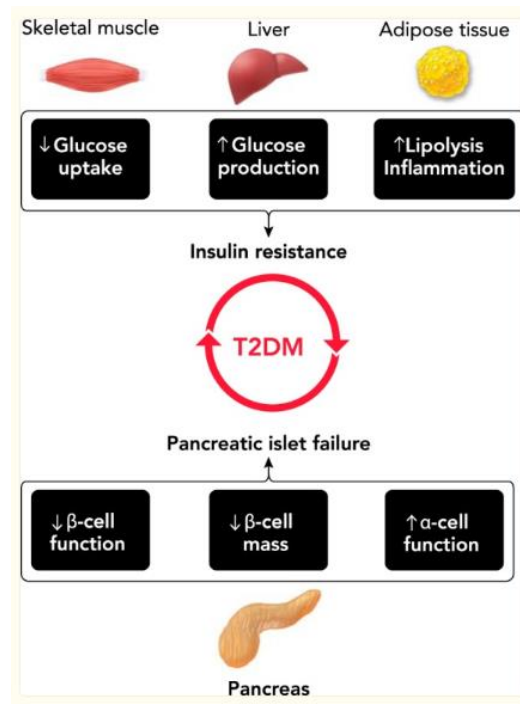


Figura 1. Descrizione dei meccanismi alla base dell'insorgenza del diabete di tipo 2

In questo contesto, la contrazione delle cellule muscolari scheletriche durante l'esercizio fisico genera una serie di benefici che inducono la riduzione del grasso intra-addominale, un aumento del flusso sanguigno nel muscolo stesso, il miglioramento dell'assorbimento di glucosio dal plasma che si traduce in una riduzione dell'insulino resistenza e quindi del rischio di insorgenza di patologie croniche.

L'esercizio fisico regolare, promuovendo la contrazione del muscolo scheletrico, riduce l'infiammazione aumentando la secrezione di citochine antinfiammatorie (IL-1 e TNF), come l'antagonista del recettore dell'IL-1 (IL-1Ra) e il recettore solubile del TNF (s-TNF-R).

Individui più allenati mostrano anche livelli circolanti ridotti di IL-6, IL-18 e CRP, insieme a livelli più bassi di leptina, ormone prodotto dagli adipociti che regola il metabolismo energetico.

L'esercizio fisico regolare può inoltre ridurre lo stress ossidativo generale, promuovendo la sintesi di antiossidanti endogeni come il glutathione (GSH),

e altri enzimi antiossidanti come il superossido dismutasi (SOD), la catalasi o le perossiredossine [4].

Da alcuni anni, molti autori definiscono l'apparato muscolo scheletrico come un vero e proprio organo endocrino, in quanto in risposta all'esercizio fisico e quindi alla contrazione muscolare, vengono rilasciate numerose molecole genericamente definite "miochine", ossia queste molecole sono peptidi prodotti dalle fibre muscolari che rilasciate in circolo hanno effetti autocrini/paracrini, mediando gli effetti benefici dell'esercizio non solo sul muscolo stesso, ma anche su altri organi chiave coinvolti della regolazione dell'omeostasi energetica, come il tessuto adiposo e il fegato [5].

Una fra le più recenti miochine ad essere stata caratterizzata e coinvolta negli effetti benefici dell'esercizio fisico è l'irisina.

Prodotta principalmente dal muscolo scheletrico, partecipa ai processi di biogenesi mitocondriale nonché al metabolismo ossidativo, inducendo il browning (imbrunimento) del tessuto adiposo, migliorando la tolleranza al glucosio (i suoi livelli sono infatti più bassi nei pazienti affetti da T2DM) [6, 7].

L'attività fisica e sportiva favorisce infine l'inclusione sociale, svolgendo un ruolo rilevante nel miglioramento del benessere psichico e nella prevenzione e trattamento del disagio sociale nelle diverse fasce d'età, soprattutto durante lo sviluppo giovanile, contrastando stati depressivi e di ansia [8, 9].

1.3 LO STRESS OSSIDATIVO E IL MITOCONDRIO

Lo stress ossidativo è definito come uno squilibrio tra specie proossidanti e antiossidanti a favore delle prime, con conseguente alterazione dell'equilibrio redox e/o danno molecolare [10].

Lo stress ossidativo è una condizione coinvolta nella patogenesi e nella progressione di numerose malattie, come quelle cardiovascolari, il cancro,

l'infertilità maschile, le malattie neurodegenerative che colpiscono cervello e il tessuto muscolare scheletrico [11,12,13].

Le specie proossidanti coinvolte sono sia le specie reattive dell'ossigeno (ROS) che dell'azoto (RNS), che possono danneggiare le molecole biologiche all'interno della cellula.

Possono reagire con i lipidi presenti nelle membrane cellulari attraverso una reazione chiamata perossidazione lipidica, in cui i lipidi contenenti acidi grassi insaturi e i loro esteri vengono direttamente ossidati dall'ossigeno molecolare.

Le specie proossidanti possono reagire anche con le proteine, causando la modificazione dei gruppi funzionali dei residui di amminoacidi, influenzando la struttura e la funzione delle proteine e compromettendo la loro attività biologica.

Infine, possono danneggiare anche gli acidi nucleici, come il DNA e l'RNA, attraverso vari meccanismi.

A livello del DNA, i radicali dell'ossigeno possono indurre la formazione di dimeri di timina coinvolti nell'invecchiamento cellulare anche se i fenomeni di ossidazione possono comunque avvenire su tutte le basi azotate e sul 2-deossiribosio, ma a mettere in evidenza la presenza di stress ossidativo è principalmente l'ossidazione della deossiguanosina in 8-idrossideossiguanosina che altera la stabilità del DNA.

Questo danneggiamento può portare a mutazioni genetiche, rotture del filamento del DNA e interferenze con la trascrizione e la replicazione del DNA.

In condizioni fisiologiche una bassa o moderata produzione di ossidanti avviene normalmente nelle cellule durante il metabolismo aerobico con effetti positivi nel signaling intracellulare e nella difesa immunitaria.

Per mantenere un equilibrio redox ottimale le cellule sono dotate di sistemi antiossidanti di vario genere, tra cui sistemi enzimatici come la superossido-

dismutasi (SOD), la catalasi (CAT), la glutazione-perossidasi (GPx), la tioredoxina (TRX) e la perossiredoxina (PRDX) e altri sistemi non enzimatici rappresentati da composti a basso peso molecolare, tra cui il glutatione, l'acido ascorbico, il tocoferolo e l'ubichinolo.

Tuttavia, a seguito di una non ottimale gestione dei meccanismi di detossificazione, a causa di una eccessiva produzione di ROS/RNS o una ridotta attività antiossidante, la continua esposizione delle cellule alle molecole ossidanti può generare effetti citotossici.

Uno dei potenziali e principali siti di produzione di specie reattive dell'ossigeno è il mitocondrio, un organello intracellulare dove hanno sede complesse reazioni ossido-riduttive che coinvolgono l'ossigeno col fine di generare l'energia necessaria per il funzionamento di tutti i processi cellulari.

I mitocondri in particolare sono costituiti da un doppio sistema di membrana: una esterna permeabile che delimita uno spazio intermembrana e una interna impermeabile molto più estesa organizzata in creste che circoscrive la matrice mitocondriale all'interno della quale è contenuto il DNA mitocondriale e le proteine che partecipano al ciclo degli acidi tricarbossilici (ciclo di Krebs).

In corrispondenza delle creste è invece presente l'apparato della catena di trasporto degli elettroni e della fosforilazione ossidativa necessario alla generazione dell'ATP essenziale per tutti i processi biologici.

L'apparato è costituito da cinque complessi:

1. Complesso I (NADH deidrogenasi), catalizza l'ossidazione del NADH rigenerando il NAD ossidato per il ciclo degli acidi tricarbossilici e l'ossidazione degli acidi grassi e trasferisce gli elettroni al coenzima Q₁₀ (ubichinone) mediante il coenzima flavina mononucleotide (FMN) e centri Ferro-zolfo;
2. Complesso II (succinato deidrogenasi), trasferisce elettroni dal FADH₂ all'ubichinone;

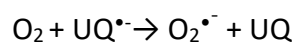
3. Complesso III (coenzima Q₁₀ – citocromo c riduttasi), che catalizza il trasferimento mediante centri Fe-S dal coenzima Q₁₀ ridotto al citocromo c;
4. Complesso IV (citocromo c ossidasi) che catalizza il trasferimento finale degli elettroni all'ossigeno molecolare con produzione di H₂O;
5. Complesso V (ATP sintasi) responsabile della conversione del potenziale elettrochimico generato durante la catena di trasporto degli elettroni (gli elettroni durante il trasferimento perdono parte della loro energia che viene utilizzata dai complessi I, III e IV per pompare protoni verso lo spazio intermembrana) in energia chimica sotto forma di ATP.

Sebbene la catena mitocondriale di trasporto degli elettroni sia un sistema molto efficiente, la natura variabile delle reazioni di ossido-riduzione che avvengono nei complessi respiratori predispone ogni trasportatore di elettroni a partecipare alle reazioni collaterali che coinvolgono l'ossigeno molecolare.

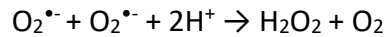
Infatti, è stato visto che in condizioni fisiologiche circa il 2% dell'ossigeno totale utilizzato dal mitocondrio viene convertito in anione superossido.

In particolare, nel complesso I può verificarsi che la FMN a seguito di un eccesso di potere riducente non riesca a cedere elettroni al coenzima Q e li trasferisca direttamente all'ossigeno oppure che a seguito di un eccesso della forma ridotta del coenzima Q si verifichi una condizione definita respirazione inversa con gli elettroni che rivengono ceduti al NAD e successivamente all'ossigeno.

Altro sito di formazione delle specie reattive dell'ossigeno è il complesso tre nel quale il coenzima Q si alterna tra gli stati di chinone (completamente ossidato), semichinone (il prodotto della riduzione monovalente) e chinolo (completamente ridotto da due elettroni); può succedere che a seguito di un accumulo di intermedi semichinonici reattivi gli elettroni vengano ceduti direttamente all'ossigeno tramite la seguente reazione:

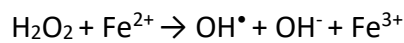


Il radicale superossido che ne risulta può dare origine al perossido di idrogeno attraverso una reazione di dismutazione catalizzata dal superossido dismutasi (MnSOD):



Il perossido di idrogeno, generato nella precedente reazione, oppure in un altro processo metabolico, può andare incontro alla ben nota reazione di Fenton in cui il ferro ferroso agisce come donatore di elettroni.

La reazione produce il radicale idrossilico (OH^{\bullet}) altamente reattivo:



Altri enzimi mitocondriali finora conosciuti in grado di produrre ROS sono gli enzimi del ciclo degli acidi tricarbossilici come l'aconitasi (ACO) e l' α -chetoglutarato deidrogenasi (KGDH), le monoammino ossidasi, il glicerolo-3-fosfatodeidrogenasi e la diidroorotato deidrogenasi.

Generalmente in condizioni fisiologiche la produzione di ROS è controbilanciata da un esteso sistema antiossidante mitocondriale che dipende esso stesso anche dallo stato redox ed energetico del mitocondrio [14].

Oltre alle già citate superossido dismutasi e catalasi il mitocondrio è dotato anche di altre difese enzimatiche come il glutatione perossidasi (GPX) che riduce il perossido ad acqua e ossigeno tramite l'ossidazione del glutatione, il quale viene a sua volta rigenerato dal glutatione reduttasi (GR).

Sono presenti inoltre il sistema perossiredossina, tioredoxina e tioredoxina reduttasi che sfruttano allo stesso modo il potere riducente (NADPH) generato dal potenziale elettronico e dal ciclo di Krebs.

A fronte di quanto appena descritto difetti della funzionalità mitocondriale e difese antiossidanti subottimali diventano il prerequisito per la produzione di ROS che se non intercettate possono ulteriormente danneggiare i mitocondri, provocare ulteriore riduzione della capacità innescando un

circolo vizioso responsabile della condizione di stress ossidativo e del danno ossidativo.

1.4 L'ESERCIZIO FISICO E LO STRESS OSSIDATIVO

Il metabolismo energetico delle cellule produce ATP e lo stesso meccanismo di produzione di questa molecola porta anche all'accumulo fisiologico dei ROS.

In particolare, nel muscolo scheletrico durante la contrazione aumenta il tasso di respirazione cellulare, quindi la produzione di ATP e di conseguenza il rilascio di ROS.

È stato dimostrato come i ROS non siano solo una fonte di danno per le cellule ma, in piccole dosi, abbiano anche degli effetti positivi, come ad esempio [15]:

1. Il miglioramento della funzionalità muscolare: studi condotti su modelli murini hanno dimostrato che l'esposizione transitoria (4 minuti) o a bassa concentrazione (nell'intervallo nM e pM) di perossido di idrogeno (H_2O_2) o tert-butilidroperossido (t-BOOH) aumentino la forza muscolare nelle fibre a contrazione rapida [16];
2. Il miglioramento nell'uptake di glucosio: le specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto, sia individualmente che in combinazione, giocano un ruolo chiave nell'assunzione di glucosio da parte del muscolo scheletrico durante l'esercizio (Figura 2) [17,18];

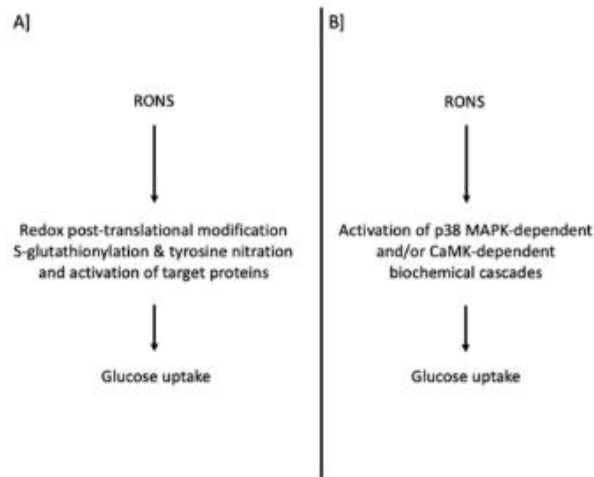


Figura 2. Aumento uptake di glucosio dovuti ai RONS

3. Il miglioramento della circolazione sanguigna: Le specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto regolano il flusso ematico attraverso vari percorsi di segnalazione e interazioni molecolari. L'ossido nitrico sintetizzato dall'enzima ossido nitrico sintasi (NOS) attiva la guanilato ciclasi solubile nelle cellule muscolari lisce vascolari e che a sua volta porta alla produzione di guanosina monofosfato ciclico (cGMP), che media la vasodilatazione, rilassando la muscolatura liscia dei vasi (Figura 3). Questo percorso è fondamentale per il mantenimento del flusso sanguigno e della pressione arteriosa [19, 20];

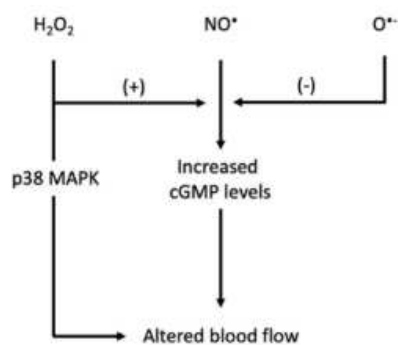


Figura 3. Circolazione alterata dai RONS

4. Il miglioramento della biogenesi mitocondriale: diversi fattori di trascrizione sono coinvolti nella biogenesi mitocondriale (PGC-1 α , mtTFA e NRF-1). AMPK (AMP chinasi), Nrf2 e p38 fungono da molecole intermedie tra RONS e l'attivazione di PGC-1 α e/o i marcatori di biogenesi mitocondriale; Choi e colleghi [21] hanno dimostrato che l'AMPK si attiva in condizioni di stress ossidativo indotte da H₂O₂ (Figura 4);

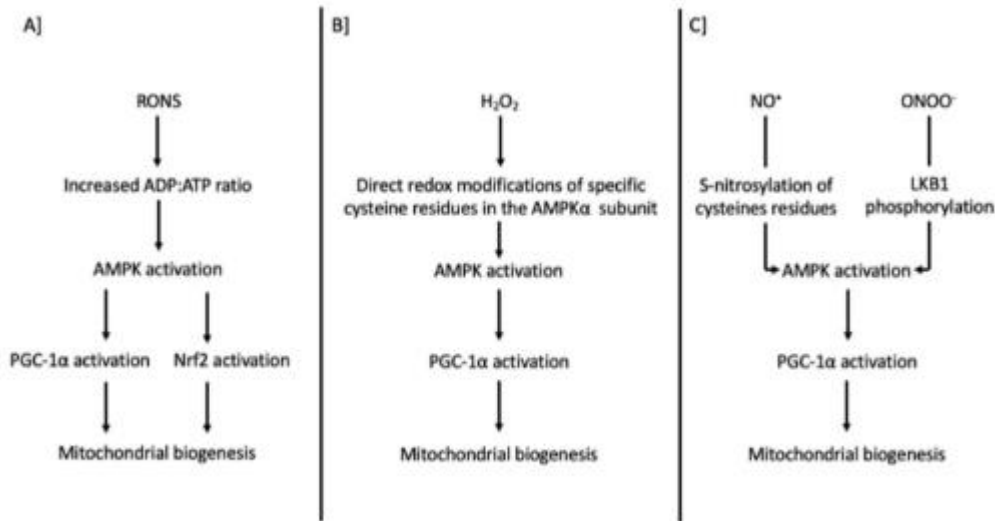


Figura 4. Biogenesi mitocondriale dovuta ai RONS

5. Il miglioramento ipertrofia muscolare: I RONS svolgono un ruolo cruciale nella regolazione delle risposte ipertrofiche nei muscoli in risposta all'allenamento di resistenza. H₂O₂ e NO• possono aumentare la fosforilazione del recettore IGF-I, attivando la via Akt-mTOR-p70S6K (Figura 5) [22,23,24];

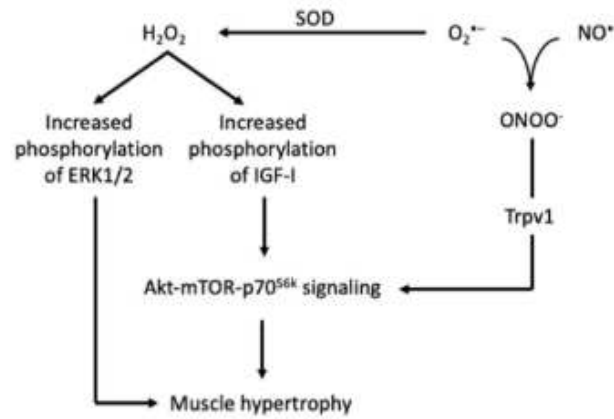


Figura 5. Ipertrafia muscolare dovuta ai RONS

6. L'attivazione dell'angiogenesi ossia di un processo fisiologico che porta alla formazione di nuovi vasi sanguigni, tramite la regolazione del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF). In particolare, è stato evidenziato che i RONS, quali il superossido, l'H₂O₂ e l'ossido nitrico, regolano direttamente l'espressione del VEGF nelle cellule endoteliali e innescano l'angiogenesi. È stato dimostrato che l'esercizio aumenti l'attività del VEGF e dei suoi recettori tirosina chinasi (VEGFR1 e VEGFR2); La successiva attivazione dell'ossidasi NADPH tramite la GTPasi Rac1 porta a un'aumentata produzione di ROS, contribuendo alla cascata di segnalazione angiogenica (Figura 6) [25,26,27,28,29,30];

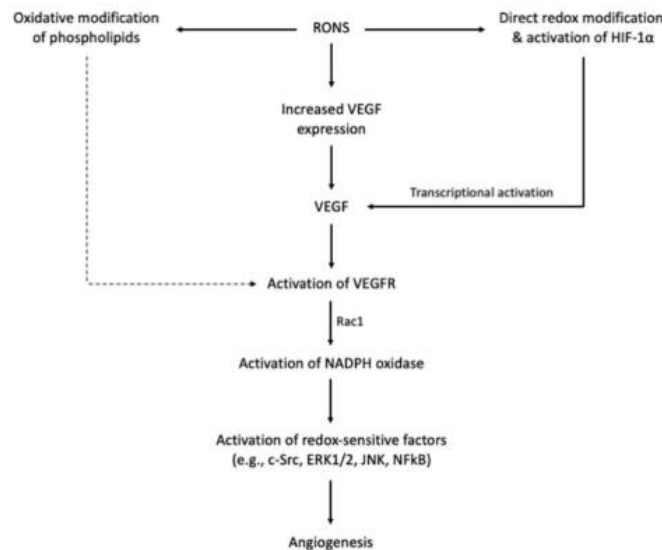


Figura 6. Angiogenesi dovuta ai RONS

Nonostante gli effetti benefici che l'esercizio fisico regolare esercita sull'organismo a vari livelli è stato altresì evidenziato come uno sforzo fisico prolungato, ad alta intensità, possa invece provocare un danno al muscolo e, più in generale, all'organismo [4].

Secondo la teoria di un fenomeno biologico definito "ormesi", l'esposizione a basse dosi di un agente nocivo o di una certa fonte di stress (come la produzione di ROS) può produrre una perturbazione nell'organismo, che risponde con un adattamento, diversamente alte dosi della stessa sostanza possono invece provocare un danno, in quanto l'organismo non riesce dopo una certa soglia a adattarsi a queste perturbazioni.

Sebbene l'esercizio fisico in sé non sia uno stimolo ormetico specifico, durante l'esercizio si verificano numerosi cambiamenti biochimici e fisiologici a livello cellulare che danno origine a delle vere e proprie risposte ormetiche.

Nella figura 7 si può osservare ciò che abbiamo precedentemente spiegato, un aumento delle produzioni di ROS dovuta all'esercizio fisico porta ad un adattamento fisiologico con eventuali effetti benefici (in verde), ma superata una certa soglia limite viene meno questo adattamento che porta a dei danni cellulari (in rosso).

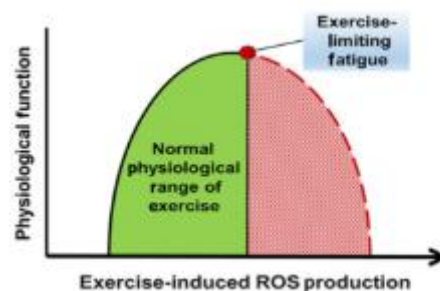


Figura 7. Ormesi da attività fisica

Lo studio dei meccanismi delle vie di segnalazione redox attivate dall'esercizio fisico nel muscolo scheletrico mostra come i RONS regolino l'omeostasi redox attraverso processi che coinvolgono la risposta agli

elementi antiossidanti (ARE), promuovendo la trascrizione genica di enzimi antiossidanti come SOD, GPx e catalasi (Figura 8).

Questi processi sono mediati da fattori redox-sensibili come NFκB e Nrf2, che coordinano la risposta cellulare agli stress ossidativi e regolano l'espressione di enzimi che proteggono contro danni ossidativi a DNA e proteine.

Tuttavia, in casi particolari come durante un allenamento molto intenso (overtraining), la produzione di RONS può aumentare al punto da impedire sia l'attivazione di queste vie redox-sensibili che quindi lo stimolo dell'adattamento.

Quando il bilancio tra la produzione di ROS e la capacità dei sistemi antiossidanti del corpo di neutralizzarli viene compromesso (stress ossidativo), avviene un accumulo eccessivo di ROS e questo fenomeno può avere vari effetti negativi, principali macromolecole biologiche già descritti precedentemente.

A questo si aggiunge l'invecchiamento cellulare ossia l'accumulo di danno ossidativo nel corso del tempo che è stato collegato al processo di invecchiamento cellulare e all'insorgenza di malattie legate all'età.

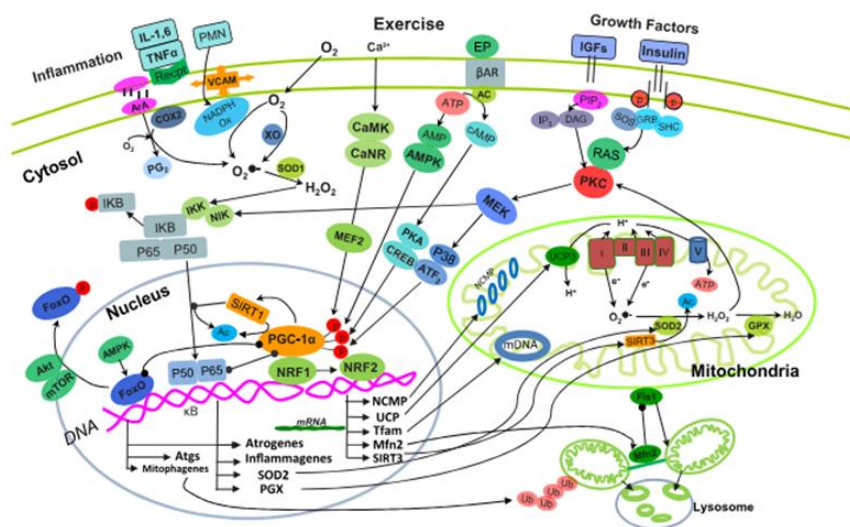


Figura 8. Vie di segnalazioni redox da esercizio fisico nel muscolo scheletrico

1.5 ESERCIZIO FISICO, COENZIMA Q E STATINE

Il Coenzima Q (CoQ) è una molecola lipofila presente in tutte le membrane delle cellule eucariotiche in particolare nei lisosomi, nel reticolo endoplasmatico, nei perossisomi e soprattutto nei mitocondri.

È stato isolato per la prima volta nel 1957 da Frederick Crane e dal suo team dell'Enzyme Institute [31] all'interno dei mitocondri cardiaci dei bovini.

Il CoQ è un 2,3-dimetossi-5-metilbenzochinone con una catena laterale isoprenoide di lunghezza variabile in maniera specie-specifica.

Il più comune nei mitocondri umani è il CoQ₁₀ nel quale la coda idrofobica è costituita da 10 unità isoprenoidi (presenti tutte in configurazione trans) come raffigurato in figura 9.

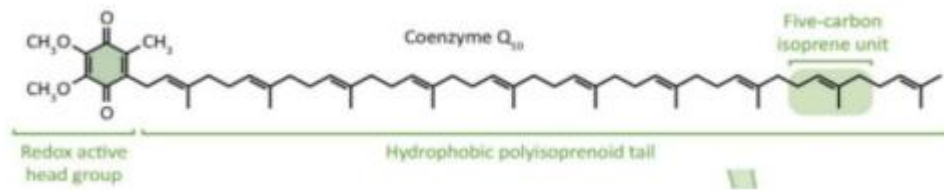


Figura 9. Struttura molecolare del CoQ₁₀

All'interno dei sistemi biologici il CoQ₁₀ può esistere in tre diversi stati di ossidazione: nella forma ridotta detta ubiquinolo, in un intermedio semichinonico e in una forma ossidata chiamata ubiquinone.

La presenza della forma instabile semichinonica è scongiurata dalla catena di trasporto degli elettroni o da reductasi specifiche (diaforasi) in grado di trasferire due elettroni simultaneamente.

Ad oggi numerose funzioni sono state associate al CoQ.

La prima ad essere stata individuata è quella come componente essenziale della catena di trasporto degli elettroni dove svolge la funzione di trasportatore di elettroni tra i complessi I e III, e II e III e dove in più

sembrerebbe proteggere i mitocondri dai fenomeni di apoptosi innescati dalla depolarizzazione della membrana interna, dalla diminuzione dei livelli di ATP, dall'attivazione della caspasi 9 o dalla frammentazione del DNA.

A livello mitocondriale il CoQ sembrerebbe favorire il trasferimento degli elettroni da lipidi a proteine disaccoppianti favorendo la termogenesi, ad esempio, nel tessuto adiposo bruno.

Il CoQ inoltre è l'unica molecola antiossidante sintetizzata endogenamente capace di proteggere lipidi, proteine e DNA dall'ossidazione.

Proteggendo le LDL dall'ossidazione e i lipidi presenti nelle lesioni aterosclerotiche svolge anche una proprietà anti-aterosclerotica.

Migliora, inoltre, la disfunzione endoteliale stimolando il rilascio di ossido nitrico.

Infine, il CoQ sembra possedere un'attività antinfiammatoria influenzando l'espressione di geni dipendenti da NF κ B1 regolando l'attivazione, la sopravvivenza e il differenziamento delle cellule del sistema immunitario innato e dei linfociti T.

Come sappiamo l'esercizio fisico intenso è associato a effetti dannosi dovuti a un aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Il CoQ₁₀ migliora la capacità aerobica, riducendo lo stress ossidativo, i segnali infiammatori e i danni muscolari indotti dall'esercizio fisico, soprattutto negli atleti [32].

La forma ridotta del CoQ₁₀, l'ubichinolo (forma attiva antiossidante), è stato oggetto di diversi studi in quanto questa forma è particolarmente influenzata da fattori come l'invecchiamento, la nutrizione, l'uso di farmaci e l'esercizio fisico intenso [33, 34].

Diversi studi hanno indicato che bassi livelli di CoQ₁₀ in rapporto al colesterolo e una ridotta percentuale di ubichinolo sono associati a un aumentato rischio di sarcopenia e debolezza muscolare legata all'età [34].

La sarcopenia, caratterizzata dalla perdita di massa e qualità muscolare, è comune tra gli anziani e comporta spesso alterazioni mitocondriali nel muscolo scheletrico.

L'aggiunta di ubiquinolo come integratore durante l'esercizio fisico regolare è stato proposto come strategia per rallentare il declino muscolare legato all'età, migliorando la qualità della vita negli anziani [34].

In modelli animali di invecchiamento precoce, l'ubichinolo ha dimostrato di proteggere contro i danni mitocondriali indotti dall'esercizio fisico, sostenendo la biogenesi mitocondriale e riducendo i danni causati dai radicali liberi [34].

Inoltre, le persone anziane che assumono statine per abbassare il colesterolo sono a rischio di sviluppare miopatia, con casi gravi che possono portare alla rhabdomiolisi.

Le statine sono attualmente i farmaci più efficaci per la prevenzione e il trattamento delle malattie cardiovascolari associate alla dislipidemia.

Questi farmaci inibiscono competitivamente la idrossimetilglutaril-CoA (HMG-CoA reduttasi), bloccando la via del mevalonato, il pathway che permette la sintesi di colesterolo endogeno, riducendo il contenuto di colesterolo epatocellulare (Figura 10).

Tuttavia, se le statine raggiungono la circolazione sistemica in una misura sufficiente per inibire la sintesi del colesterolo nei tessuti extraepatici, questo può portare a reazioni avverse come, ad esempio, danni muscolari.

L'inibizione della HMG-CoA reduttasi non solo diminuisce la sintesi del colesterolo, ma anche quella degli intermedi della sintesi del colesterolo come, ad esempio, l'ubichinone (CoQ₁₀) determinando una condizione di privazione di nutrienti mitocondriali e poiché questi intermedi sono importanti per il normale funzionamento cellulare, l'inibizione della loro sintesi può portare a disfunzione cellulare o addirittura alla morte cellulare, spiegando in parte la genesi delle reazioni avverse delle statine, come per esempio i sintomi muscolari associati alle statine (SAMS) [35].

Studi su modelli animali suggeriscono che l'ubichinolo potrebbe proteggere contro i danni muscolari indotti dalle statine, migliorando la funzione mitocondriale e riducendo i danni ossidativi [34].

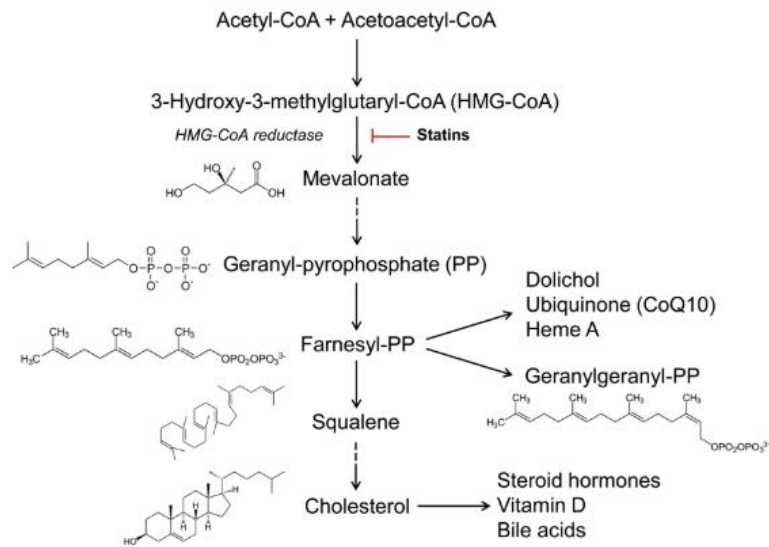


Figura 10. Via del Mevalonato

2. SCOPO DELLA TESI

L'esercizio fisico moderato ha numerosi effetti benefici sull'organismo poiché agisce a vari livelli su diversi processi molecolari e metabolici, ma anche perché produce basse dosi di stress ossidativo a cui l'organismo è in grado di rispondere adattandosi (omeostasi adattativa) [36].

Tuttavia, quando il carico di esercizio è troppo elevato (overtraining) e lo stress che ne deriva supera una certa soglia critica (soglia ormetica), si può incorrere in un danno ossidativo.

In questo contesto, lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di mettere a punto un sistema di elettrostimolazione *in-vitro* in grado di simulare un esercizio fisico ad alta intensità, utilizzando cellule muscolari scheletriche murine (C2C12) in coltura al fine di valutarne gli effetti su parametri di vitalità, salute mitocondriale e danno ossidativo.

Per indagare questo fenomeno, in collaborazione con il Laboratorio di Misure e Vibrazioni del Dipartimento di Ingegneria Industriale e Scienze Matematiche (DIISM) dell'Università Politecnica delle Marche, è stato progettato un sistema di stimolazione elettrica pulsata (EPS) che simulasse l'overtraining *in-vitro* mediante la messa a punto di un protocollo creato *ad hoc*.

Il sistema permette di indagare in modo rapido e ripetibile numerosi parametri che vanno dalla semplice rilevazione del fenomeno contrattile vero e proprio a parametri morfologici e funzionali, dalla vitalità/citotossicità all'accumulo di specie reattive e al danno ossidativo da quest'ultime provocato, fino a giungere all'attivazione dell'espressione di geni indotta dall'esercizio fisico stesso.

3. MATERIALI E METODI

3.1 LINEA CELLULARE

La linea cellulare impiegata nel presente lavoro di tesi è quella delle C2C12, ossia cellule muscolari immortalizzate derivanti da raddomiosarcoma murino.

Questa linea è costituita da cellule precursori del tessuto muscolare, i mioblasti (Figura 11), di piccole dimensioni e ad alto tasso di crescita, che possono differenziarsi in miotubi (Figura 12) quando vengono coltivate in appropriate condizioni, esprimendo marcatori specifici del tessuto muscolare come la miosina.

Le cellule C2C12 sono ampiamente utilizzate per studi di fisiologia muscolare, patologia muscolare, metabolismo energetico e regolazione dell'espressione genica durante il differenziamento muscolare.

Sono uno strumento prezioso per esplorare la biologia molecolare dei muscoli scheletrici, inclusi i meccanismi di risposta allo stress ossidativo, il metabolismo energetico mitocondriale e l'effetto di vari agenti farmacologici e molecolari sulle cellule muscolari.

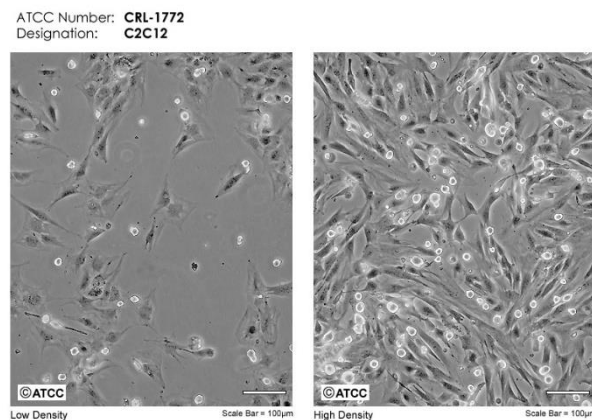


Figura 11. Mioblasti di C2C12, da sinistra rispettivamente al 50% e al 90% di confluenza (fonte ATCC)

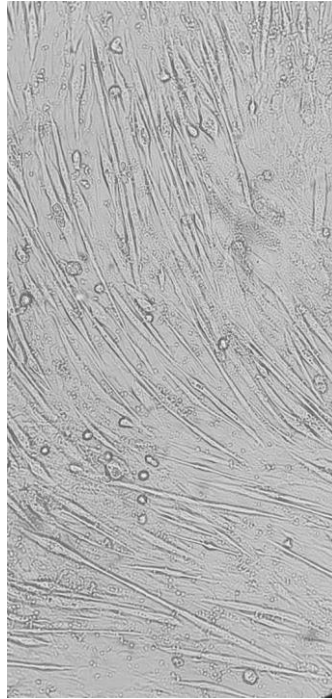


Figura 12. Figura 12. Miotubi differenziati di C2C12

3.2 MEZZI DI COLTURA

Le cellule non differenziate (mioblasti) sono state coltivate in DMEM High Glucose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) integrato con il 10% di fetal bovine serum (FBS) inattivato (30' a 56°C in bagnetto termostato), 1% di glutammina e 1% penicillina/streptomina.

Per il differenziamento delle cellule in miotubi, è stato utilizzato lo stesso mezzo di coltura integrato però con il 2% di fetal horse serum (FHS) inattivato (30' a 56°C in bagnetto termostato), 1% di glutammina e 1% penicillina/streptomina (Figura 13).



Figura 13. DMEM high glucose, Fetal Bovine Serum, Fetal Horse Serum, glutammina e penicillina/streptomina (GIBCO)

3.3 MANTENIMENTO DELLA COLTURA CELLULARE

Una volta scongelata la cryovial di cellule, preservata in azoto liquido, a 37°C in bagnetto termostato, le C2C12 sono state trasferite all'interno di una fiasca sterile da 25 o 75 cm², contenente rispettivamente o 6 o 10 ml di mezzo di coltura (DMEM 10% FBS) posta successivamente in un incubatore a 37°C in atmosfera controllata (5% di CO₂) fino al raggiungimento dell'70% di confluenza (3-4 giorni), in corrispondenza del quale le cellule sono state poi staccate e seminate in nuove fiasche per il mantenimento, attraverso un lavaggio in PBS, seguito dall'aggiunta di tripsina-EDTA per 5-7 minuti a 37°C e successiva neutralizzazione con mezzo completo (DMEM 10% FBS) in rapporto 1:3.

Ai fini dell'esecuzione del protocollo di stimolazione e delle successive analisi, i mioblasti sono stati seminati anche in piastre da 6-well in mezzo di coltura al 10% di FBS fino al raggiungimento del 90% di confluenza in corrispondenza del quale è stata effettuata l'induzione del processo di differenziamento mediante la sostituzione del mezzo di coltura con quello contenente siero di cavallo.

Le cellule sono state differenziate per almeno 5 giorni e non oltre i 7.

3.4 LA TECNICA DELL'ELECTRICAL PULSE STIMULATION (EPS)

L'EPS o stimolazione elettrica a impulsi, è una tecnica utilizzata in ambito biomedico e di ricerca per stimolare le cellule o i tessuti tramite impulsi elettrici.

Nel contesto di cellule muscolari come le C2C12, la stimolazione elettrica a impulsi viene spesso impiegata per mimare i segnali elettrici che si verificano durante la contrazione muscolare: essa è il risultato di un'eccitazione cellulare trasmessa al muscolo dal sistema nervoso centrale tramite le proprie fibre nervose per mezzo di impulsi elettrochimici.

La stimolazione elettrica (EPS) è in grado di indurre una contrazione sostituendosi agli impulsi organici, determinando dei potenziali d'azione a livello delle cellule eccitabili (nervose o muscolari), grazie all'utilizzo di una corrente elettrica prodotta autonomamente da un generatore.

La stimolazione indotta elettricamente agisce direttamente a livello periferico e la conseguente contrazione muscolare non è mediata dal sistema nervoso centrale, ma è provocata dal passaggio di corrente che, penetrando nel muscolo, induce uno stimolo di soglia, detto overshoot, con la conseguente depolarizzazione e contrazione muscolare.

Questa tecnica può essere utilizzata per studiare il comportamento contrattile delle cellule muscolari, il loro adattamento all'esercizio fisico o per indurre il differenziamento dei mioblasti in miotubi.

Durante la stimolazione, gli impulsi elettrici vengono applicati alle cellule attraverso elettrodi posizionati nell'ambiente di coltura: questi impulsi possono essere regolati in termini di frequenza, durata e intensità per ottenere gli effetti desiderati sulle cellule muscolari in coltura.

L'EPS può essere utilizzata in vari contesti, come lo studio della fisiologia muscolare, lo sviluppo di terapie per il ripristino della funzione muscolare in seguito a lesioni o malattie, o per valutare l'efficacia di farmaci e trattamenti sulla contrattilità muscolare (38, 39, 40, 41).

3.5 STRUMENTAZIONE PER LA STIMOLAZIONE ELETTRICA

La strumentazione utilizzata per effettuare la stimolazione dei miotubi è formata da una serie di componenti, da quelli che permettono il passaggio di corrente e la stimolazione vera e propria a quelli che consentono la visualizzazione e il monitoraggio dei miotubi durante tutto il periodo della contrazione:

- LabVIEW (Figura 14): software per applicazioni che hanno lo scopo di acquisire e analizzare dati, effettuare misure o controllo di processi.

Permette, in particolare, la creazione dell'onda necessaria per la stimolazione attraverso il collegamento di blocchi specializzati.

Consente inoltre di creare un'interfaccia utente di facile utilizzo e accesso;

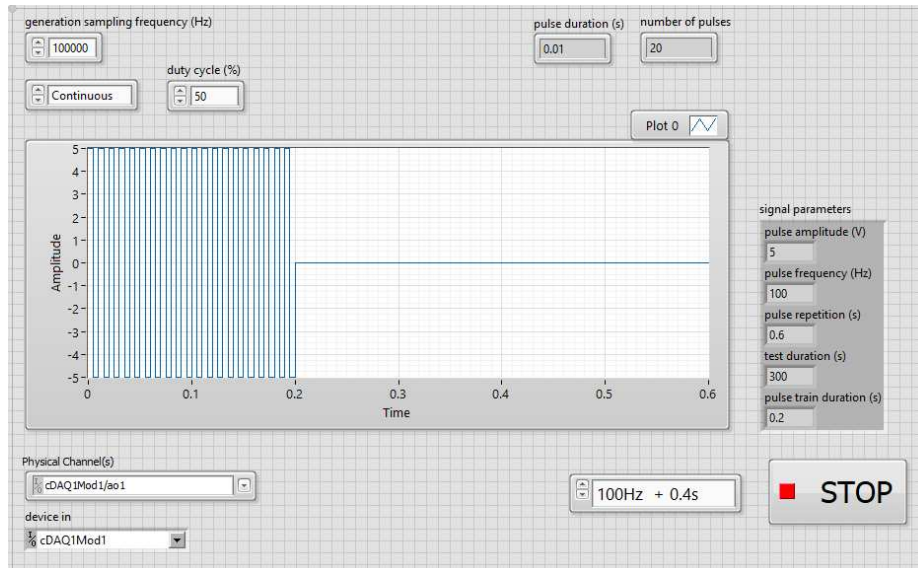


Figura 14. Lab VIEW

- MyDaq (Figura 15): un sistema di acquisizione dati portatile che, collegato al computer e attraverso LabVIEW, funge da generatore;



Figura 15. MyDaq

- Amplificatore di tensione (Figura 16): si occupa di amplificare il segnale in ingresso fino al valore desiderato;



Figura 16. Amplificatore di tensione

- Oscilloscopio (Figura 17): permette di visualizzare a schermo l'onda di tensione erogata nel dominio del tempo;

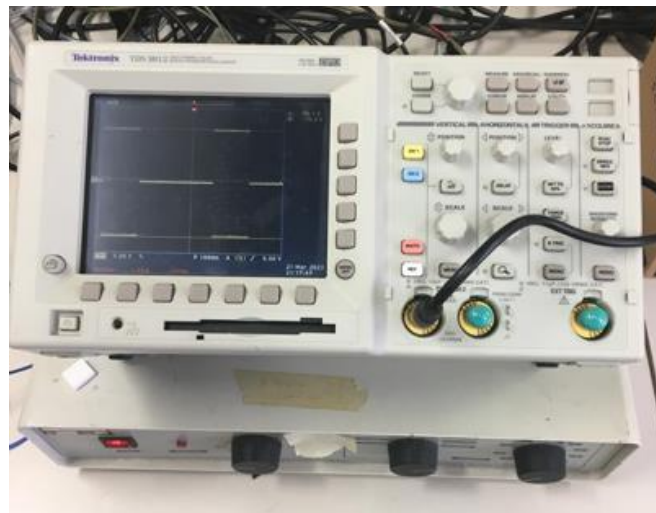


Figura 17. Oscilloscopio

- Piastra multiwell: la piastra utilizzata per la messa a punto del protocollo di stimolazione ad alta intensità. Per la sua realizzazione è stato utilizzato il coperchio di una piastra da 6-well, su cui sono stati creati due fori in corrispondenza di ogni pozzetto. Una coppia di elettrodi in grafite al 99%, di forma cilindrica o parallelepipedica, è stata quindi inserita e saldata all'interno ogni pozzetto. Gli elettrodi sono stati poi collegati a dei cavi elettrici mediante una guaina termo-restringente, così da assicurare la completa adesione tra le due parti (Figura 18,19).

Nella seconda fase degli esperimenti EPS, è stata utilizzata una piastra C-Dish della IonOptix® (Figura 20), progettata per garantire una stimolazione elettrica precisa e uniforme in ogni pozzetto;

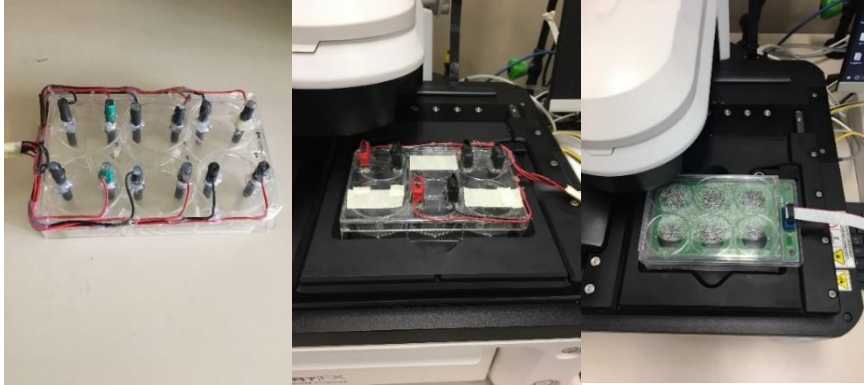


Figura 18. Piastra con elettrodi cilindrici Figura 19. Piastra con elettrodi a barre Figura 20. Piastra IonOptix

- BioTek LIONHEART FX (Figura 21): per la visualizzazione e il monitoraggio della contrazione è stato utilizzato questo microscopio automatizzato, che combina la capacità di imaging a diverse intensità di fluorescenza, sia in campo chiaro che con il contrasto di fase, in maniera variabile e con un design modulare.

Include funzioni di autofocus automatico, regolazione automatica dell'esposizione e controllo ambientale per la temperatura, l'umidità e la CO₂, permettendo l'imaging in tempo reale delle cellule vive in condizioni ottimali perchè in grado di riprodurre l'ambiente di un incubatore, in quanto lo strumento è stato collegato ad una bombola di CO₂ e la piastra scaldante di cui è provvisto consente di mantenere una temperatura costante di 37°C, assicurando un ambiente ideale per i miotubi durante la stimolazione.



Figura 21. BioTek LIONHEART FX

La figura 22 mostra l'insieme di tutte le componenti EPS impiegate per effettuare l'elettrostimolazione delle cellule muscolari scheletriche *in vitro*.

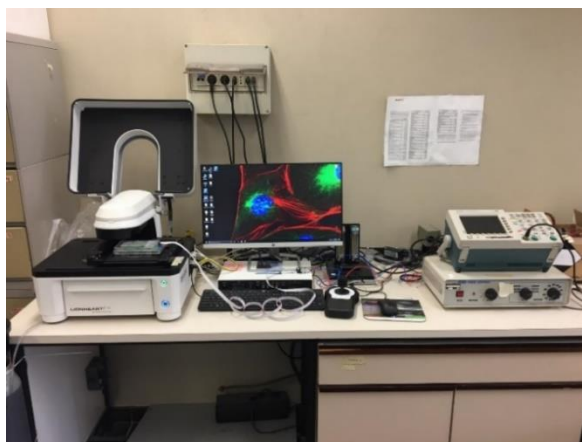


Figura 22. L'insieme di tutte le componenti EPS

3.6 ANALISI DELLA VITALITA' CELLULARE

Il PrestoBlue Cell Viability Reagent (ThermoFisher) (Figura 23) è una soluzione a base di resazurina che funge da indicatore di vitalità cellulare, utilizzando il potere riducente delle cellule viventi per misurare quantitativamente la proliferazione cellulare.

Quando viene aggiunto alle cellule, il reagente viene modificato dall'ambiente riducente delle cellule vitali assumendo una colorazione rossa e diventando altamente fluorescente.

Questo cambiamento di colore può essere rilevato mediante misurazioni di fluorescenza o assorbanza.



Figura 23. PrestoBlue

Il lattato deidrogenasi (LDH) è un enzima presente in quasi tutti i tessuti e svolge un ruolo cruciale nel metabolismo energetico, specificamente nella glicolisi anaerobica.

Il lattato deidrogenasi converte in maniera reversibile il piruvato in lattato, utilizzando NADH come cofattore (figura 24).

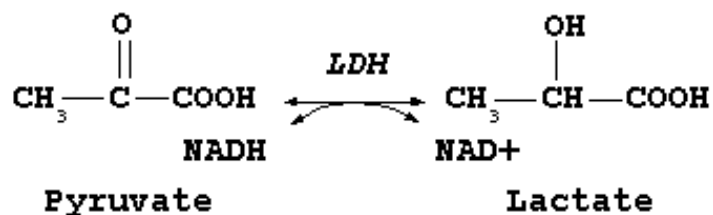


Figura 24. Reazione catalizzata dalla lattato-deidrogenasi (LDH)

3.6.1 PROTOCOLLO DEL PRESTOBLUE

Per l'analisi della vitalità cellulare il PrestoBlue è stato utilizzato a temperatura ambiente e diluito 1:10 in terreno DMEM Hg incompleto.

Inseguito alla rimozione del terreno esausto è stato effettuato un lavaggio con PBS e successivamente sono stati aggiunti 700 µl per well di PrestoBlue.

La piastra è stata quindi posta a incubare a 37°C per 15 minuti.

Al termine dell'incubazione, è stata eseguita la lettura della fluorescenza a 535 nm al lettore di piastra (Bio-Tek KC4™) (Figura 25) che risulta essere direttamente proporzionale alla vitalità cellulare, espressa in percentuale rispetto al campione di controllo.



Figura 25. Lettore di Piastra Bio-Tek KC4

3.6.2 PROTOCOLLO DELLA LDH

L'attività della LDH viene quantificata nei terreni di coltura cellulare come indice di mortalità, in quanto la concentrazione dell'enzima nel mezzo aumenta quando le cellule vanno in apoptosi.

Per analizzare il lattato deidrogenasi, è stato prelevato dapprima un campione di terreno di coltura da ciascun pozzetto sottoposto a due cicli di centrifugazione, uno a 1000 g a 4°C per 5 minuti e il successivo a 2000 g a 4°C per ulteriori 5 minuti, in modo da separare il pellet cellulare eventualmente presente nel terreno dal surnatante, dove invece è presente l'enzima.

Successivamente è stata preparata una mix composta da H₂O milliQ, Tris HCl 1 M + EDTA 5 mM pH 8.0 e NADH 2 mM, pesato e sciolto in H₂O milliQ e una soluzione di sodio piruvato 10 mM.

Su una piastra da 96-well sono stati quindi aggiunti 60 µl di campione, 210 µl di mix (150 µl di H₂O milliQ, 30 µl di NADH e 30 µl di Tris HCl + EDTA) e infine 30 µl di sodio piruvato, per un volume totale di 300 µl per pozzetto.

Una volta addizionato il sodio piruvato, dando inizio alla reazione descritta in figura 24, la 96-well è stata inserita nel lettore di piastra (Figura 25) ed è stata avviata la cinetica enzimatica con letture in assorbanza (scrivere i nm di assorbanza come hai fatto per il PrestoBlue) ogni 30 secondi, a 37°C per 30 minuti.

3.7 ANALISI DELLA PEROSSIDAZIONE LIPIDICA

L'analisi della perossidazione lipidica è stata eseguita mediante la metodica del saggio delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS).

Il saggio prevede la reazione dei prodotti della perossidazione lipidica, principalmente la malondialdeide (MDA), con l'acido tiobarbiturico (TBA), che porta alla formazione di complessi MDA-TBA₂ chiamati TBARS (Figura 26).

I TBARS producono un colore rosso-rosato che può essere misurato spettrofotometricamente a 532 nm.

I reagenti utilizzati per questo saggio sono stati: l'acido tricloroacetico al 20% (TCA) (4 grammi in 20 ml di H₂O deionizzata), una sostanza che fa precipitare le proteine; una miscela di TBA allo 0,67% e di butilidrossitoluene (BHT), un antiossidante, da pesare insieme con una goccia di etanolo per far sciogliere più facilmente il BHT (TBA 0,1 grammi e BHT 0,0016 grammi in 16 ml di H₂O deionizzata); e il trimetossipropano (TMP) 100 µM per preparare la retta standard.

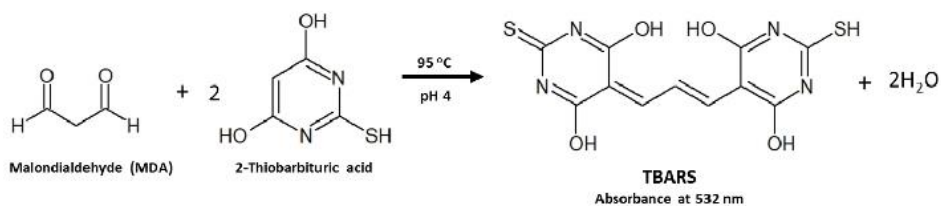


Figura 26. Reazione di formazione dei TBARS

3.7.1 PROTOCOLLO DEI TBARS

Le cellule sono state lisate utilizzando 220 μl di RIPA (volume utilizzato per tre pozzetti) con l'ausilio di uno scraper e infine, raccolte in una eppendorf.

I campioni sono stati poi centrifugati a 1000 rpm a 4°C per 1 minuto, sono stati raccolti 180 μl di surnatante (di cui 10 μl per il saggio delle proteine, BCA) e messi in ghiaccio.

La quantificazione è stata eseguita facendo riferimento ad una retta di taratura utilizzando come standard concentrazioni di albumina sierica bovina (BSA) (BLK; 0,39 $\mu\text{g/ml}$; 0,78 $\mu\text{g/ml}$; 1,56 $\mu\text{g/ml}$; 3,125 $\mu\text{g/ml}$; 6,25 $\mu\text{g/ml}$; 12,5 $\mu\text{g/ml}$; 25 $\mu\text{g/ml}$).

Dopo aver diluito l'acqua e il TMP, sono stati aggiunti i 200 μl di mix (TBA+BHT) e 60 μl di TCA, questi ultimi non solo nella retta, ma anche nei campioni.

Per far avvenire la reazione, la retta e i campioni sono stati messi a scaldare in un bagnetto termostato a 95°C per 45 minuti.

Il cambiamento di colore della soluzione all'interno delle eppendorf, che diventa rosso-rosato, indica che la reazione sta avvenendo; più il colore è intenso, più alta sarà la concentrazione di MDA e quindi la perossidazione lipidica.

Al termine dell'incubazione vi è un raffreddamento veloce in ghiaccio.

Ai campioni biologici sono stati poi aggiunti 500 μl di butanolo che, grazie a una ulteriore centrifuga a 3000 rpm a 4°C per 10 minuti, ha permesso di isolare la fase pura contenente MDA dal resto del campione.

Infine, 200 µl di ciascuna concentrazione della retta standard e di ognuno dei campioni biologici (in duplicato) è stato trasferito nei pozzetti di una 96 well ed è stata effettuata la lettura in assorbanza a 532 nm.

3.8 ANALISI DEI GRUPPI CARBONILICI

L'introduzione di gruppi carbonilici reattivi (PCO), principalmente aldeidi e chetoni, nella struttura di una proteina è definita "carbonilazione delle proteine".

La carbonilazione delle proteine include molte modifiche chimiche che avvengono attraverso diversi meccanismi di reazione.

La rilevazione e la quantificazione dei gruppi carbonilici proteici nei campioni biologici è un modo indiretto per determinare il livello di stress ossidativo.

Esistono molti metodi oggi utilizzati per valutare il contenuto delle proteine carbonilate, tra i quali il più impiegato si basa sull'utilizzo della 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH), originariamente sviluppato da Levine et al. [37]. Questa molecola reagisce con i gruppi carbonilici portando alla formazione di una molecola più stabile, la 2,4-dinitrofenilidrazone (DNP) (Figura 27).

Il gruppo dinitrofenile (DNP) può essere rilevato e quantificato spettrofotometricamente grazie al suo spettro di assorbimento tipico con un massimo a 365-375 nm.

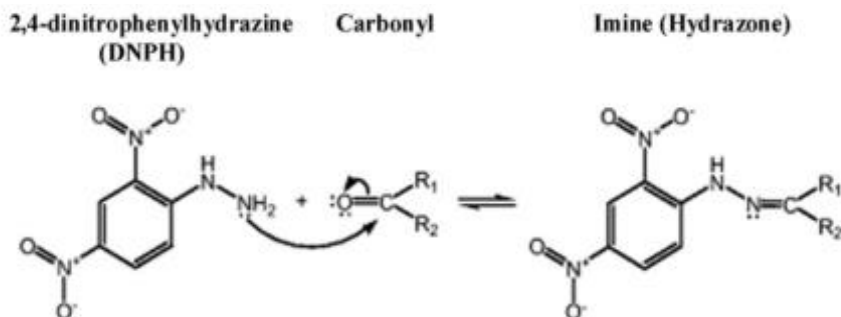


Figura 27. Reazione di carbonilazione delle proteine (DNPH-carbonile)

3.8.1 PROTOCOLLO DEI DNPH

Le soluzioni preparate per questo saggio sono state: 2,4-dinitrofenilidrazina 10 mM sciolta in HCl 2 M (0,01 grammi di DNPH in 5 ml), TCA, etanolo etil acetato e una miscela di guanidina cloridrato 6 M (GdmCl) (che denatura le proteine) e potassio fosfato monobasico 0,5 M (KH₂PO₄) (che mantiene stabile il pH) a pH 2,5 (2,86 grammi di GdmCl e 0,34 grammi di KH₂PO₄ in 5 ml di HCl 2 M).

Le membrane delle cellule sono state rotte utilizzando 300 µl di RIPA (volume per due pozzetti), staccate con uno scraper per raschiarle dal fondo del pozzetto e infine, raccolte in una eppendorf.

Le cellule raccolte sono state poi risospese con un vortex e centrifugate a 13000 g a 4°C per 10 minuti.

Dopo la centrifugazione, il surnatante è stato trasferito in nuove eppendorf. Sia per il controllo che per i campioni da misurare, è stato utilizzato lo stesso protocollo con la differenza che nei campioni da misurare è stato aggiunto il DNPH, mentre nel controllo l'HCl 2 M.

Dopo la centrifugazione, sono stati aggiunti nelle eppendorf 62,5 µl di campione lisato e 250 µl di DNPH (HCl nel caso del controllo), i campioni sono stati poi miscelati con il vortex e incubati per 60 minuti al buio a temperatura ambiente.

Dopo l'incubazione, sono stati aggiunti ai campioni 300 µl di TCA freddo, posti in ghiaccio per 10 minuti e poi centrifugati a 10000 g a 4°C per 15 minuti, scartando il surnatante.

Sono stati poi addizionati 625 µl di etanolo etil acetato, il pellet è stato lavato tramite inversione, centrifugato nuovamente a 10000 g a 4°C per 15 minuti e scartato il surnatante.

Sono stati in seguito aggiunti 300 µl della miscela GdmCl+KH₂PO₄ e i campioni sono stati incubati a 60°C per 15 minuti in un bagnetto termostato.

Infine, 250 µl di ciascuno dei campioni in duplicato, sono stati trasferiti nei pozzetti di una piastra 96-well ed è stata effettuata la lettura in assorbanza a 375 nm al lettore di piastra.

3.9 QUANTIFICAZIONE DELLE PROTEINE TOTALI

La determinazione della concentrazione delle proteine in campioni biologici è stata eseguita mediante un metodo colorimetrico come il saggio dell'acido bicinconinico (BCA assay).

Nel presente lavoro di tesi, la quantificazione delle proteine è stata utile ai fini della normalizzazione dei dati della LDH, dei TBARS e dei gruppi carbonilici.

Il saggio sfrutta il fenomeno di riduzione dello ione 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.

A seguito della chelazione di due molecole di acido bicinconinico con uno ione rameoso si ha una reazione colorimetrica con formazione di una soluzione di colore viola la cui intensità è stata rilevata tramite una lettura in assorbanza.

Le concentrazioni delle proteine dei campioni sono determinate sulla base di una curva standard allestita al momento delle analisi utilizzando albumina sierica bovina (BSA) a concentrazioni note.

Per eseguire il saggio, il pellet contenente il lisato proteico è stato diluito 10 volte in H_2O deionizzata, in una 96-well sono stati inseriti 25 µl di campione e di retta standard in duplicato, e 200 µl di Working Reagent (Thermo Scientific), ottenuto mescolando 50 parti del BCA Reagent A con 1 parte del BCA Reagent B (50:1, Reagent A: B).

Al termine dell'incubazione di 30 minuti a 37°C, è stata eseguita la lettura in assorbanza a 563 nm al lettore di piastra.

3.10 TRATTAMENTO CON STATINE

Il protocollo EPS messo nella presente tesi è stato testato anche su un modello cellulare di deprivazione di CoQ₁₀, ottenuto trattando i miotubi con statine, precisamente con simvastatina.

La simvastatina è un derivato semisintetico della lovastatina, che è un metabolita naturale prodotto da funghi come *Aspergillus terreus*.

Inizialmente è stata testata una scala di concentrazioni (0,6 µM, 1,5 µM, 2,5 µM, 5 µM e 6 µM) di simvastatina a tempi differenti di incubazione per trovare la condizione di deprivazione ideale.

Il trattamento è stato eseguito sia per 24 h e sia per 48 h a partire rispettivamente dal sesto giorno o dal quinto di differenziamento, in entrambi i casi fino al 7° giorno di differenziamento.

Al termine del trattamento è stata osservata la morfologia delle cellule, misurata sia la vitalità cellulare (mediante il protocollo della LDH) come descritto precedentemente che i livelli di Q₁₀ e Q₉, sia a 24 h e sia a 48 h mediante cromatografia liquida (HPLC) per mezzo di un detector elettrochimico (Shiseido).

3.11 ESTRAZIONE E QUANTIFICAZIONE DEI LIVELLI DI CoQ₉

Dopo le 24/48 h di trattamento con la simvastatina le cellule nelle 6 well sono state recuperate e trasferite in eppendorf mediante l'utilizzo di tripsina-EDTA precedentemente scaldata a 37°C e lasciata agire per 3-5 minuti e successivamente neutralizzata con mezzo di coltura in rapporto di 1:3.

Le eppendorf sono state trasferite subito in ghiaccio e centrifugate a 500 g per 5 min a 4°C.

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 μ l di pellet cellulare, ottenuto con una seconda centrifuga a 500 g per 5 minuti, alla quantificazione delle proteine totali mediante la metodica del BCA assay.

Le aliquote sono state conservate a -80°C fino al momento delle analisi.

La quantificazione del CoQ_9 , a livello cellulare, è stata eseguita, mediante l'impiego di un HPLC con rilevatore elettrochimico (ECD).

La sospensione cellulare (50 μ l), preservata a -80°C , è stata velocemente scongelata a temperatura ambiente e addizionata di propanolo (250 μ l) 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 CoQ , il campione è stato sottoposto a centrifugazione a 20.900 g per 2 minuti a 4°C .

Infine, 40 μ l di surnatante sono stati iniettati nell'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 3023 e di una valvola switch Shiseido M-3012 (Figura 28).

La peculiarità risiede nell'utilizzo di 3 colonne cromatografiche: una colonna concentrante Capcel I Pack C18 MG che permette di concentrare l'analita rendendolo più facilmente rilevabile, una colonna analitica Capcel I Pack C18 AQ (150 mm x 2 mm I.D.) che separa le molecole di interesse in virtù delle loro caratteristiche chimico fisiche, e una colonna riducente (OSAKA SODA CQ-R; 2.0 mm x 20 mm) che ha la funzione di ridurre le forme ossidate del CoQ_9 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 in funzione dei tempi di ritenzione (Figura 29).

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

- Fase mobile 1 [50 mM Sodio Perclorato in Metanolo/Acqua deionizzata (95/5, v/v) con flusso di 80 $\mu\text{l}/\text{min}$];
- Fase mobile 2 [50 mM Sodio Perclorato in Metanolo/Isopropanolo (70/30, v/v) con flusso di 240 $\mu\text{l}/\text{min}$] 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:

- Q_9 ridotto = 20,3 minuti
- Q_9 ossidato = 24,8 minuti

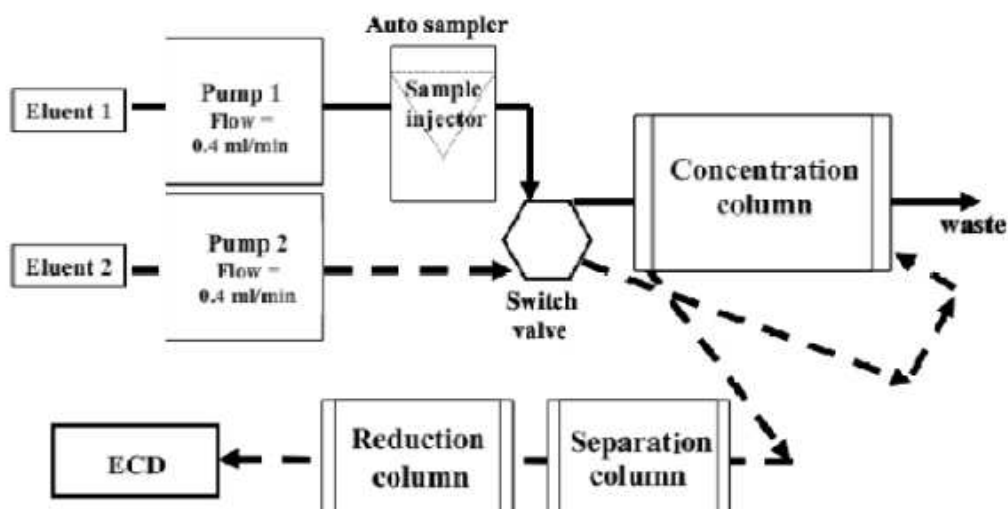


Figura 28. Schema di funzionamento del sistema HPLC-ECD

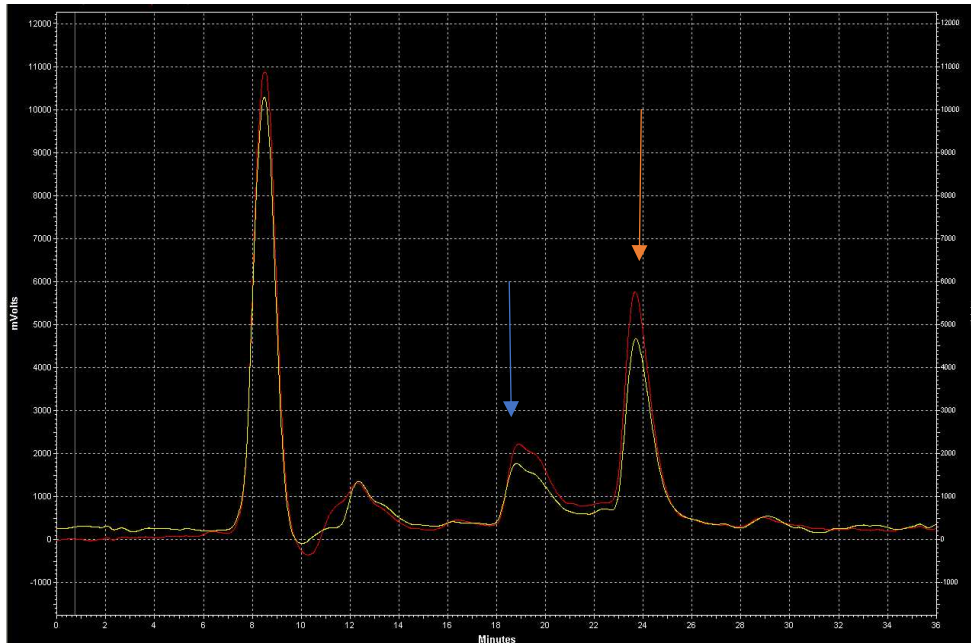


Figura 29. Esempio di cromatogramma ottenuto in seguito all'analisi HPLC-ECD di un campione di sospensione cellulare di C2C12 non trattate (in rosso) e di un campione di sospensione cellulare di C2C12 trattate con 0,6 μ M di simvastatina (in giallo). Si può osservare un calo sia del CoQ₉ ridotto (freccia blu) e sia del CoQ₉ ossidato (freccia arancione) delle cellule trattate con concentrazione di 0,6 μ M di simvastatina rispetto al campione di controllo.

3.12 ANALISI STATISTICA

Gli esperimenti sono stati condotti almeno in triplicato sperimentale e in duplicato tecnico.

I dati sono stati analizzati mediante il test statistico one-way ANOVA multiple comparison utilizzando il software Graphpad 8.4.2 (Graphpad Software, Inc., La Jolla, USA) e sono stati rappresentati come istogrammi che illustrano la media \pm la deviazione standard.

Le significatività delle variazioni tra i campioni sono state indicate mediante l'asterisco (*) o il dollaro (\$) e riportate come segue: (*; \$) $p < 0,05$; (**; \$\$) $p < 0,01$; (***; \$\$\$) $p < 0,001$; (****; \$\$\$\$) $p < 0,0001$.

4. RISULTATI

4.1 MESSA A PUNTO DEL PROTOCOLLO EPS AD ALTA INTENSITÀ

Il protocollo di stimolazione EPS (Electric Pulse Stimulation) è stato inizialmente messo a punto a partire da quelli sviluppati da Nikolic et al.

Gli autori hanno definito un protocollo di High Frequency, o ad alta intensità caratterizzato da treni di impulsi bipolari a 30 V, 100 Hz per 200 ms, somministrati ogni 5 secondi, per una durata di 5-60 minuti e uno detto di Low Frequency, o bassa intensità che prevedeva impulsi singoli, bipolari, di 2 ms, 30 V e 1 Hz per 24-48 h [38].

Nonostante questi protocolli siano stati utili a settare il sistema EPS, non si sono rivelati utili ad indurre uno stress intensivo in grado di simulare un esercizio fisico condotto in modalità overtraining in quanto, anche dopo 7 h di contrazione ininterrotta la vitalità dei miotubi è rimasta del 100%.

Al fine di mettere a punto un protocollo in grado di indurre disfunzione mitocondriale, pur mantenendo la vitalità cellulare al di sopra del 70%, sono state eseguite numerose prove.

In particolare, partendo dal protocollo di High Frequency descritto da Nikolic sono stati regolati di volta in volta i singoli parametri dell'onda quadra (da 1 Hz, 5 Hz, 10 Hz 30 Hz e 100 Hz a 30 V) fino a definirne una in grado di riprodurre un esercizio fisico esaustivo.

Come primo approccio alla messa a punto, è stato testato un protocollo di stimolazione "in continuo" (senza pausa tra un impulso elettrico e il successivo), caratterizzato da un unico impulso elettrico bipolare a 30 V.

Sono state eseguite diverse prove di stimolazione regolando solo la frequenza dell'impulso (da 1 Hz, 5 Hz, 10 Hz, 30 Hz a 100 Hz), facendo contrarre le cellule muscolari per 1 h.

Al termine di ciascuna delle prove è stata analizzata la vitalità cellulare a tempo zero, ossia subito dopo la fine della stimolazione.

Il grafico 1 mostra come questo parametro diminuisca significativamente in tutti i protocolli testati, tranne che per quello a 1 Hz, probabilmente troppo blando per causare un danno tale da ridurre la vitalità delle cellule.

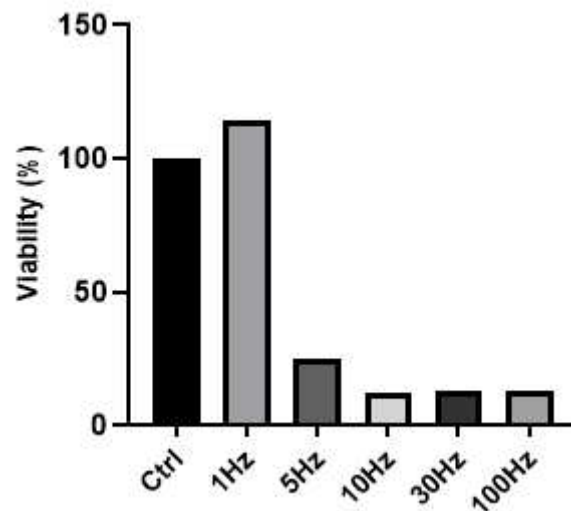


Grafico 1. Vitalità analizzata con PrestoBlue dopo EPS in continuo a diverse frequenze (1-5-10-30-100 Hz, 30 V per 1 h). L'esperimento è stato condotto in singolo per ciascuna frequenza

Al fine di mettere a punto un protocollo di esercizio fisico che simulasse l'overtraining, le prove successive sono state eseguite mantenendo costante la frequenza (treno di impulsi bipolari di 200 millisecondi a 100 Hz e 30V) ma introducendo delle pause tra un impulso e l'altro, di volta in volta più corte (1,2 s e 0,6 s), diversamente da quanto messo a punto da Nikolic et al (4,8 s di pausa).

L'analisi della vitalità cellulare effettuata al termine del periodo di contrazione, descritta nel grafico 2, sottolinea come diversamente da quanto mostrato sopra, non fosse la frequenza a danneggiare le cellule ma bensì l'assenza di pausa nel protocollo in continuo, registrando valori di vitalità paragonabili al controllo non elettrostimolato.

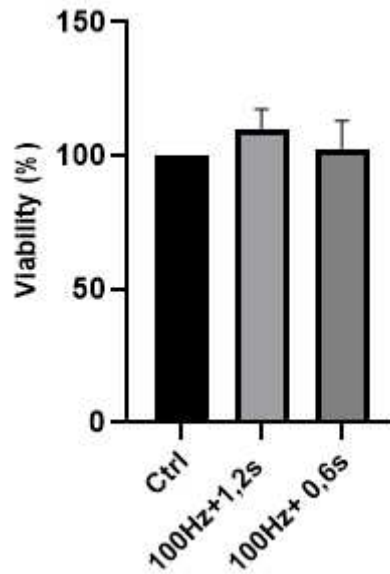


Grafico 2. Vitalità analizzata con PrestoBlue dopo EPS a 30 V, 100 Hz e pause di 1,2 s e 0,6 s

Dati i valori di vitalità ancora così molto elevati, successivamente sono state eseguite ulteriori prove riducendo di volta in volta il tempo di pausa tra un impulso elettrico e il successivo (0,5 s; 0,45 s; 0,4 s; 0,3 s; 0,2 s) (Grafico 3).

Oltre alla variazione dei tempi di pausa, è stato valutato anche l'allungamento del tempo di contrazione, da 1 h a 2 h per garantire una stimolazione più efficace, analizzando la vitalità non solo al termine del periodo di contrazione ma anche dopo 24 h di recovery.

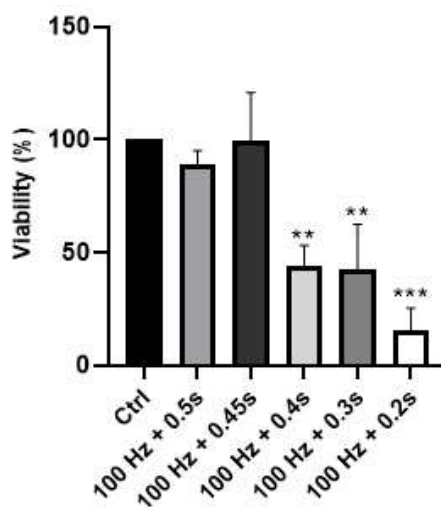


Grafico 3. Vitalità analizzata con PrestoBlue dopo 2 h di EPS a 30 V, 100 Hz a diverse pause (0,5-0,45-0,4-0,3-0,2 s) + 24 h di recovery. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ rispetto al campione non elettrostimolato (Ctrl)

Nel grafico 3 è possibile osservare una riduzione significativa della vitalità dopo 24 h di recovery rispetto al campione non elettrostimolato (Ctrl) a partire da 0,4 s di pausa (**p<0,01).

La diminuzione diventa altamente significativa in corrispondenza di 0,2 secondi di pausa (***p<0,001) con un valore di vitalità cellulare pari al 15,54% rispetto al controllo.

Questi dati sottolineano ancora una volta come l'introduzione e la variazione del tempo di pausa tra un impulso elettrico e l'altro sia in grado di modulare in maniera significativa la vitalità delle cellule muscolari scheletriche.

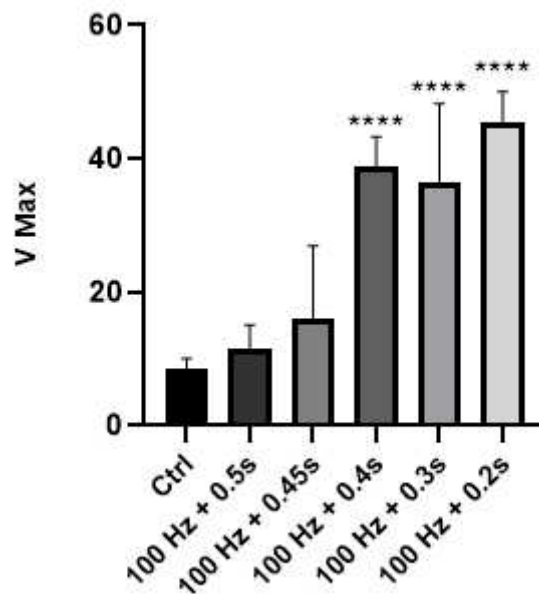


Grafico 4. Misurazione della velocità di reazione (V Max) dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH), dopo 2 h di EPS 30 V, 100 Hz a diverse pause (0,5-0,45-0,4-0,3-0,2 s) + 24 h di recovery. ****p<0,0001 rispetto al campione non elettrostimolato (Ctrl)

Oltre a livelli di vitalità tramite la metodica del PrestoBlue, sullo stesso set di esperimenti è stata valutata anche la percentuale di mortalità tramite l'analisi del rilascio dell'enzima lattico deidrogenasi (LDH) nel mezzo di coltura.

Il grafico 4 conferma come ad una diminuzione significativa della vitalità cellulare corrisponda un aumento altrettanto significativo della LDH a partire sempre da 0,4 s di pausa (****p<0,0001).

I risultati più ottimali e prossimi alla messa a punto di un protocollo di esercizio fisico esaustivo *in vitro* sono quelli relativi a 30 V, 100 Hz + 0,4 s o 0,3 s di pausa, con un tempo di contrazione di 2 h e analisi della vitalità e della mortalità cellulare dopo 24 h di recovery.

I grafici 5 e 6 confermano la significativa riduzione della vitalità e il corrispondente aumento della mortalità delle cellule rispetto al campione di controllo, senza alcuna differenza significativa tra i due protocolli per entrambi i parametri analizzati.

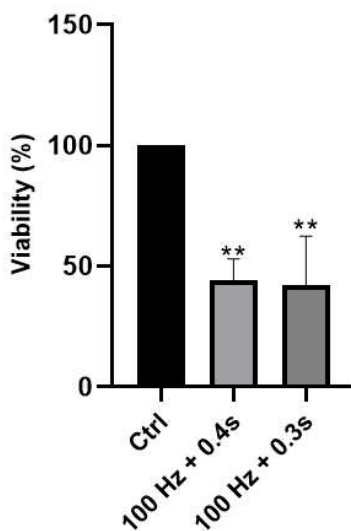


Grafico 6. Vitalità analizzata con PrestoBlue dopo 2h di EPS a 30 V, 100 Hz a 0,4 s e 0,3 s di pausa + 24 h di recovery. ** $p < 0,01$ rispetto al campione non elettrostimolato (Ctrl)

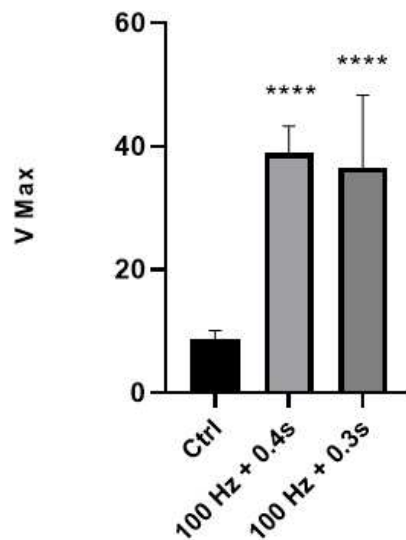


Grafico 5. Misurazione della velocità di reazione (V Max) dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH), dopo 2 h di EPS 30 V, 100 Hz a 0,4 s e 0,3 s pausa + 24 h di recovery. **** $p < 0,0001$ rispetto al campione non elettrostimolato (Ctrl)

Tenendo conto dei dati appena mostrati e considerando una variabilità più bassa registrata per il protocollo high frequency con 0,4 secondi di pausa, tutti i successivi parametri di ossidazione, utili a definire l'esercizio fisico esaustivo *in vitro*, sono stati valutati e descritti utilizzando un unico protocollo high frequency, ossia 30 V, 100 Hz con 0,4 secondi di pausa (Figura 14).

4.2 TRATTAMENTO CON STATINE: MODELLO DI MIOPATIA PER EPS

Al fine di riprodurre *in vitro* un esercizio fisico in overtraining, caratterizzato dall'induzione di disfunzione mitocondriale, non sufficientemente indotto dalla sola adozione del protocollo high frequency poc'anzi definito, è stato introdotto, in abbinamento a quest'ultimo, anche un modello di deprivazione di Coenzima Q (CoQ), mediante l'impiego di statine, nella fattispecie di simvastatina.

È noto, infatti, che le statine oltre a ridurre i livelli di colesterolo riducono anche la sintesi di CoQ₁₀ in quanto il pathway per la sintesi del colesterolo, la via del Mevalonato, è lo stesso del CoQ₁₀; quindi, bloccando questa via con la statina si avranno delle cellule con disfunzione mitocondriale [35].

A tal proposito, è stata dapprima testata sui miotubi una scala di simvastatina a diverse concentrazioni (0,6 µM; 1,5 µM; 2,5 µM; 5 µM; 6 µM) con tempi di incubazione di 24 h e di 48 h, con l'obiettivo di individuare una condizione in cui le cellule private di CoQ potessero mostrare una maggiore suscettibilità allo stress ossidativo indotto dal protocollo high frequency messo a punto (30 V, 100 Hz con 0,4 secondi di pausa).

Nel grafico 7 è possibile osservare come la vitalità delle cellule dopo 24 h di incubazione con simvastatina non sia significativamente diversa dal campione non trattato, diversamente dopo 48 h di trattamento (grafico 8), dove invece è stata registrata una riduzione altamente significativa già a partire dalla concentrazione più bassa di 0,6 µM di simvastatina (***) $p < 0,001$.

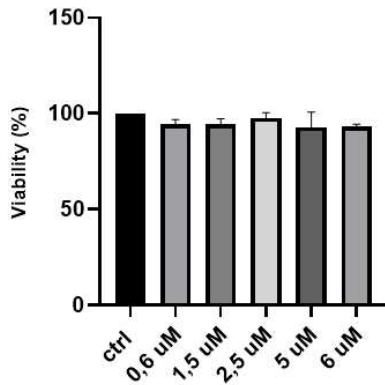


Grafico 7. Vitalità analizzata con PrestoBlue di C2C12 trattate con simvastatina per 24 h

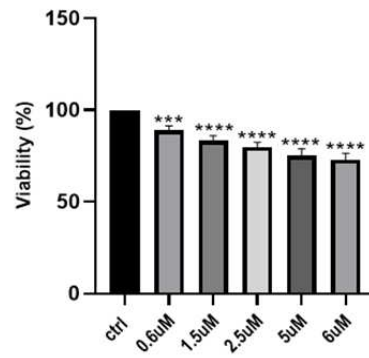


Grafico 8. Vitalità analizzata con PrestoBlue di C2C12 trattate con simvastatina per 48 h

Inoltre, sono state abbinare ai campioni dei grafici 7 e 8 anche la quantificazione del CoQ9 presente nelle C2C12, per capire quali sono, tra le concentrazioni della scala di statine usate, le concentrazioni più significative da usare per la disfunzione mitocondriale.

Infatti, nei grafici 9 e 10 possiamo osservare la quantificazione del CoQ9 delle C2C12 dopo trattamento a diverse concentrazioni note di statine (0,6 μM; 1,5 μM; 2,5 μM; 5 μM; 6 μM) con i tempi d' incubazione rispettivamente di 24 h e di 48 h.

Sia nel grafico 9 e sia nel 10 possiamo osservare che già dalla prima concentrazione i livelli di CoQ9 si abbassano rispetto al controllo, ma nel grafico 10, cioè dopo 48 h di trattamento con la scala di simvastatina, si abbassano in maniera significativa (*<0,05).

Inoltre, i livelli di CoQ9 rimangono stabili, cioè non si abbassano con l'aumentare della concentrazione di statina.

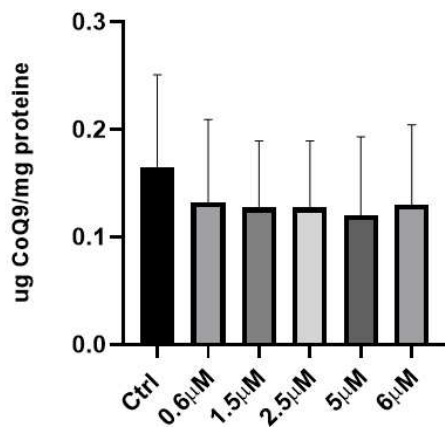


Grafico 8. Livelli di CoQ9 delle C2C12 trattate per 24 h con concentrazioni note di simvastatina

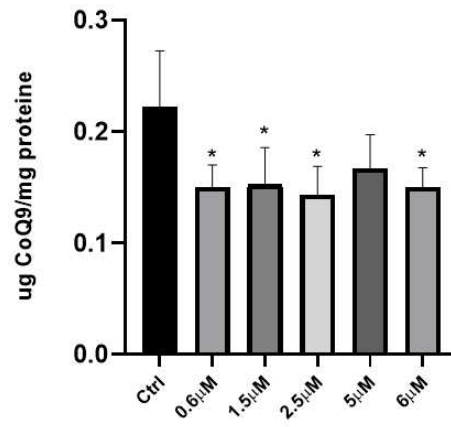


Grafico 10. Livelli di CoQ9 delle C2C12 trattate per 48 h con concentrazioni note di simvastatina

A seguito di queste prove e di considerazioni morfologiche elaborate e descritte nella figura 30 e nel grafico 10, le successive prove di elettrostimolazione sono state eseguite abbinando il protocollo high frequency a due sole concentrazioni di statina, ossia 0,6 e 2,5 μM di simvastatina, in quanto significative e morfologicamente più adatte.

Oltre alla vitalità cellulare, alle due suddette concentrazioni, è stata anche verificata la capacità dei miotubi (cellule differenziate) di contrarsi, sottoponendole al protocollo di high frequency messo a punto, nonostante la morfologia risultasse visivamente già molto compromessa, soprattutto alla concentrazione di 2,5 μM .

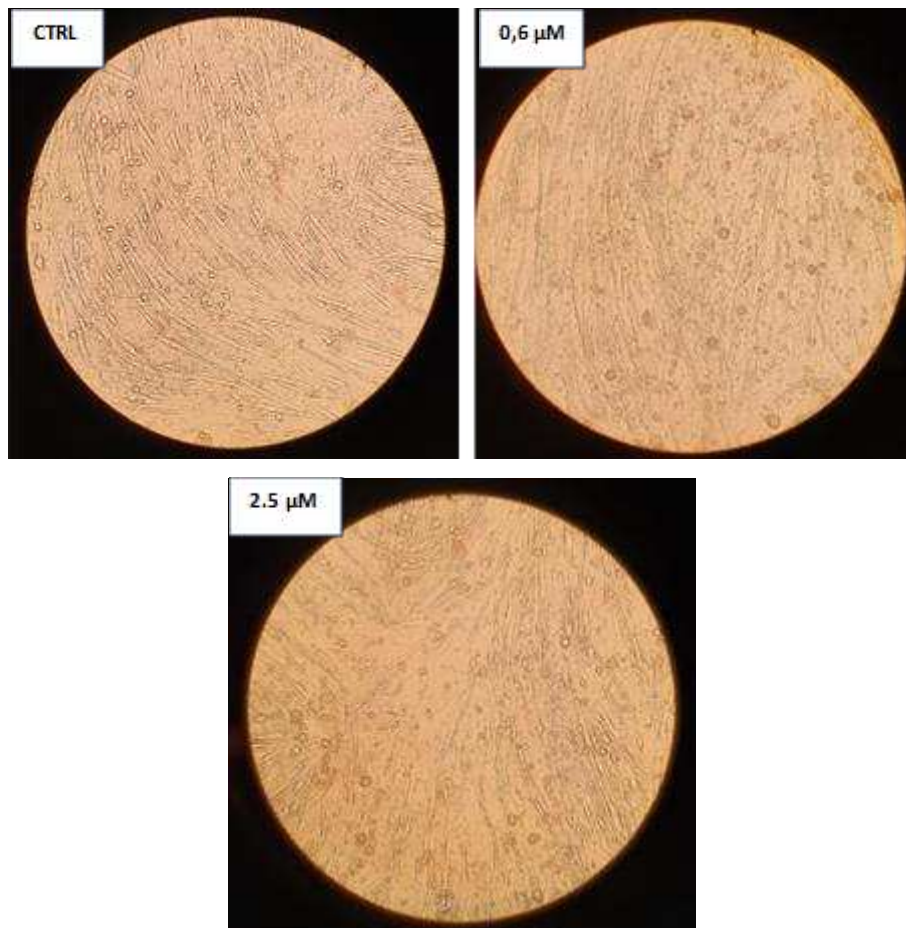


Figura 30. Miotubi trattati con concentrazioni di simvastatina di 0,6 μM e 2,5 μM e controllo

4.3 DANNO OSSIDATIVO

Successivamente all'analisi della vitalità cellulare e alla scelta delle due concentrazioni chiave di simvastatina da utilizzare per riprodurre il modello di deprivazione di coenzima Q, è stato valutato anche il danno ossidativo indotto dall'abbinamento dei due protocolli (EPS high frequency e modello di deprivazione) in termini di perossidazione lipidica e ossidazione delle proteine.

Al quinto giorno di differenziamento le cellule differenziate, sono state trattate prima con le due concentrazioni di simvastatina scelte (0,6 μM e 2,5 μM) per 48 h, e poi elettrostimolate con il protocollo EPS high frequency (30 V, 100 Hz con 0,4 s di pausa).

Il grafico 11, che mostra i livelli di LDH rilasciata nel mezzo di coltura, evidenzia come, la deprivazione indotta dalle statine, aumenti significativamente la mortalità dei miotubi sia rispetto al campione di controllo (Ctrl) sia rispetto al tempo zero (termine elettrostimolazione), dopo 24 h di recovery senza però registrare alcuna differenza significativa rispetto al campione di controllo sottoposto alla sola elettrostimolazione (EPS).

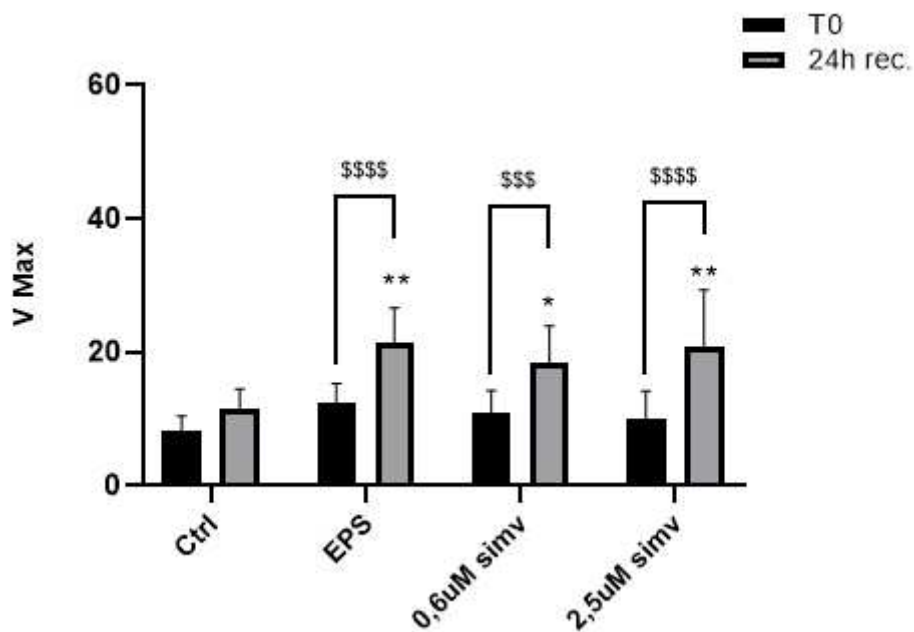


Grafico 9. Misurazione della velocità di reazione (V Max) dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH), dopo EPS 30 V, 100 Hz a 0,4 s di pausa a t0 e con 24 h di recovery. * $p < 0,05$ rispetto al campione non elettrostimolato a 24 h (Ctrl); ** $p < 0,01$ rispetto al campione no

Successivamente all'analisi della mortalità cellulare, sullo stesso tipo di trattamento è stato valutato anche il danno ossidativo causato dalla elettrostimolazione da sola o in abbinamento alle statine.

L'analisi della perossidazione lipidica tramite la metodica dei TBARS assay ha permesso di misurare l'ossidazione dei lipidi.

I grafici 12 e 13 mostrano i risultati relativi a questo parametro rispettivamente su campioni trattati solo con statine senza

elettrostimolazione e campioni trattati per 48 h con statine e successivamente sottoposte a protocollo high frequency.

Entrambi i grafici presentano un tempo zero (t0), che nei campioni con EPS corrisponde al momento in cui viene terminata l'elettrostimolazione, mentre nel caso dei campioni senza EPS corrisponde al momento in cui vengono tolte le statine, ossia dopo 48 ore di incubazione.

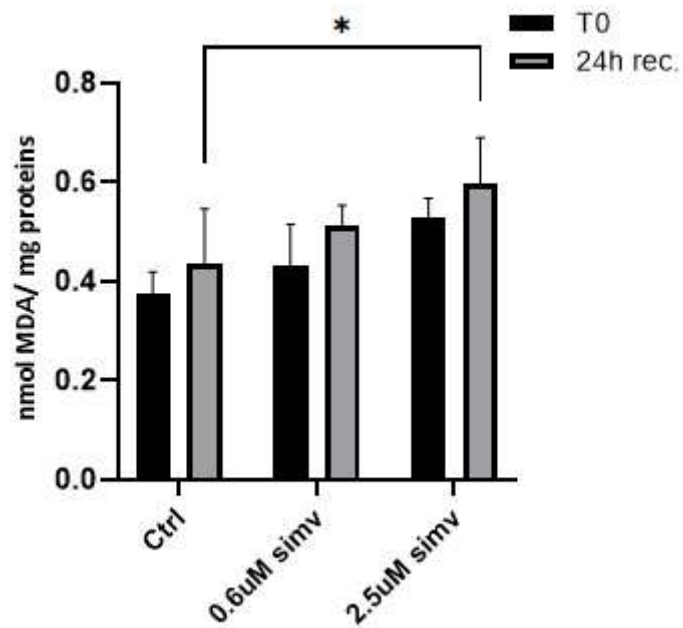


Grafico 10. Misurazione danno lipidico (TBARS) delle C2C12 trattate con concentrazioni di simvastatina di 0,6 μ M e 2,5 μ M senza EPS a t0 e a 24 h. * $p < 0,05$ rispetto al campione non stimolato a 24 h (Ctrl)

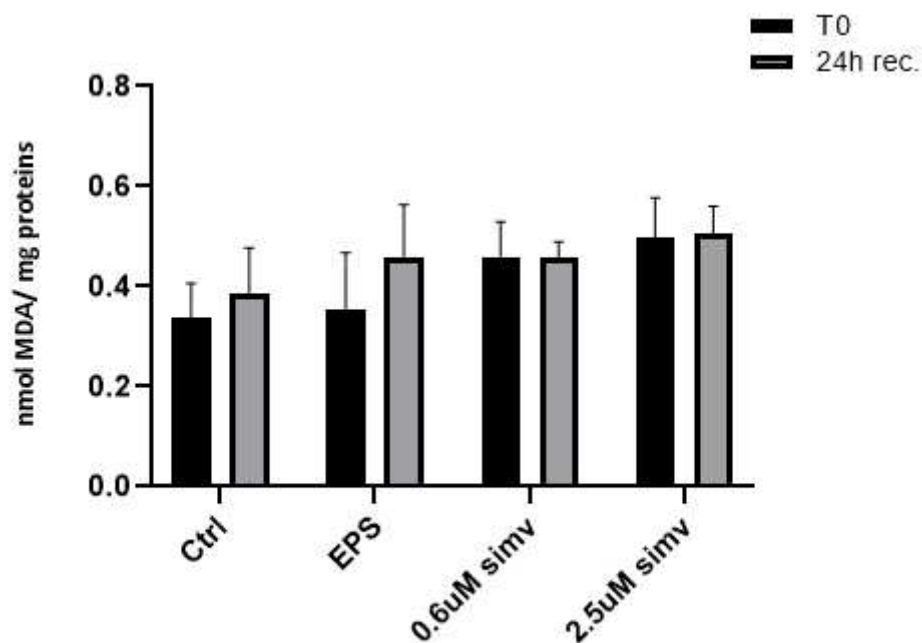


Grafico 11. Misurazione danno lipidico (TBARS) delle C2C12 trattate con concentrazioni di simvastatina di 0,6 µM e 2,5 µM dopo EPS 30 V, 100 Hz a 0,4 s di pausa a t0 e con 24 h di recovery. Non è stata rivelata nessuna significatività

I dati mostrano come il trattamento con la sola simvastatina determini un aumento significativo dei TBARS solo in corrispondenza della concentrazione più alta (* $p < 0,05$) e dopo 24 h di recovery.

L'elettrostimolazione delle cellule con protocollo high frequency dopo 48 h di trattamento con simvastatina mostra una tendenza in aumento dell'ossidazione lipidica al tempo zero, pur non essendo altrettanto significativo nè rispetto al controllo (Ctrl) nè rispetto al campione sottoposto alla sola elettrostimolazione (EPS), probabilmente dovuto all'alta variabilità biologica registrata durante gli esperimenti.

L'analisi del danno ossidativo è stata eseguita anche in termini di ossidazione delle proteine cellulari, valutata tramite la metodica del DNPH che misura le variazioni nella carbonilazione delle proteine, sia in seguito a 48 h di trattamento con le sole statine (grafico 14) che in aggiunta all'EPS high frequency (grafico 15).

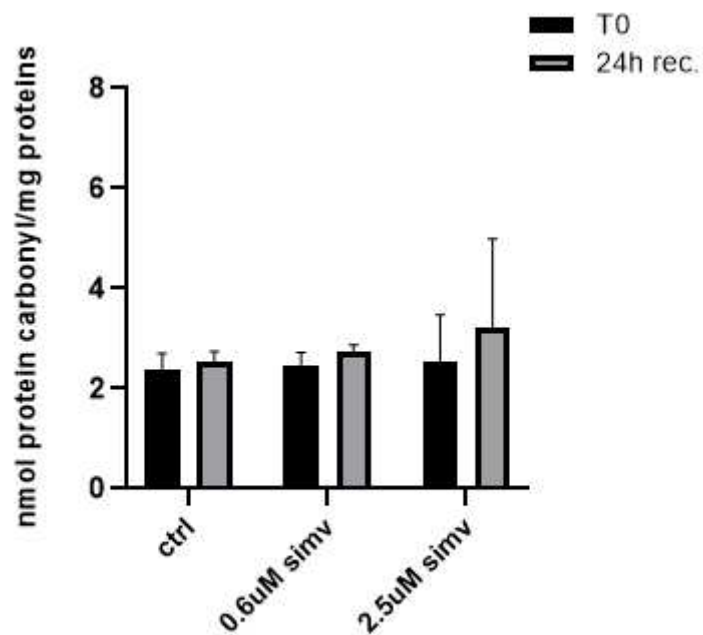


Grafico 12. Misurazione danno alle proteine (DNPH) delle C2C12 trattate con concentrazioni di simvastatina di 0,6 μ M e 2,5 μ M senza EPS a t0 e a 24 h. Non è stata rivelata nessuna significatività

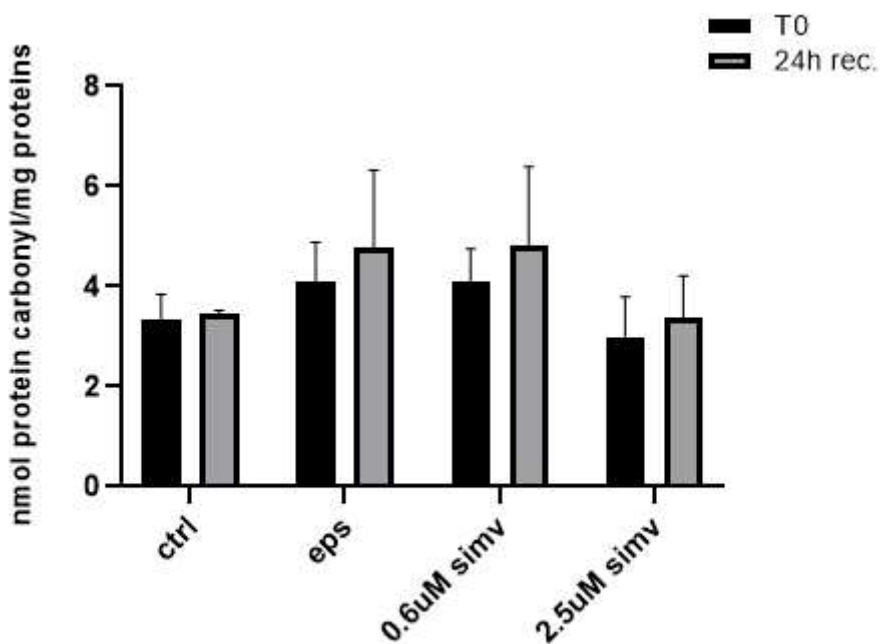


Grafico 13. Misurazione danno alle proteine (DNPH) delle C2C12 trattate con concentrazioni di simvastatina di 0,6 μ M e 2,5 μ M dopo EPS 30 V, 100 Hz a 0,4 s di pausa a t0 e con 24 h di recovery. Non è stata rivelata nessuna significatività

Entrambi i risultati illustrati nei grafici sopra mostrano solo una tendenza in aumento dell'ossidazione delle proteine, sia a tempo zero che dopo 24 h di recovery e sia in seguito al solo trattamento con statine che con l'abbinamento al protocollo di EPS high frequency, probabilmente non solo a causa dell'elevata variabilità biologica registrata tra gli esperimenti ma anche a causa della scarsa sensibilità del saggio impiegato per la misura. Ulteriori esperimenti si rendono necessari per approfondire questi aspetti, al fine di confermare in maniera significativa la tendenza osservata.

5. DISCUSSIONE

L'Electrical Pulse Stimulation (EPS) è una tecnica di stimolazione ampiamente utilizzata in ambito scientifico come strumento per simulare l'esercizio fisico *in-vitro*.

Sono numerosi i lavori scientifici in cui viene impiegato questo sistema e in ognuno di essi con particolari caratteristiche dell'onda quadra, della frequenza e durata dell'impulso, del voltaggio e della forma d'onda, in funzione del tipo, della durata e dell'intensità dell'esercizio fisico che si vuole riprodurre *in vitro* o se si vogliono indagare specifici fenomeni biologici legati o all'esercizio fisico stesso o alle interazioni fra cellule muscolari scheletriche e altri tessuti, come il tessuto adiposo [38-41].

Esistono studi che dimostrano come l'EPS possa incrementare la secrezione di vescicole extracellulari, promuovendo il differenziamento cellulare, come l'angiogenesi nelle cellule endoteliali e la lipolisi negli adipociti [39].

O ancora, l'EPS è stato impiegato per condurre indagini sull'aumento dell'assorbimento del glucosio in modelli di sindrome metabolica caratterizzati dalla presenza di insulino resistenza, sull'incremento dell'ossidazione lipidica [38], sull'ipertrofia muscolare [40], sulla riduzione del contenuto cellulare dei trigliceridi e sull'inibizione della re-esterificazione degli acidi grassi [41].

In ognuno di questi lavori vengono adottati specifici protocolli di elettrostimolazione spesso messi a punto "home made" o facendo ricorso a strumenti dedicati (IonOptix), evidenziando l'enorme versatilità e variabilità che al momento caratterizza l'utilizzo di questa particolare tecnica di ricerca.

In questo contesto, lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di mettere a punto un sistema di elettrostimolazione *in-vitro* in grado di simulare un esercizio fisico ad alta intensità, utilizzando cellule muscolari scheletriche murine (C2C12) in coltura, con l'obiettivo di valutarne gli effetti

su parametri di vitalità, salute mitocondriale e danno ossidativo e facendo riferimento a due precisi protocolli EPS, ideati da Nikolic et al. [34], ossia:

- **Protocollo High Frequency (Alta Frequenza):** caratterizzato da treni di impulsi bipolari a 30 V, 100 Hz per 200 ms, somministrati ogni 5 s, per una durata di 5/60 minuti;
- **Protocollo Low Frequency (Bassa Frequenza):** caratterizzato da impulsi singoli, bipolari, di 2 ms, a 30 V e 1 Hz, della durata di 24/48 h.

Questi protocolli sono stati fondamentali per configurare il sistema EPS del presente lavoro di tesi, ma non si sono dimostrati sufficienti a indurre un livello di stress ossidativo che simulasse un sovrallenamento (overtraining), come dimostra il fatto che, dopo 7 h di contrazione ininterrotta con il protocollo High Frequency, la vitalità dei miotubi è rimasta del 100%, probabilmente in risposta a un meccanismo di adattamento stimolato da bassi livelli di stress ossidativo (ormesi).

L'individuazione di un protocollo sufficientemente stressante tale da creare disfunzione mitocondriale prima e stress ossidativo dopo, simulando quindi un esercizio fisico esaustivo, ha richiesto la modifica progressiva dei parametri dell'onda quadra, come la frequenza, la durata dei periodi di riposo muscolare tra una contrazione e l'altra, nonché la durata totale del trattamento di elettrostimolazione.

In particolare, è stata valutata in termini di vitalità cellulare quale fosse l'effetto di stimolazione di un'onda elettrica bipolare a 30V e a diverse frequenze (1-5-10-30-100 Hz) in continuo, ossia senza treni di impulsi e senza pause, per una durata totale di 1 h.

La vitalità cellulare, analizzata mediante PrestoBlue, è stata misurata a tempo zero, cioè subito dopo la fine della stimolazione mostrando una diminuzione significativa già alla frequenza di 5 Hz, probabilmente a causa dell'assenza di periodi di riposo tra una contrazione e l'altra, condizione che viene biologicamente definita di *tetano*, un processo fisiologico caratterizzato dall'accumulo di una serie di potenziali di azioni che vengono

trasmessi in un breve periodo di tempo, provocando una contrazione muscolare sostenuta e prolungata.

I risultati ottenuti hanno portato ad escludere l'utilizzo di un protocollo di elettrostimolazione in continuo, fatta eccezione che per la frequenza a 1 Hz che è stata l'unica in grado di preservare la vitalità delle cellule, paragonabile appunto a quella del controllo non stimolato.

Mantenendo invariati i treni di impulso bipolari di 200 ms a 100 Hz e 30V, come suggerito da Nikolic et al., al fine di indurre un danno ossidativo da sovrallenamento, è stato analizzato l'effetto, sempre in termini di vitalità cellulare, della progressiva riduzione del tempo di riposo tra un treno di impulso e l'altro, diversamente da come proposto dagli stessi autori che nel protocollo high frequency hanno adottato una pausa pari a 4,8 secondi.

Inizialmente, sono stati testati protocolli con pause di 1,2 s e 0,6 s per 1 h ciascuno, ma nonostante la riduzione delle pause, la vitalità delle cellule è rimasta simile o addirittura superiore a quella del controllo non stimolato con EPS.

Solo riducendo ulteriormente e progressivamente i tempi di pausa da 0,5 fino a 0,2 secondi, mantenendo costante la frequenza a 100 Hz e il voltaggio a 30 V e prolungando la durata totale della stimolazione da 1 a 2 h, dopo 24 h di recovery è stata registrata una diminuzione altamente significativa della vitalità cellulare e parallelamente un aumento della mortalità cellulare in termini di rilascio dell'enzima lattato deidrogenasi, in entrambi i casi già a partire da 0,4 secondi di pausa.

Sulla base dei dati appena discussi e mostrati nel capitolo dei risultati (grafici 3 e 4), il protocollo adottato per simulare l'esercizio fisico esaustivo è stato quello a 30 V, 100 Hz, caratterizzato da un treno di impulsi bipolari che si ripete ogni 0,4 secondi di pausa.

La diminuzione altamente significativa della vitalità cellulare (65,79 %) ha però messo in evidenza anche un altro aspetto, legato all'eccessivo danno ossidativo indotto dal protocollo stesso, tale da far registrare valori di vitalità

ben lontani da quelli attesi (non al di sotto del 70%), paragonabili cioè ad una condizione di sub-letalità.

A tal proposito, al fine di raggiungere tale condizione e per ridurre anche l'alta variabilità sperimentale osservata, al protocollo EPS high frequency messo a punto è stato abbinato un modello di deprivazione di Coenzima Q (CoQ).

Il modello di deprivazione è stato creato mediante l'impiego di statine con l'obiettivo di indurre una disfunzione mitocondriale, tale da preservare da un lato la vitalità cellulare e inducendo dall'altro un danno ossidativo paragonabile a quello generato da un esercizio fisico esaustivo.

È noto infatti che le statine, oltre a ridurre i livelli di colesterolo riducono anche la sintesi di CoQ in quanto il pathway per la sintesi del colesterolo, la via del Mevalonato, è lo stesso del CoQ.

Diversi studi hanno dimostrato come la statina, inibendo l'attività dell'HMGCoA reduttasi, potrebbe indurre stress ossidativo, aumentando la produzione di ROS favorendo quindi l'insorgenza di disfunzione mitocondriale [35, 43, 44] e provocando inoltre anche danni ossidativi alle membrane cellulari in seguito alla riduzione di CoQ.

I miotubi sono stati quindi trattati con una scala di concentrazioni di simvastatina (0,6-1,5-2,5-5-10 μ M) per un periodo di 24 h o 48 h con lo scopo di individuare quali concentrazioni e tempistiche fossero più efficaci per ottenere una diminuzione significativa dei livelli di Q, senza compromettere la capacità contrattile delle cellule.

I risultati ottenuti dopo 48 h di trattamento hanno evidenziato una diminuzione significativa dei livelli di Q e della vitalità già a partire dalla concentrazione più bassa di 0,6 μ M di simvastatina (Grafico 10), suggerendo quindi un possibile impatto negativo anche sulla funzionalità mitocondriale, legato alla riduzione di un componente fondamentale della catena di trasporto degli elettroni lungo la catena respiratoria mitocondriale.

Un'ulteriore evidenza del danno ossidativo indotto dalla statina a livello della funzionalità mitocondriale è stata la diminuzione dell'efficienza di contrazione.

Le cellule trattate con statina si contraevano meno e per tempi inferiori rispetto al controllo non trattato (circa 1 h e 30' per il controllo contro circa 50' per le statine).

Inoltre, lo stress provocato dall'EPS aggiunto a quello del trattamento con statine, ha significativamente aumentato la mortalità, non solo dopo 24 h di recovery rispetto al proprio controllo a t0, ma anche rispetto al controllo senza EPS, sottolineando una possibile amplificazione del danno ossidativo dovuta semplicemente alla combinazione dei due trattamenti.

La definizione del danno ossidativo indotto dall'utilizzo combinato dei due sistemi (EPS High Frequency + DEPRIVAZIONE DI CoQ) è stata ulteriormente approfondita valutando anche altri due aspetti, come la perossidazione lipidica e l'ossidazione delle proteine, rispettivamente con il saggio dei TBARS e con quello del DNPH.

Nonostante sia stato possibile osservare una tendenza in aumento nell'ossidazione dei lipidi, essa è risultata significativamente più alta rispetto al controllo non trattato, dopo 24 h di recovery, solo in seguito al trattamento con 2,5 µM di statina, in assenza di elettrostimolazione (grafici 12 e 13), sottolineando diversi aspetti come la persistenza dell'alta variabilità sperimentale del sistema, la scarsa sensibilità del saggio impiegato o un possibile effetto adattativo generato dalla combinazione dei due sistemi (EPS + DEPRIVAZIONE DI CoQ).

È noto, infatti, che le statine a basse concentrazioni siano in grado di generare un signaling radicalico tale da indurre un effetto ormetico che stimola i sistemi di difesa antiossidanti della cellula, rendendola quindi più resistente agli insulti ossidativi [35, 42].

Parallelamente, anche la valutazione dell'ossidazione delle proteine ha fatto registrare lo stesso andamento, al momento senza alcun aumento significativo, probabilmente legato agli stessi aspetti poc'anzi discussi.

Questi risultati suggeriscono che, la combinazione dei due trattamenti (EPS + DEPRIVAZIONE DI CoQ) sembra essere in grado di diminuire significativamente la vitalità cellulare, aumentando parallelamente il rilascio di lattato deidrogenasi nel mezzo di coltura delle cellule, come chiaro sintomo di sofferenza cellulare.

Allo stesso tempo, i marcatori di danno ossidativo presi in considerazione nel presente lavoro di tesi, come la perossidazione lipidica e l'ossidazione delle proteine, non sembrano essere coinvolti dal danno ossidativo indotto dalla combinazione dei due protocolli, probabilmente a causa dell'alta variabilità sperimentale legata al processo di differenziamento delle cellule muscolari scheletriche ma anche al sistema EPS "home made" messo a punto, che richiede il controllo di numerosi aspetti tecnici che al momento non sono tenuti sotto controllo.

Inoltre, la scarsa sensibilità dei saggi impiegati potrebbe aver sottostimato il danno ossidativo effettivamente indotto dai due trattamenti.

Il protocollo messo a punto, nonostante possa rappresentare un valido modello per testare l'efficacia dei protocolli di esercizio fisico in abbinamento all'utilizzo di nutrienti mitocondriali come il Coenzima Q, volti a contrastare la disfunzione mitocondriale indotta da condizioni non fisiologiche come l'overtraining, la sindrome metabolica, l'insulino-resistenza o la senescenza, richiede un'ulteriore ottimizzazione, sia degli aspetti tecnici che di quelli biochimici al fine di renderlo replicabile e quindi applicabile in vari contesti di ricerca scientifica.

6. CONCLUSIONE

In conclusione, l'obiettivo del presente lavoro di tesi era la messa a punto di un protocollo di elettrostimolazione *in vitro*, su cellule muscolari scheletriche, che simulasse il danno ossidativo indotto da un esercizio fisico condotto ad alta intensità, per testare l'efficacia antiossidante di nutrienti mitocondriali come il coenzima Q₁₀ o simili.

Nonostante il sistema risulti ancora molto precario, a causa dell'alta variabilità sperimentale riscontrata, i risultati ottenuti dal presente lavoro di tesi rappresentano un buon punto di partenza per la sua ottimizzazione, sia dal punto di vista tecnico che biochimico.

A tal proposito, la prosecuzione dello studio prevederà il trasferimento delle informazioni finora acquisite su un modello di cellule immortalizzate umane di muscolo scheletrico, il miglioramento di aspetti tecnici prettamente legati al protocollo di high frequency e l'esplorazione di tecniche biochimiche innovative in grado di sottolineare il danno ossidativo indotto dal sistema di elettrostimolazione da solo o in combinazione con altri modelli come quello di deprivazione del coenzima Q testato nel presente progetto di tesi.

Il sistema replicabile e ottimizzato sarà quindi utilizzato per testare l'efficacia antiossidante di svariati nutrienti mitocondriali sul muscolo scheletrico, l'organo principalmente coinvolto nei meccanismi di signaling generati dall'esercizio fisico.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] Kristjana Dhuli, Zakira Naureen, Maria Chiara Medori, Francesco Fioretti, Paola Caruso, Marco Alfonso Perrone, Marsida Bushati, Dhurata Bozo, Stephen Thaddeus Connelly, Karen L Herbst, Matteo Bertelli. Physical activity for health. *J Prev Med Hyg.* 2022 Oct 17;63 (2 Suppl 3): E150-E159. Doi:10.15167/2421-4248/jpmh2022.63.2S3.2756. e Collection 2022 Jun.
- [2] Jonathan Myers, Manish Prakash, Victor Froelicher, Dat Do, Sara Partington, J Edwin Atwood. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *N Engl J Med.* 2002 Mar 14;346(11):793-801. doi: 10.1056/NEJMoa011858.
- [3] H Gaenzer, W Sturm, G Neumayr. Effects of walking on coronary heart disease in elderly men. *Circulation.* 2000 Jul 11;102(2): E16. doi: 10.1161/01.cir.102.2.e16.
- [4] Scott K. Powers, Rafael Deminice, Mustafa Ozdemir, Toshinori Yoshihara, Matthew P. Bomkamp, Hayden Hyatt. Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe? *J Sport Health Sci.* 2020 Sep;9(5):415-425. doi: 10.1016/j.jshs.2020.04.001. Epub 2020 May 4.
- [5] Claire Laurens, Audrey Bergouignan and Cedric Moro. Exercise-Released Myokines in the control of Energy Metabolism. *Front Physiol.* 2020 Feb 13;11:91. doi: 10.3389/fphys.2020.00091. eCollection 2020.
- [6] Jun Ma, Ken Chen. The role of Irisin in multiorgan protection. *Mol Biol Rep.* 2021 Jan;48(1):763-772. doi: 10.1007/s11033-020-06067-1. Epub 2021 Jan 3.
- [7] Unai Galicia-Garcia, Asier Benito-Vicente, Shifa Jebari, Asier Larrea-Sebal, Haziq Siddiqi, Kepa B. Uribe, Helena Ostolaza and César Martín. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci.* 2020 Aug 30;21(17):6275. doi: 10.3390/ijms21176275.

- [8] Morgan WP. Affective beneficence of vigorous physical activity. *Med Sci Sports Exerc.* 1985 Feb; 17:94-100. doi.org/10.1249/00005768-198502000-00015
- [9] Martinsen EW. Physical activity and depression: clinical experience. *Acta Psychiatr Scand* 1994;377 Suppl:23-7. doi: 10.1111/j.1600-0447.1994.tb05797.x.
- [10] Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015; 4:180-3. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002. Epub 2015 Jan 3. PMID: 25588755; PMCID: PMC4309861.
- [11] Senoner T, Dichtl W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? *Nutrients.* 2019 Sep 4;11(9):2090. doi: 10.3390/nu11092090. PMID: 31487802; PMCID: PMC6769522.
- [12] Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov.* 2013 Dec;12(12):931-47. doi: 10.1038/nrd4002. PMID: 24287781.
- [13] Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. Oxidative stress and male infertility. *Nat Rev Urol.* 2017 Aug;14(8):470-485. doi: 10.1038/nrurol.2017.69. Epub 2017 May 16. PMID: 28508879.
- [14] Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 2006 Oct 19;443(7113):787-95. doi: 10.1038/nature05292. PMID: 17051205.
- [15] N.V. Margaritelis, V. Paschalis, A.A. Theodorou, A. Kyparos, M.G. Nikolaidis. Redox basis of exercise physiology. *Redox Biol.* 2020 Aug;35:101499. doi: 10.1016/j.redox.2020.101499. Epub 2020 Mar 10.
- [16] F.H. Andrade, M.B. Reid, D.G. Allen, H. Westerblad, Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse, *J. Physiol.* 509 (Pt 2) (1998 Jun 1) 565–575. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.565bn.x.
- [17] Kelsey H Fisher-Wellman, P Darrell Neufer. Linking mitochondrial bioenergetics to insulin resistance via redox biology. *Trends Endocrinol*

Metab. 2012 Mar;23(3):142-53. doi: 10.1016/j.tem.2011.12.008. Epub 2012 Feb 2.

[18] Tony Tiganis. Reactive oxygen species and insuline resistance: the good the bad and the ugly. Trends Pharmacol Sci. 2011 Feb;32(2):82-9. doi: 10.1016/j.tips.2010.11.006. Epub 2010 Dec 14.

[19] J.D. Trinity, R.M. Broxterman, R.S.3 Richardson, Regulation of exercise blood flow: role of free radicals, Free Radic. Biol. Med. 98 (2016 Sep) 90–102. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.01.017. Epub 2016 Feb 10.

[20] L. Gliemann, M. Nyberg, Y. Hellsten, Nitric oxide and reactive oxygen species in limb vascular function: what is the effect of physical activity? Free Radic. Res. 48 (1) (2014 Jan) 71–83. doi: 10.3109/10715762.2013.835045. Epub 2013 Oct 7.

[21] S.L. Choi, S.J. Kim, K.T. Lee, J. Kim, J. Mu, M.J. Birnbaum, S. Soo Kim, J. Ha, The regulation of AMP-activated protein kinase by H₂O₂, Biochem. Biophys. Res. Commun. 287 (1) (2001 Sep 14) 92–97. doi: 10.1006/bbrc.2001.5544.

[22] Y. Makanae, S. Kawada, K. Sasaki, K. Nakazato, N. Ishii, Vitamin C administration attenuates overload-induced skeletal muscle hypertrophy in rats, Acta Physiol. 208 (1) (2013 May) 57–65. doi: 10.1111/apha.12042. Epub 2013 Jan 28.

[23] A.E. Handayaningsih, G. Iguchi, H. Fukuoka, H. Nishizawa, M. Takahashi, M. Yamamoto, E.H. Herningtyas, Y. Okimura, H. Kaji, K. Chihara, S. Seino, Y. Takahashi, Reactive oxygen species play an essential role in IGF-I signaling and IGF-I-induced myocyte hypertrophy in C2C12 myocytes, Endocrinology 152 (3) (2011 Mar) 912–921. doi: 10.1210/en.2010-0981. Epub 2011 Jan 14.

[24] N. Ito, U.T. Ruegg, A. Kudo, Y. Miyagoe-Suzuki, S. Takeda, Activation of calcium signaling through Trpv1 by nNOS and peroxynitrite as a key trigger of skeletal muscle hypertrophy, Nat. Med. 19 (1) (2013 Jan) 101–106. doi: 10.1038/nm.3019. Epub 2012 Dec 2.

[25] S. Roy, S. Khanna, C.K. Sen, Redox regulation of the VEGF signaling path and tissue vascularization: hydrogen peroxide, the common link between physical exercise and cutaneous wound healing, Free Radic. Biol. Med. 44 (2)

(2008 Jan 15) 180–192. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.025. Epub 2007 Jan 19.

[26] S.C. Bir, G.K. Kolluru, K. Fang, C.G. Kevil, Redox balance dynamically regulates vascular growth and remodeling, *Semin. Cell Dev. Biol.* 23 (7) (2012 Sep) 745–757. doi: 10.1016/j.semcd.2012.05.003. Epub 2012 May 24.

[27] M. Ushio-Fukai, N. Urao, Novel role of NADPH oxidase in angiogenesis and stem/progenitor cell function, *Antioxidants Redox Signal.* 11 (10) (2009 Oct) 2517–2533. doi: 10.1089/ars.2009.2582.

[28] N. Maulik, Redox signaling of angiogenesis, *Antioxidants Redox Signal.* 4 (5) (2002 Oct) 805–815. doi: 10.1089/152308602760598963.

[29] A.A. Birukova, S. Lee, V. Starosta, T. Wu, T. Ho, J. Kim, J.A. Berliner, K.G. Birukov, A role for VEGFR2 activation in endothelial responses caused by barrier disruptive OxPAPC concentrations, *PLoS One* 7 (1) (2012) e30957. doi: 10.1371/journal.pone.0030957. Epub 2012 Jan 31.

[30] Y.W. Kim, T.V. Byzova, Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease, *Blood* 123 (5) (2014 Jan 30) 625–631. doi: 10.1182/blood-2013-09-512749. Epub 2013 Dec 3.

[31] Crane fl, Hatefi y, Lester rl, Widmer c. Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1957 Jul;25(1):220-1. doi: 10.1016/0006-3002(57)90457-2. PMID: 13445756.

[32] Ilenia Cirilli, Elisabetta Damiani, Phiwayinkosi Vusi Dlodla, Iain Hargreaves, Fabio Marcheggiani, Lauren Elizabeth Millichap, Patrick Orlando, Sonia Silvestri and Luca Tiano. Role of Coenzyme Q10 in Health and Disease: An Update on the Last 10 Years (2010–2020). *Antioxidants (Basel)*. 2021 August 23;10(8):1325. doi: 10.3390/antiox10081325.

[33] Guescini, M.; Tiano, L.; Genova, M.L.; Polidori, E.; Silvestri, S.; Orlando, P.; Fimognari, C.; Calcabrini, C.; Stocchi, V.; Sestili, P. The Combination of Physical Exercise with Muscle-Directed Antioxidants to Counteract Sarcopenia: A Biomedical Rationale for Pleiotropic Treatment with Creatine and Coenzyme Q10. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017, 2017, 7083049. doi: 10.1155/2017/7083049. Epub 2017 Sep 20.

- [34] Orlando, P.; Silvestri, S.; Galeazzi, R.; Antonicelli, R.; Marcheggiani, F.; Cirilli, I.; Bacchetti, T.; Tiano, L. Effect of ubiquinol supplementation on biochemical and oxidative stress indexes after intense exercise in young athletes. *Redox Rep.* 2018, 23, 136–145. doi: 10.1080/13510002.2018.1472924.
- [35] Jamal Bouitbira, Gerda M. Sanveea, Miljenko V. Panajatovica, François Singha, Stephan Krähenbühl. Mechanisms of statin-associated skeletal muscle-associated symptoms. *Pharmacol Res.* 2020 Apr:154:104201. doi: 10.1016/j.phrs.2019.03.010. Epub 2019 Mar 12.
- [36] Li Li Ji, Chounghun Kang, Yong Zhang. Exercise-induced hormesis and skeletal muscle health. *Free Radic Biol Med.* 2016 Sep:98:113-122. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.025. Epub 2016 Feb 23.
- [37] Rodney L. Levine, Donita Garland, Cynthia N. Oliver, Adolfo Amici, Isabel Climent, Anke-G. Lenz, Bong-Whan Ahn, Shmuel Shaltiel, Earl R. Stadtman. Determination of carbonyl content in oxydatively modified proteins. *Methods in Enzymology* volume 186, 1990, pages 464-478. doi: 10.1016/0076-6879(90)86141-H.
- [38] Natasa Nikolic, Siril Skaret Bakke, Eili Tranheim Kase, Ida Rudberg¹, Ingeborg Flo Halle, Arild C. Rustan, G. Hege Thoresen, Vigdis Aas. Electrical Pulse Stimulation of Cultured Human Skeletal Muscle Cells as an In Vitro Model of Exercise. *PLoS One.* 2012;7(3):e33203. doi: 10.1371/journal.pone.0033203. Epub 2012 Mar.
- [39] Akari Murata, Hirokazu Akiyama, Hiroyuki Honda, Kazunori Shimizu. Electrical pulse stimulation-induced tetanic exercise simulation increases the secretion of extracellular vesicles from C2C12 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2023 Sep. 10:672:177-184. doi: 10.1016/j.bbrc.2023.06.054. Epub 2023 Jun 16.
- [40] Janelle Tarum, Mattias Folkesson, Philip J. Atherton and Fawzi Kadi. Electrical pulse stimulation: an in vitro exercise model for the induction of human skeletal muscle cell hypertrophy. A proof-of-concept study. *Exp*

Physiol. 2017 Nov 1;102(11):1405-1413. doi: 10.1113/EP086581. Epub 2017 Oct 4.

[41] Ling-Jie Li, Jin Ma, Song-Bo Li, Xue-Fei Chen, Jing Zhang. Arch Physiol Biochem. 2021 Aug;127(4):344-350. doi: 10.1080/13813455.2019.1639763. Epub 2019 Jul 12.

[42] J. Bouitbir, A.L. Charles, A. Echaniz-Laguna, M. Kindo, F. Daussin, J. Auwerx, F. Piquard, B. Geny, J. Zoll, Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a 'mitohormesis' mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1, Eur. Heart J. 33 (11) (2012) 1397–1407. doi: 10.1093/eurheartj/ehr224. Epub 2011 Jul 20.

[43] Hiroshi Mabuchi, Toshinori Higashikata, Masaaki Kawashiri, Shoji Katsuda, Mihoko Mizuno, Atsushi Nohara, Akihiro Inazu, Junji Koizumi, Junji Kobayashi. Reduction of Serum Ubiquinol-10 and Ubiquinone-10 Levels by Atorvastatin in Hypercholesterolemic Patients. 2005 Volume 12 Issue 2 Pages 111-119. DOI <https://doi.org/10.5551/jat.12.111>.

[44] Ghirlanda G, Oradei A, Manto A, Lippa S, Uccioli L, Caputo S, Greco AV, Littarru GP. Evidence of plasma CoQ10-lowering effect by HMG-CoA reductase inhibitors: a double-blind, placebo-controlled study. J Clin Pharmacol. 1993 Mar;33(3):226-9. doi: 10.1002/j.1552-4604.1993.tb03948.x. PMID: 8463436.

