



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale
BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA

**RUOLO DEL PIRROLOCHINOLINA CHINONE NELLA MODULAZIONE
DELL'UPTAKE ESOGENO DEL COENZIMA Q₁₀ E DELLO STRESS
OSSIDATIVO IN UN MODELLO IN VITRO DI MUSCOLO SCHELETRICO**

**ROLE OF PYRROLOQUINOLINE QUINONE IN THE MODULATION OF
EXOGENOUS COENZYME Q₁₀ UPTAKE AND OXIDATIVE STRESS IN AN IN
VITRO SKELETAL MUSCLE MODEL**

Tesi di Laurea Magistrale di:
Stephanie Fondi

Relatore:
Chiar.mo Prof. Luca Tiano

Correlatore:
Dott. Fabio Marcheggiani

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2021/2022

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	4
1.1 Invecchiamento.....	4
1.2 Sarcopenia.....	5
1.3 Ruolo del sistema muscolare.....	5
1.4 Patogenesi sarcopenia.....	6
1.4.1 Atrofia fibre muscolare.....	7
1.4.2 Ipoplasia fibre muscolari.....	9
1.4.3 Transizione fibre muscolari.....	10
1.4.4 Disfunzione mitocondriale.....	11
1.4.4.1 Mitocondri.....	11
1.4.4.2 Funzione mitocondri.....	12
1.4.4.3 Alterazioni con l'invecchiamento.....	13
1.4.4.3.1 Biogenesi mitocondriale.....	13
1.4.4.3.2 Generazione ROS.....	14
1.4.4.4 Ruolo disfunzione mitocondriale nella sarcopenia.....	15
1.5 Terapie sarcopenia.....	16
1.5.1 Nutrizione.....	16
1.5.2 Antiossidanti.....	17
1.5.3 Esercizio fisico.....	18
2. COENZIMA Q ₁₀	18
2.1 Struttura e caratteristiche.....	18

2.2 Funzioni.....	19
2.3 Biosintesi.....	20
2.4 Distribuzione.....	20
2.5 Assorbimento.....	21
2.6 Insufficienza primaria e secondaria.....	22
3. PIRROLOCHINOLINA CHINONE.....	24
3.1 Struttura e caratteristiche.....	24
3.2 Biosintesi.....	25
3.3 Supplementazione di PQQ in combinazione con l'allenamenti di resistenza per il miglioramento della biogenesi mitocondriale.....	26
4. SCOPO DEL LAVORO.....	27
5. MATERIALI E METODI.....	28
5.1 Riduzione del Coenzima Q ₁₀	29
5.2 Preparazione Pirrolochinoline-chinone.....	29
5.3 Colture cellulari.....	29
5.4 Quantificazione numero di copie DNA mitocondriale (mtDNA/nDNA).....	29
5.5 Quantificazione massa mitocondriale tramite citofluorimetro e microscopio a fluorescenza.....	31
5.6 Quantificazione contenuto CoQ ₁₀ e CoQ cellulare.....	33
5.7 Modello di stress ossidativo chimico indotto con perossido di idrogeno (H ₂ O ₂).....	35
5.8 Misurazione ROS intracellulari.....	36
5.9 Misurazione ROS mitocondriali.....	38
5.10 Statistica.....	39

6. RISULTATI.....	39
6.1 Definizione della dose ottimale di PQQ per aumentare la biogenesi e massa mitocondriale.....	39
6.2 Quantificazione del CoQ ₁₀ cellulare e del CoQ totale nel muscolo murino a seguito del trattamento con la combinazione di PQQ e CoQ ₁₀	40
6.3 Verificare che l'aumento di CoQ ₁₀ nel muscolo murino aumenti le capacità di recupero cellulari e mitocondriali contro un ossidante noto (H ₂ O ₂).....	41
7. DISCUSSIONE.....	43
8. CONCLUSIONI.....	45
9. BIBLIOGRAFIA.....	46

1. INTRODUZIONE

1.1 Invecchiamento

I progressi nella ricerca, assistenza sanitaria e condizioni socioeconomiche hanno portato ad un aumento della durata della vita media, e quindi una rapida manifestazione di invecchiamento demografico. Nel 2019 è stato stimato che globalmente 703 milioni di persone avessero più di 65 anni e questo numero avrebbe raggiunto 1,5 miliardi entro il 2050 (T. Dao *et al*).

Come conseguenza dell'invecchiamento della popolazione, anche la prevalenza di malattie croniche è in aumento, in quanto l'età cronologica è un importante fattore predisponente al diabete, alle malattie cardiovascolari/respiratorie, alle malattie artritiche e ai tumori. Questo ha indirizzato gli sforzi della ricerca verso lo sviluppo di trattamenti per limitare l'incidenza e la severità delle malattie croniche degenerative, utilizzando oltre agli approcci farmacologici anche modifiche dello stile di vita, ad es. attività fisica e implementazione di una dieta sana e bilanciata (D.J. Wilkinson *et al*).

Il fine ultimo di questi interventi è quello di garantire un invecchiamento di successo, consentendo un funzionamento ottimale dell'organismo anche in età avanzata in alternativa a misure semplicemente rivolte alla correzione delle disfunzioni patologiche conclamate nell'organismo senescente. Queste seppure negli ultimi decenni siano risultate efficaci nell'aumentare significativamente l'aspettativa di vita, in particolare nel mondo occidentale, hanno d'altra parte aumentato significativamente la percentuale di anziani con comorbidità che vivono in condizioni di fragilità, intesa come con uno stato di salute instabile, spesso associato a disabilità ed incapacità di condurre vita autonoma. Questo fenomeno, particolarmente evidente nella società attuale, ha dei notevoli costi economici e sociali e le strategie per fronteggiarlo rappresentano una priorità della comunità scientifica e della società civile.

Difatti si stima che nel mondo occidentale, circa il 30% della popolazione sopra i 55 anni presenta delle limitazioni fisiche moderate o gravi che aumentano il rischio di cadute, istituzionalizzazione, comorbidità e morte prematura. A tale riguardo una condizione comune nell'anziano con conseguente limitazione fisica particolarmente rilevante è la

sarcopenia, ovvero la perdita di massa e funzionalità muscolare legata all'età o ad un periodo di prolungata inattività fisica (M. Tieland *et al*).

1.2 Sarcopenia

L'European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) ha suggerito che la sarcopenia dovrebbe essere definita clinicamente dall' indebolimento della forza muscolare e (come markers secondari di conferma della diagnosi) dalla diminuzione di massa e qualità muscolare. La sarcopenia grave sarebbe invece definita da un'ulteriore compromissione delle prestazioni fisiche. (T. Dao *et al*).

Recentemente è stato sottolineato che la sarcopenia è una condizione che subisce cambiamenti dinamici nel tempo, in cui si possono osservare dei miglioramenti oppure un declino. (J. Woo)

1.3 Ruolo del sistema muscolare

Data l'importanza del sistema muscolare, la sarcopenia comporta non solo una compromissione della prestazione fisica, ma anche del mantenimento della salute a livello dell'organismo.

Il sistema muscolare del corpo umano è costituito da più di 500 muscoli scheletrici che sono controllati dal sistema nervoso che connette e supporta il sistema scheletrico. I muscoli scheletrici sono costituiti da fibre muscolari, ciascuna contenente sarcomeri, che sono le più piccole unità funzionali ripetute nel muscolo. Attraverso una serie di eventi complessi, i sarcomeri sono responsabili della contrazione e rilassamento del muscolo. Ciò consente al corpo di eseguire un'ampia varietà di movimenti diversi, che vanno da potenti e veloci a piccoli e precisi.

Cambiamenti fisiologici come perdita di unità motorie, modificazioni nel tipo di fibra, atrofia delle fibre muscolari e ridotta attivazione neuromuscolare potrebbero influenzare forza e velocità dei movimenti. Questo comporterebbe prestazioni fisiche ridotte e potenzialmente disabilità funzionale e istituzionalizzazione. (M. Tieland *et al*).

L'effetto combinato della sarcopenia e di un ricovero aggrava la disfunzione muscolare, poiché i pazienti anziani (in assenza di un'appropriata riabilitazione) hanno difficoltà di recupero da un periodo di inattività fisica prolungato, che contribuisce a ridurre la funzionalità e la deambulazione al momento della dimissione.

Come precedentemente menzionato, la sarcopenia non comporta esclusivamente la perdita di massa e funzione dei muscoli posturali/ locomotori perché il sistema muscolare è di fatto coinvolto in diverse vie metaboliche.

È un sito fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi del glucosio (stimolato dall'insulina capta il glucosio ematico dal trasportatore GLUT4), ma anche per il metabolismo degli acidi grassi e per la sintesi del glicogeno. Disturbi metabolici nel muscolo potrebbero quindi portare a insulino-resistenza, sindrome metabolica e obesità (M. Tieland *et al*).

In particolare, l'obesità sarcopenica (SO) è una patologia emergente collegata all'età avanzata e caratterizzata da massa muscolare sensibilmente ridotta e dalla presenza di un eccesso di adiposità intermuscolare. Questa combinazione aggrava la sarcopenia attraverso la lipotossicità sul muscolo.

Il grasso ectopico può infatti indurre uno stato pro-infiammatorio con la secrezione di diverse citochine, che interagendo con insulina, testosterone e ormone della crescita possono causare resistenza a stimoli anabolici (come esercizio fisico e assunzione di proteine dalla dieta) e così pregiudicare le funzioni cardio-metaboliche e fisiche (J. Woo).

1.4 Patogenesi sarcopenia

La crescente rilevanza clinica e per la salute pubblica di questa sindrome ha spinto alla progettazione e sviluppo di nuove strategie preventive e terapeutiche. La realizzazione di tale obiettivo richiede una comprensione approfondita dei processi cellulari alla base della patogenesi della sarcopenia, al fine di identificare bersagli selettivi per il trattamento. Sono stati quindi proposti diversi pathways coinvolti nella progressiva degenerazione muscolare associata all'età (E. Marzetti *et al*).

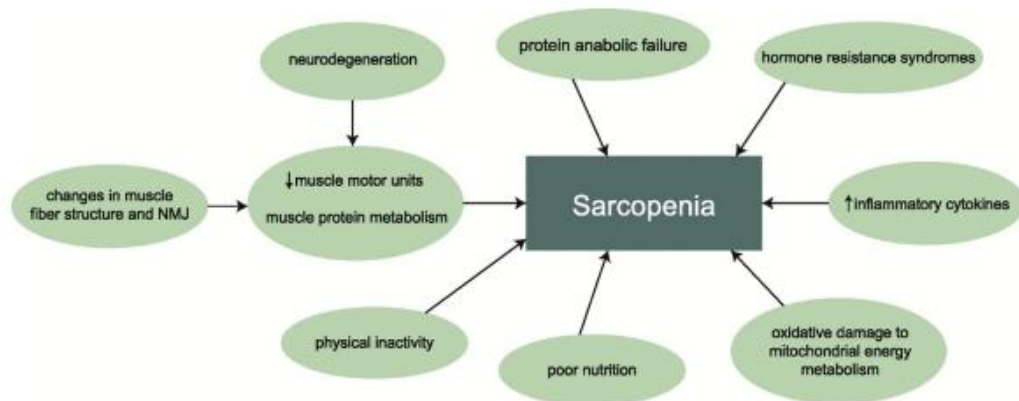


Figura 1. Pathways che portano al declino progressivo di massa e funzionalità muscolare

Con il progredire dell'invecchiamento si verificano delle modificazioni nella struttura delle fibre muscolari e nella giunzione neuromuscolare, nelle proprietà contrattili muscolari, neurodegenerazione con conseguente perdita delle unità motorie muscolari, alterato metabolismo proteico muscolare, insufficienza anabolica proteica, sindromi da resistenza ormonale, sovra-regolazione di citochine infiammatorie, danno ossidativo al metabolismo energetico mitocondriale, scarso stato nutrizionale e inattività fisica. (J.Woo)

1.4.1 Atrofia fibre muscolari

L'atrofia delle fibre muscolari è determinata da uno squilibrio tra la sintesi (MPS) e la degradazione proteica muscolare (MPB). Dato che si hanno prove limitate di alterazioni basali nel turnover proteico muscolare, l'atrofia muscolare legata all'età avanzata potrebbe essere spiegata dalla "resistenza anabolica" ai segnali ambientali che regolano l'omeostasi muscolare.

Nel muscolo giovane la risposta agli stimoli anabolici (contrazione muscolare, aminoacidi essenziali e ormoni anabolici come l'IGF-1), provoca la stimolazione di MPS e l'inibizione di MPB. Il mantenimento di questo equilibrio (e quindi della massa muscolare) è regolato principalmente attraverso il controllo della segnalazione di mTORc1. L'attivazione di mTOR provoca l'attivazione di p70S6K causando un aumento

della traduzione proteica e l'inibizione della binding protein 4e (4e-BP1), che è un regolatore negativo del fattore di inizio della traduzione eucariotica-4e (EIF-4e). L'attivazione di queste vie stimola i processi di crescita, principalmente delle proteine miofibrillari (P.M Coen *et al*)

In età avanzata invece, la resistenza anabolica del muscolo causa l'alterazione della sintesi proteica muscolare e l'induzione della degradazione, portando di conseguenza all'insorgenza di atrofia (D.J. Wilkinson *et al*). L'atrofia del muscolo scheletrico si verifica indubbiamente con l'avanzare dell'età. Una recente review quantitativa ha mostrato che il declino mediano della massa muscolare nel corso della vita è dello 0,37% all'anno nelle donne e dello 0,47% all'anno negli uomini. Secondo studi longitudinali su persone di età pari o superiore a 75 anni, la massa muscolare viene persa a un tasso dello 0,64-0,70% all'anno nelle donne e dello 0,80-0,98% all'anno negli uomini. Tuttavia, durante i periodi di inattività fisica, l'atrofia del muscolo scheletrico è sostanzialmente accelerata (M. Tieland *et al*).

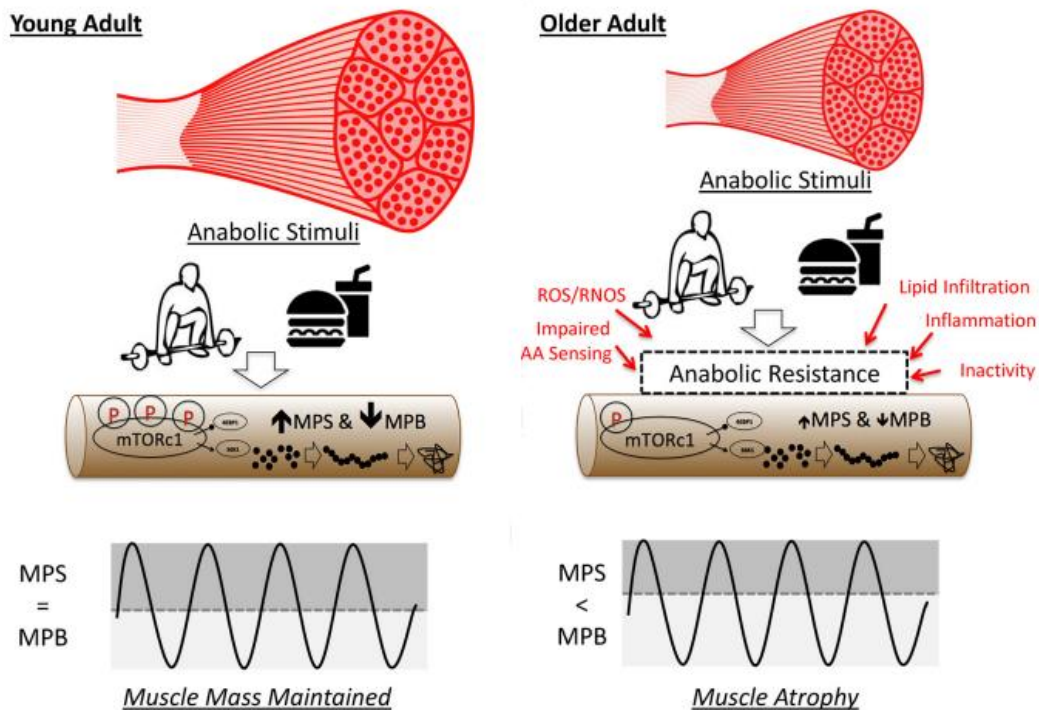


Figura 2. Schematizzazione della manifestazione della resistenza anabolica e atrofia muscolare con l'avanzare dell'età

1.4.2 Ipoplasia fibre muscolari

L'ipoplasia o perdita di fibre muscolari è associata alla perdita progressiva con l'età delle unità motorie (MU). Un'unità motoria è l'unità funzionale del sistema motorio e comprende il corpo cellulare del motoneurone (situato nel midollo spinale), il suo assone (unito ad altri in fasci costituisce i nervi periferici), le fibre muscolari che innerva ed infine la giunzione neuromuscolare (NMJ, sinapsi tra motoneurone e fibra muscolare).

Studi anatomici post mortem di individui di età superiore ai 60 anni hanno evidenziato nel midollo spinale una diminuzione del numero dei corpi cellulari, che in individui con 75 anni o più raggiunge il 30% in meno rispetto ai giovani. Inoltre, studi in vivo sull'uomo hanno confermato tramite EMG (elettromiografia, misurazione della massima contrazione muscolare attraverso la stimolazione elettrica dei neuroni motori) un declino correlato all'età del numero delle unità motorie. Questo declino comporta la denervazione delle fibre muscolari e quindi una maggiore tendenza all'atrofia (e infine alla perdita). Tuttavia, le fibre possono essere reinnervate attraverso il "rimodellamento MU" da assoni vicini, definiti "germogli assonali" nel tentativo di preservare la massa muscolare.

Prove recenti suggeriscono che la mancata reinnervazione delle fibre denervate distingue gli anziani sarcopenici da quelli non sarcopenici (in cui si verifica un'eccessiva perdita di fibre che la reinnervazione non può più compensare sufficientemente).

Questo meccanismo è stato studiato in dettaglio (nei roditori ma anche in numerose biopsie umane) a livello della giunzione neuromuscolare e della sua relazione con la fibra muscolare, che può essere descritta nelle seguenti tre fasi.

Innanzitutto, con una completa innervazione, i mionuclei vicini alla sinapsi esprimono i geni coinvolti nel mantenimento di NMJ (MuSK), che sono soppressi nei mionuclei non sinaptici. Successivamente, con la denervazione si ha la up-regolazione del proteasoma in tutti i mionuclei. Infine, dopo una prolungata denervazione, c'è un'inibizione dell'autofagia e un aumento della sintesi proteica (tramite mTORC1). Pertanto, una fibra denervata comincia ad atrofizzarsi, ma è in grado di sopravvivere indefinitamente (D.J. Wilkison *et al*).

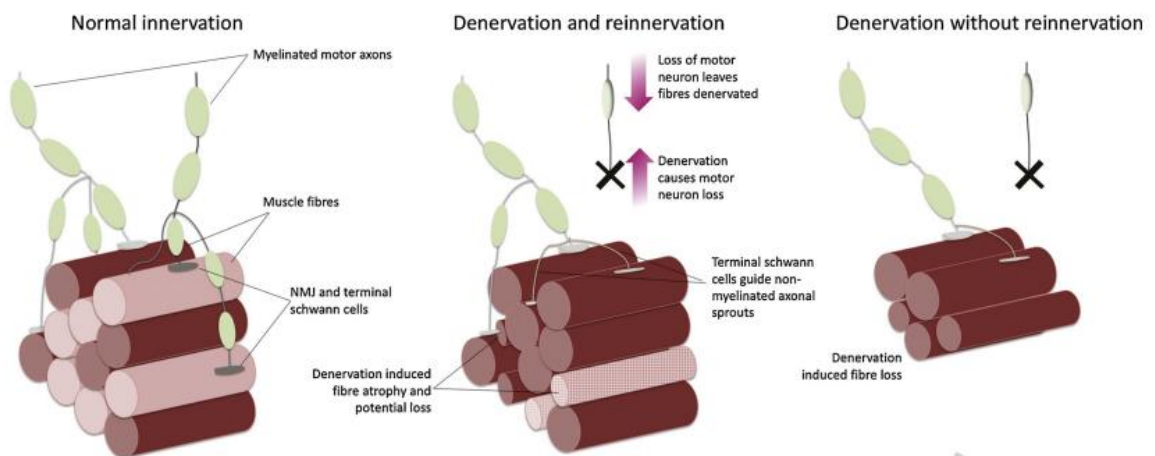


Figura 3. Schema dell'ipoplasi delle fibre muscolari indotta dalla loro denervazione. Con la normale innervazione, gli assoni mielinici comunicano con la fibra muscolare a livello della giunzione neuromuscolare. Le fibre denervate possono essere reinnervate dai germogli assionali (guidati dalle cellule di Schwann) oppure atrofizzare ed infine morire.

1.4.3 Transizioni fibre muscolari

Il sarcomero è l'unità funzionale della fibra muscolare, contiene filamenti sottili (tra cui actina, tropomiosina e troponina) e filamenti spessi (principalmente costituiti da miosina), insieme ad altre proteine strutturali. Lo scorrimento ATP-dipendente dei filamenti di miosina lungo le catene di actina genera la contrazione muscolare. La proteina della miosina matura contiene sei polipeptidi, quattro catene leggere e due catene pesanti. L'espressione di diverse isoforme della catena pesante della miosina (MHC) determina i tipi di fibre muscolari.

Sono state inizialmente classificate in fibre a contrazione lenta (tipo I) o a contrazione rapida (tipo II), in base alla loro velocità contrattile in risposta all'eccitazione neurale. Attualmente, le miofibre sono classificate come tipo I, tipo IIA, IIB o IIX, (in base all'isoforma MHC espressa). Per la produzione di energia le fibre di tipo I e IIA dipendono principalmente dalla fosforilazione ossidativa mitocondriale, mentre le fibre di tipo IIB e IIX si basano sulla glicolisi.

Diversi reports indicano che l'invecchiamento provoca una graduale diminuzione del numero e delle dimensioni delle fibre di tipo II, suggerendo una transizione dalla fibra a contrazione veloce (tipo II) a quella a contrazione lenta (tipo I). Questa teoria è ulteriormente supportata da uno studio che ha rilevato che l'espressione dell'mRNA delle

isoforme IIA e IIX diminuisce rispettivamente del 14% e del 10% per decennio mentre l'mRNA di tipo I rimane costante con l'età.

La transizione del tipo di fibra muscolare potrebbe indicare che con l'invecchiamento il muscolo scheletrico passi da un metabolismo glicolitico (citosolico) ad uno ossidativo (mitocondriale) e che abbia quindi una maggiore richiesta di mitocondri funzionali (T. Dao *et al*).

1.4.4 Disfunzione mitocondriale

1.4.4.1 Mitocondri

I mitocondri sono organuli cellulari dinamici, dotati di una notevole plasticità. In base ai diversi momenti funzionali della cellula, passano da una forma granulare a una filamentosa e a una a bastoncino, possono quindi allungarsi e restringersi, accorciarsi e rigonfiarsi. Al pari della forma, anche la grandezza (lunghezza 1-6 μ m e diametro 0,2-1 μ m) e il numero di mitocondri (1000-2000 per cellula, a seconda del fabbisogno energetico della cellula) sono variabili.

I mitocondri sono costituiti da una membrana esterna spessa circa 6nm, separata dalla membrana interna per mezzo della camera esterna, che ha un contenuto lipidico superiore (40-50%, principalmente fosfolipidi, in particolare la fosfatidilcolina) rispetto a quella interna (20% contiene cardiolipina ed è quasi priva di colesterolo) ed è permeabile (tramite porine) al passaggio di molecole inferiori ai 5000 Da.

La membrana interna, anch'essa spessa circa 6 nm, si solleva dentro la cavità del mitocondrio formando delle pieghe dette creste mitocondriali. La membrana interna non è permeabile come quella esterna e contiene proteine di trasporto che controllano selettivamente il passaggio di molecole coinvolte nei processi metabolici mitocondriali. In questa membrana sono presenti i complessi proteici coinvolti nel trasporto degli elettroni (citocromi) e nella fosforilazione ossidativa (complesso ATP sintetasi costituito da F₁ e F₀).

La camera mitocondriale interna, delimitata dalla membrana interna, contiene la matrice

mitocondriale, un gel viscoso dove sono contenuti gli enzimi idrosolubili per l'ossidazione degli acidi grassi e per il ciclo di Krebs e granuli densi con cationi bivalenti (depositi intracellulari di calcio e magnesio).

In questo compartimento è presente il DNA mitocondriale (non legato a proteine e chiuso ad anello) in quanto i mitocondri posseggono un proprio genoma e un proprio apparato sintetico (RNA e ribosomi). La maggior parte delle proteine mitocondriali è comunque sintetizzata nel citoplasma sotto al controllo del genoma nucleare (R. Colombo *et al*).

1.4.4.2 Funzioni mitocondri

I mitocondri rappresentano la centrale energetica della cellula, sono infatti sede della fase aerobia del metabolismo energetico, ovvero l'insieme delle reazioni chimiche che trasformano l'energia dei nutrienti in ATP (necessario per diverse funzioni cellulari come motilità/contrazione, trasporto attivo, trasmissione di impulsi, biosintesi di composti cellulari ecc.). La fase aerobia è preceduta da quella anaerobia o glicolisi, che avviene nella matrice citoplasmatica e fornisce a partire da una molecola di glucosio due ATP (utilizzati per il trasporto del NADH alle creste mitocondriali), due NADH e due molecole di piruvato che sono trasformate in acetato e trasportate nella matrice mitocondriale. A livello della matrice mitocondriale gli enzimi del ciclo di Krebs ossidano le due molecole di acetato e producono due ATP, otto NADH e due FADH₂. Nella catena di trasporto degli elettroni sulle creste mitocondriali si ottengono trentaquattro molecole di ATP con liberazione di acqua. Da una molecola di glucosio si ottengono dunque trentasei molecole ATP.

Oltre al metabolismo energetico, i mitocondri sono coinvolti anche nell'accumulo degli ioni calcio, nella sintesi di ormoni steroidi, nella gluconeogenesi, nell'ossidazione degli acidi grassi ecc. (R. Colombo *et al*).

1.4.4.3 Alterazioni con l'invecchiamento

I mitocondri svolgono un ruolo fondamentale nell'omeostasi cellulare rispondendo a stress intracellulari ed extracellulari, apoptosi, infiammazione, epigenetica e senescenza. La disfunzione mitocondriale descrive il declino funzionale della qualità e dell'attività mitocondriale dovuto all'alterazione della struttura e contenuto dei mitocondri, al malfunzionamento del metabolismo e alla fosforilazione ossidativa, all'accumulo di danni al DNA mitocondriale e alla deregolazione della dinamica mitocondriale (fusione e fissione) ed è per questo definita come un “segno distintivo dell'invecchiamento” (T.Dao *et al*). I mitocondri rappresentano uno dei siti principali di produzione di specie reattive dell'ossigeno ma oltre ad essere sorgente sono anche bersaglio delle stesse specie reattive. Con l'invecchiamento l'aumentata produzione di ROS può determinare un circolo vizioso di danno e disfunzione mitocondriale che si alimenta con un processo a feedback positivo.

1.4.4.3.1 Biogenesi mitocondriale

La disfunzione mitocondriale associata al processo di invecchiamento mostra dei cambiamenti morfologici mitocondriali distinti, ad esempio mitocondri anomali e arrotondati, riduzione del DNA mitocondriale, aumento del tasso di mutazione, riduzione dell'attività della catena respiratoria e biogenesi mitocondriale alterata (è un processo complesso costituito dalla crescita e dalla divisione di mitocondri preesistenti che richiede la replicazione e la sintesi del mtDNA e l'importazione di proteine e lipidi dal citoplasma ai mitocondri esistenti).

Una diminuzione della biogenesi mitocondriale può ridurre il turnover dei componenti mitocondriali con conseguente accumulo di lipidi, proteine e DNA ossidati. Come conseguenza si ha alterazione la fosforilazione ossidativa, infiammazione cronica a bassi livelli e un accumulo di mitocondri malfunzionanti, che nel complesso aggravano ulteriormente la condizione dell'invecchiamento. Pertanto, si ritiene che il mantenimento della capacità di biogenesi mitocondriale durante l'invecchiamento sia un fattore chiave nella prevenzione della progressione delle malattie legate all'invecchiamento (Y.Yuan *et*

a).

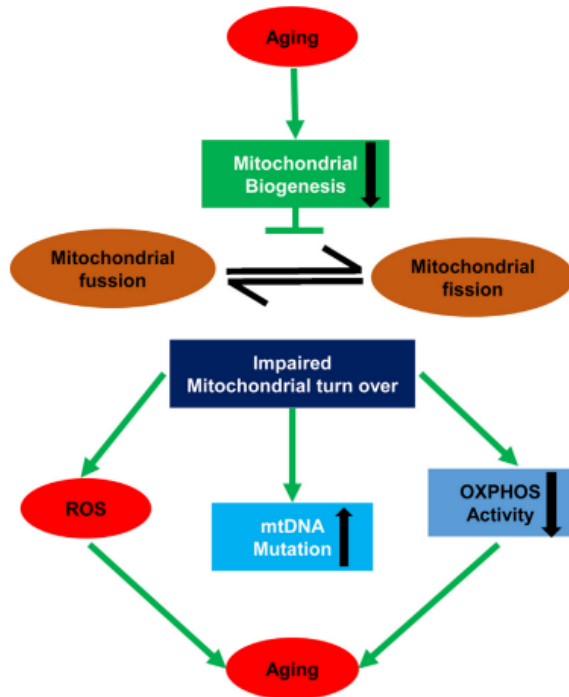


Figura 4. Schema dell'alterazione della biogenesi mitocondriale associata all'invecchiamento. Una riduzione della biogenesi mitocondriale comporta la deregolazione della dinamica mitocondriale (fusione e fissione), riduzione il turnover dei componenti mitocondriali con conseguente accumulo di ROS, aumento delle mutazioni del mtDNA e diminuzione della fosforilazione ossidativa. (D.Y. Seo et al).

1.4.4.3.2 Generazione ROS

L'incremento dello stress ossidativo associato all'invecchiamento (e mediato da un aumento di ROS) è un processo che, se non abbinato all'attività degli antiossidanti endogeni, determina disfunzione mitocondriale danneggiando le proteine e i lipidi cellulari e gli acidi nucleici. La letteratura sul muscolo scheletrico umano evidenzia una correlazione positiva tra età, perossidazione lipidica e contenuto di 8-oxo-deossiguanosina (8-oxodG, una misura dell'ossidazione del DNA).

Il DNA mitocondriale è particolarmente sensibile al danno ossidativo a causa della mancanza di istoni e della vicinanza ai ROS prodotti dalla catena di trasporto degli elettroni. È interessante notare che gli anziani affetti da sarcopenia hanno un contenuto di antiossidanti endogeni (superossido dismutasi, catalasi e glutazione perossidasi) simile a quello di individui più giovani, indicando la necessità di una maggiore attività

antiossidante endogena per combattere l'aumento della produzione di ROS associato all'età (M.L. Johnson *et al*).

1.4.4.4 Ruolo disfunzione mitocondriale nella Sarcopenia

In condizioni fisiologiche, i mitocondri di fibre muscolari e motoneuroni giovani quando sono danneggiati vengono inglobati nella membrana dell'autofagosoma e rimossi tramite mitofagia. L'invecchiamento (associato all'aumento dei ROS e ad altri stress mitocondriali) comporta la perdita della clearance mitocondriale che promuove l'accumulo di mitocondri mal funzionanti, dotati di eccessiva apertura dei pori di permeabilità di transizione dei mitocondri (mPTP). Il rilascio del contenuto mitocondriale nel citoplasma cellulare induce una cascata apoptotica che termina con la frammentazione del DNA e, se non riparata, l'apoptosi nucleare.

La rimozione dei nuclei nelle fibre muscolari e nei motoneuroni comporta la perdita di innervazione e l'atrofia muscolare. Il cross-talk tra le fibre muscolari e i motoneuroni che contengono mitocondri compromessi aggrava la perdita di massa e funzione muscolare. Pertanto, i mitocondri sono i principali iniziatori e regolatori della sarcopenia. (S.E. Alway *et al*).

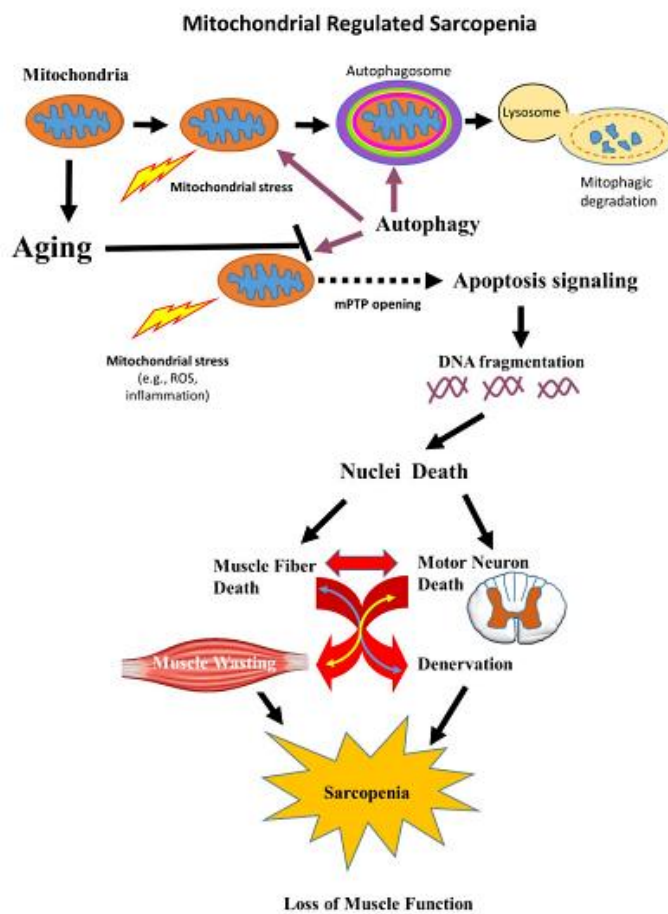


Figura 5. Schema del ruolo della disfunzione mitocondriale nella sarcopenia. L'invecchiamento è associato ad un aumento di ROS e alla perdita di clearance mitocondriale, che comporta un accumulo di mitocondri compromessi che innescano una cascata apoptotica nelle fibre muscolari e nei motoneuroni che provoca perdita di innervazione e atrofia muscolare.

1.5 Terapie Sarcopenia

1.5.1 Nutrizione

Affinché un intervento sulla nutrizione sia efficace contro la sarcopenia, esso dovrebbe fornire un adeguato apporto calorico, garantire l'apporto di nutrienti adeguati (tenendo conto dell'età, del sesso, del profilo metabolico, dello stato di salute, del livello di attività fisica e delle terapie concomitanti), fornire l'adeguata qualità e quantità di nutrienti al momento giusto (quando c'è un bisogno fisiologico) ed infine essere protratto per un tempo sufficiente a incidere sulla salute muscolare.

Sulla base di queste premesse, nel 2010, la "Society for Sarcopenia, Cachexia, and

Wasting Disease” ha convocato un gruppo di esperti per sviluppare raccomandazioni nutrizionali per la prevenzione e la gestione della sarcopenia. Gli esperti oltre a riconoscere il ruolo centrale dell'esercizio fisico, hanno evidenziato l'importanza di un adeguato apporto di calorie e di numerosi nutrienti, tra cui proteine e aminoacidi, vitamina D e creatina (R.Calvani *et al*).

Le indicazioni fornite sono state così riassunte: l'apporto calorico giornaliero dovrebbe essere di 24-36 kcal/kg; l'apporto proteico giornaliero di minimo 1,0 g/kg di peso corporeo, fino a 1,5 g distribuito uniformemente in 3 pasti; i livelli sierici di vitamina D dovrebbero essere mantenuti a 100 nmol/L (40 ng/mL) tramite una dieta ricca di vitamina D o da un'integrazione di vitamina D. Diversi studi sull'integrazione con creatina monoidrato, antiossidanti, metaboliti degli aminoacidi, acidi grassi omega-3 e altri composti hanno recentemente riscontrato risultati promettenti. (J.Woo *et al*)

1.5.2 Antiossidanti

Secondo la teoria dell'invecchiamento da radicali liberi, l'accumulo del danno ossidativo nelle macromolecole cellulari nel corso della vita è il meccanismo principale dell'invecchiamento, e dunque dei fenotipi ad esso associati come la sarcopenia. Questa teoria è supportata dallo studio InCHIANTI, uno studio di popolazione sugli anziani che vivono nell'area geografica del Chianti (Toscana, Italia), in cui i livelli plasmatici di carotenoidi più elevati erano associati a un minor rischio di sviluppare disabilità motorie e diminuzione della massa e forza muscolare. Queste osservazioni fornirebbero una buona motivazione per la somministrazione di antiossidanti come contromisura per la sarcopenia.

Tuttavia, benchè l'eccessiva generazione di ROS è associata all'invecchiamento e alla sarcopenia, la produzione di ossidanti all'interno di una finestra ormetica possiede un ruolo fondamentale nella segnalazione cellulare e nell'adattamento a vari fattori di stress. Diversi studi recenti suggeriscono che le molecole a blanda attività pro-ossidante potrebbero persino possedere proprietà antietà.

L'utilizzo indiscriminato di integratori antiossidanti potrebbe sopprimere le azioni

fisiologiche dei ROS e quindi gli effetti benefici associati (ad es. all'esercizio fisico moderato). Inoltre, gli antiossidanti più comunemente prescritti come (Vitamina C, Vitamina E e β -carotene) in rapporto non bilanciato nel contesto del network funzionale degli antiossidanti cellulari possono determinare degli effetti paradosso comportarsi come potenti pro-ossidanti a causa delle loro proprietà chimico-fisiche e attività redox (R. Calvani *et al*).

1.5.3 Esercizio fisico

L'attività fisica, in particolare l'allenamento di resistenza, è essenziale per rafforzare il sistema muscolare e le prestazioni fisiche. L'American College of Sport Medicine e l'American Heart Association raccomandano (anche per le persone anziane) di allenarsi 2-3 volte a settimana. Gli effetti benefici dell'esercizio fisico possono essere consolidati dall'inibizione della miostatina attraverso una maggiore sintesi epatica della follistatina, un inibitore della miostatina, e anche stimolando le risposte anaboliche ormonali (ad es. ormone della crescita e testosterone). Attualmente, la strategia di integrazione nutrizionale combinata all'esercizio fisico sembra essere la più promettente nel gestire la sarcopenia (J. Woo).

2. COENZIMA Q₁₀

2.1 Struttura e caratteristiche

Il Coenzima Q₁₀ o ubiquinone (CoQ₁₀) è una molecola organica liposolubile composta da un anello benzochinonico (che conferisce la capacità redox) a cui è attaccata una catena laterale con 10 ripetizioni isoprenoiche. La coda lipidica poliisoprenoide facilita la stabilità della molecola nel doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare; inoltre, la sua lunghezza (che è specie-specifica) influenza la mobilità, l'interazione intermolecolare con le proteine di membrana e l'autossidabilità del CoQ₁₀ (R.S. Sohal *et al*).

Il coenzima Q₁₀ è caratterizzato da tre stati di ossidazione: l'ubichinone (CoQ,

completamente ossidato), l'ubisemichinone (CoQH., parzialmente ridotto) ed infine l'ubichinolo (CoQH₂, completamente ridotto). Quest'ultimo presenta diversi vantaggi essendo più biodisponibile e facilmente utilizzabile dall'organismo dal momento che non richiede ulteriori passaggi riduttivi. Ciò è di particolare importanza in condizioni in cui i sistemi riducenti sono meno efficienti come durante l'invecchiamento o dopo un'intensa attività fisica (C. Andreani *et al*).

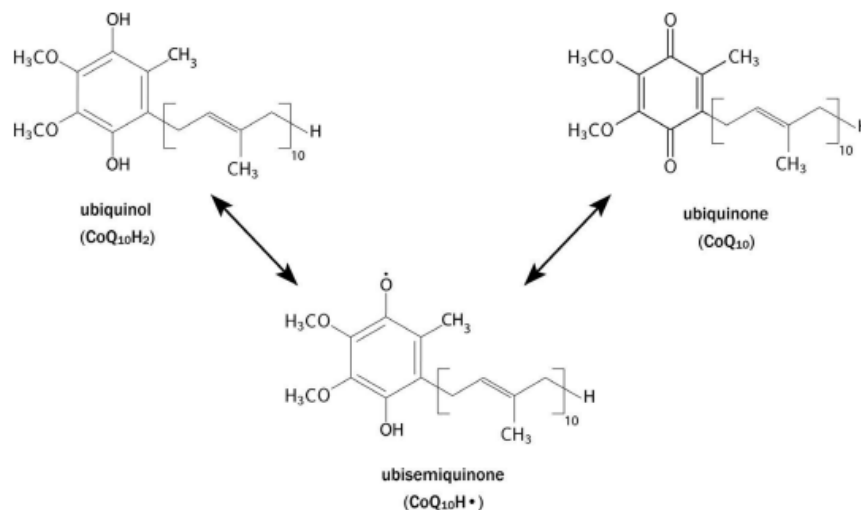


Figura 6. I tre diversi stati redox del Coenzima Q₁₀

2.2 Funzioni

Grazie alle sue particolari caratteristiche, il CoQ₁₀ è essenziale in diverse funzioni cellulari e mitocondriali. All'interno dei mitocondri, CoQ₁₀ ha un ruolo chiave come trasportatore di elettroni (dal complesso I e II al complesso III) nella catena di trasporto degli elettroni mitocondriali (METC) durante la fosforilazione ossidativa. È anche coinvolto (come cofattore dell'enzima diidroorotato deidrogenasi) nel metabolismo delle pirimidine, degli acidi grassi e delle proteine disaccoppianti mitocondriali, nonché nella regolazione del poro di transizione della permeabilità mitocondriale. Il CoQ₁₀ funge da importante antiossidante liposolubile che protegge le membrane cellulari, sia mitocondriali che extramitocondriali (apparato di Golgi, lisosomi, reticolo endoplasmatico, perossisomi) dallo stress ossidativo indotto dai radicali liberi. Oltre ad agire direttamente come antiossidante, il CoQ₁₀ è anche coinvolto nella rigenerazione degli antiossidanti rispettivamente vitamina C e vitamina E (I. Hargreaves *et al*). Come

menzionato in precedenza, il CoQ₁₀ possiede anche una forma radicalica, può quindi agire come antiossidante e come pro-ossidante e questo suggerisce un suo coinvolgimento come regolatore dello stato redox cellulare in particolari condizioni fisiologiche/patologiche, in particolare nel processo dell'invecchiamento (R.S. Sohal *et al*).

2.3 Biosintesi

Il CoQ₁₀ può essere considerato una simiol-vitamina in quanto può essere introdotto con la dieta ma principalmente viene prodotto per via endogena in diversi tessuti. La sintesi della molecola di CoQ₁₀ comprende tre fasi principali: la sintesi della struttura del benzochinone dal 4-idrossibenzoato o 4-HB (derivato da tirosina o fenilalanina), la sintesi della catena laterale poliisoprenoide dall'acetil-coenzima A (CoA) attraverso la via del mevalonato, e in seguito la condensazione di queste due strutture. La struttura dell'anello del benzochinone è quindi soggetta ad ulteriori modifiche tramite idrossilazione, metilazione e decarbossilazione per formare infine il CoQ₁₀. In questo processo sono presenti diversi passaggi potenzialmente limitanti, inclusa la sintesi della catena poliisoprenoide (tramite HMG-CoA reductasi) e la condensazione della catena poliisoprenoide e dell'anello benzochinonico (tramite preniltransferasi) (I. Hargreaves *et al*).

2.4 Distribuzione

Il CoQ₁₀ è presente in tutti i tessuti in quantità variabili, con le concentrazioni più elevate osservate in quelli con elevato fabbisogno energetico o attività metabolica, come cuore, reni, fegato e muscoli. In questi tessuti, il CoQ₁₀ si trova principalmente come ubiquinolo ed è concentrato principalmente nei mitocondri. È stato dimostrato sperimentalmente che le concentrazioni fisiologiche di CoQ₁₀ nei mitocondri non superano quelle richieste per la saturazione cinetica della NADH-Q-ossidoreduttasi, suggerendo che è un fattore limitante della catena di trasporto elettronica. Pertanto, anche piccole diminuzioni di CoQ₁₀ al di sotto dei livelli fisiologici possono alterare la funzionalità mitocondriale (R.S.

Sohal *et al*). Dal momento che il CoQ₁₀ è sintetizzato in tutti i tessuti, il corpo normalmente non dipende dalle fonti esogene di CoQ₁₀. Tuttavia, la biosintesi endogena raggiunge il picco massimo intorno ai vent'anni, dopodiché tende a diminuire progressivamente con l'età. Inoltre, il CoQ₁₀ tissutale può essere compromesso in molti stati fisiopatologici. In queste circostanze, potrebbe essere necessario il CoQ₁₀ esogeno per mantenere livelli normali di sangue e tessuti (A.E. Raizner).

Tramite una dieta mediterranea (che comprende alimenti ricchi di CoQ₁₀ come pesce, soia, noci ecc) si possono ottenere circa 5 mg/giorno di Coenzima Q₁₀. Tale apporto non è però sufficiente a contrastare carenze fisiologiche o patologiche. Per questo motivo, l'integrazione nutrizionale con questo nutraceutico aiuterebbe a mantenere livelli adeguati all'interno dell'organismo. (L. Testai *et al*).

2.5 Assorbimento

Il CoQ₁₀ ha una biodisponibilità orale molto bassa e variabile, a seconda di molti fattori come il dosaggio di somministrazione, il tipo di formulazione, il metodo di rilascio e la modalità di somministrazione (ad esempio, prima, durante o dopo i pasti). Quando somministrato a stomaco pieno, il CoQ₁₀ arriva nel lume intestinale e viene captato dalle micelle miste insieme ai lipidi alimentari, alla bile e alle secrezioni pancreatiche che ne facilitano la solubilizzazione e l'ingresso negli enterociti. Il CoQ₁₀ viene incorporato nei chilomicroni e principalmente nelle lipoproteine ad alta densità (HDL) del plasma sanguigno. A livello gastrointestinale solo il 6% del CoQ somministrato per via orale riesce a raggiungere il tratto gastrointestinale. Questa limitata biodisponibilità è dovuta a diversi fattori: scarsa solubilità in acqua ma anche nei lipidi in relazione all'elevato peso molecolare (MW 863). Dal flusso sanguigno, il CoQ₁₀ viene distribuito ai tessuti periferici e al fegato, dove viene parzialmente escreto nella bile ed eliminato con le feci (L. testai *et al*)

L'uptake della piccola percentuale di CoQ₁₀ presente nelle lipoproteine da parte di cuore, reni, cervello e muscolo scheletrico è bassa o completamente assente, a meno che i livelli endogeni non siano scesi al di sotto di una soglia critica (R.S. Sohal, M.J Forster).

Il principale fattore limitante della bassa biodisponibilità del CoQ₁₀ pare essere la sua scarsa solubilità nei fluidi gastrointestinali. Per questo motivo sono state proposte sul mercato diverse formulazioni sotto forma di compresse, capsule e gel contenenti sospensioni oleose per migliorare la bioaccessibilità e la biodisponibilità del CoQ₁₀. (L. Testai *et al*). Dopo la somministrazione orale, la concentrazione plasmatica massima di CoQ₁₀ si verifica tra 6 e 8 ore e ha un'emivita di oltre 30 ore (A.E. Raizner).

2.6 Insufficienza primaria e secondaria

È noto che alcuni fattori come l'invecchiamento, l'utilizzo di farmaci (ad es. le statine), le malattie neurodegenerative e i disturbi degenerativi dei muscoli sono associati a ridotte concentrazioni plasmatiche di CoQ₁₀, con conseguente esacerbazione dello stress ossidativo e dei processi infiammatori (L. Testai *et al*).

L'insufficienza di coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀) è una malattia rara caratterizzata da un ridotto accumulo di CoQ₁₀ nelle membrane cellulari. Considerando che la sintesi di CoQ₁₀ e la maggior parte delle sue funzioni sono svolte nei mitocondri, i casi di carenza di CoQ₁₀ sono generalmente considerati una malattia mitocondriale. Una caratteristica rilevante del deficit di CoQ₁₀ è che è l'unica malattia mitocondriale con una terapia di successo disponibile, l'integrazione di CoQ₁₀.

Il deficit di CoQ₁₀ è distinto in insufficienza primaria e secondaria.

L'insufficienza primaria di CoQ₁₀ è una malattia rara a bassa prevalenza che si origina dalle varianti genetiche dei geni COQ (ad oggi se ne conoscono almeno 10) che sono direttamente coinvolti nella sintesi di CoQ₁₀. I più rilevanti sono COQ1 che è coinvolto nella sintesi della catena poliisoprenoide, COQ2 nella condensazione della catena isoprenoide con l'anello benzochinonico. COQ3-5-6-7 sono coinvolti in reazioni concomitanti di metilazione, decarbossilazione, idrossilazione e deaminazione e COQ10 dirige la localizzazione di CoQ₁₀ all'interno della membrana mitocondriale. (I Hargreaves *et al*).

Le mutazioni nei geni COQ causano manifestazioni molto diverse che colpiscono il sistema nervoso centrale e periferico, i reni, il cuore e il muscolo scheletrico. Alcuni dei

geni COQ, quando mutati, producono un fenotipo specifico (ad es. COQ8A: sindrome cerebellare atassica, COQ8B: sindrome nefrosica steroido-resistente). Le mutazioni negli altri geni COQ sono invece pleiotropiche. È quindi difficile stabilire correlazioni di tipo genotipo-fenotipo in questo tipo di malattia rara, per la quale il numero di pazienti diagnosticati è insufficiente e la complessità delle manifestazioni cliniche ostacola ulteriormente il compito.

L'insufficienza secondaria di CoQ₁₀ è una patologia più comune della primaria ed è associata alle mutazioni di geni non direttamente coinvolti nel processo di sintesi del Coenzima Q₁₀ (pathways che regolano a diversi livelli la biosintesi o il turnover di CoQ₁₀) ma anche a fattori non genetici come l'invecchiamento.

Tipicamente, il deficit secondario di CoQ₁₀ è una manifestazione clinica associata ad una condizione principale, in cui può produrre un'esacerbazione del fenotipo.

I pazienti con deficit secondario di CoQ₁₀ mostrano infatti uno spettro clinico fortemente dipendente dalla patologia da cui derivano. Ad esempio, le manifestazioni muscolari di questi disturbi sono miopatie con debolezza muscolare, ipotonia, intolleranza all'esercizio o mioglobinuria. Anche il sistema nervoso centrale (SNC) può essere soggetto a carenze secondarie di CoQ₁₀, presentando atassia e declino neurologico.

Tuttavia, esiste una certa variabilità tra i pazienti affetti dagli stessi disturbi, suggerendo una diversa suscettibilità alle carenze di CoQ₁₀ in individui diversi. I pazienti possono presentare i tipici sintomi di deficit secondario nonostante abbiano il CoQ₁₀ nel range fisiologico (o a livello della soglia minima) oppure non manifestare sintomi benché in presenza di deficit di CoQ₁₀.

Come precedentemente menzionato, un fattore non genetico coinvolto nell'insufficienza secondaria di CoQ₁₀ è l'invecchiamento. Una caratteristica tipica dell'invecchiamento è l'accumulo di mitocondri compromessi nelle cellule e nei tessuti. Il declino della funzione mitocondriale durante l'invecchiamento aumenta l'accumulo di mtDNA mutato, altera l'espressione dei geni del mtDNA e aggrava ulteriormente il malfunzionamento dei mitocondri in un circolo vizioso. In questo processo, la riduzione dei livelli di CoQ₁₀ possiede un ruolo fondamentale.

Attraverso la sua relazione con la disfunzione mitocondriale, la carenza di CoQ₁₀ è stata associata a molte malattie legate all'età come diabete di tipo 2, insulino-resistenza, malattie cardiovascolari, neurodegenerazione, malattie renali croniche, malattie del fegato, immunosenescenza e sarcopenia.

L'integrazione di CoQ₁₀ è un valido approccio terapeutico per ritardare la progressione dell'invecchiamento o dei danni correlati all'età. La somministrazione orale di CoQ₁₀ potrebbe riportare miglioramenti nel deficit secondario di CoQ₁₀, ma per massimizzare i benefici è necessario considerare le dosi, la formulazione e un'integrazione precoce e appropriata di CoQ₁₀ (P. Navas *et al*).

3. PIRROLOCHINOLINA CHINONE

3.1 Struttura e caratteristiche

Il Pirrolochinolina chinone (PQQ) è un o-chinone triciclico aromatico termostabile e solubile in acqua che funge da cofattore redox di diverse deidrogenasi procariotiche.

Il PQQ non è sintetizzato nei mammiferi, pertanto può essere ottenuto solamente tramite l'alimentazione o da batteri enterici. Nei tessuti umani e di ratto sono state infatti rilevate tracce di PQQ (a livelli da picomolare a nanomolare) e una quantità particolarmente elevata nel latte umano a causa della sua presenza negli alimenti di uso quotidiano, comprese carne e verdure.

Studi nutrizionali hanno rivelato che la carenza di PQQ nei topi e nei ratti mostra varie risposte sistemiche, tra cui compromissione della crescita, risposta immunitaria compromessa, prestazioni riproduttive anomale e quoziente respiratorio ridotto.

Sebbene il PQQ non sia stato ancora approvato come vitamina, è stato dimostrato un suo coinvolgimento nelle vie di segnalazione cellulare, nella di promozione della crescita ed in effetti antidiabetici.

È inoltre un potente antiossidante che funge da cardio e neuroprotettore e svolge un ruolo nella modulazione del contenuto mitocondriale (M. Akagawa *et al*).

Il comportamento redox di questo composto è attribuito al gruppo o-chinone, che può essere ossidato alla forma chinone (PQQ), semi-ridotto a semichinone (PQQH.), o completamente ridotto a chinolo (PQQH₂).

Studi recenti hanno mostrato che il PQQ può agire come un efficiente catalizzatore di trasferimento di elettroni da vari substrati organici all'ossigeno molecolare (O₂). Inoltre, il PQQ può subire una reazione di riduzione per formare PQQH₂ in presenza di ascorbato, NAD(P)H e glutatione. A seguito di questa reazione, il PQQH₂ generato viene quindi ossidato nuovamente nel chinone originale attraverso la riduzione di due equivalenti riducenti di ossigeno molecolare (O₂) in anione superossido (O₂⁻, poi dismutato dalla SOD). Pertanto, sembra che il PQQ possa avere la capacità di catalizzare continue reazioni cicliche redox, è quindi un proossidante in grado di generare ROS, H₂O₂ e O₂⁻.

3.2 Biosintesi

PQQ è derivato dai due amminoacidi glutammato e tirosina codificati nel peptide precursore PqqA. Per formare questo cofattore chinone sono necessarie cinque reazioni e diversi geni (PqqA-G). La prima fase della biosintesi è l'espressione di PqqA come precursore di PQQ.

Il peptide PqqA è riconosciuto da PqqE, che lega gli atomi di carbonio del glutammato e della tirosina (che poi diventeranno il C9 e C9a del PQQ) e quindi consente il riconoscimento e l'accettazione del PqqA modificato da PqqF. Nella seconda fase PqqF rimuove gli amminoacidi collegati. La successiva reazione (base di Schiff) è spontanea, mentre la seguente diossigenazione è catalizzata da un enzima sconosciuto. Le ultime fasi di ciclizzazione e ossidazione sono catalizzate da PqqC.

Ad oggi la conoscenza delle proteine nella via della biosintesi del PQQ può essere suddivisa in quattro categorie: del tutto sconosciuta (PqqD), informazioni funzionali basate su studi mutazionali (PqqA), sull'omologia di sequenza (PqqE e PqqF), sulla struttura cristallina (PqqB), e sulla struttura cristallina ed evidenze sperimentali (PqqC). PqqA è invece noto per essere il precursore di PQQ (S. Puehringer *et al*).

3.3 Supplementazione di PQQ in combinazione con allenamento di resistenza per il miglioramento della biogenesi mitocondriale

Il pirrolochinolina chinone (PQQ) è stata identificato come un possibile nuovo integratore coinvolto in processi fisiologici tra cui la modulazione redox, il metabolismo energetico cellulare e la biogenesi mitocondriale. Poiché sia l'allenamento di resistenza che la supplementazione di PQQ hanno meccanismi associati alla biogenesi mitocondriale, è plausibile che possano stimolare una risposta ergogenica sinergica.

La biogenesi mitocondriale è un processo biologico complesso che mantiene il numero e le dimensioni dei mitocondri e richiede l'espressione coordinata dei genomi sia nucleari che mitocondriali attraverso l'azione di cofattori specifici per codificare specifiche proteine mitocondriali. A questo proposito, il coattivatore 1 α del proliferatore gamma del perossisoma (PGC-1 α) è stato identificato come coattivatore di trascrizione che aumenta l'espressione di vari fattori di trascrizione per aumentare l'espressione di geni coinvolti nella biogenesi mitocondriale.

Alcuni di questi importanti fattori di trascrizione includono i fattori respiratori nucleari (NRF-1, NRF-2) e il fattore di trascrizione mitocondriale A (TFAM). Questi sono coinvolti nella regolazione della trascrizione dei principali enzimi mitocondriali e svolgono anche un ruolo di mediazione nella sintesi del DNA mitocondriale (mtDNA).

PGC-1 α è dunque coinvolto in vari processi metabolici (oltre alla biogenesi mitocondriale), tra cui gluconeogenesi, regolazione enzimatica antiossidante e mediazione degli adattamenti indotti dall'esercizio nel muscolo scheletrico.

Le ricerche attuali su modelli in vivo o in vitro suggeriscono che l'integrazione con PQQ induca aumenti nei marcatori della biogenesi mitocondriale (PGC-1 α , CREB e NRF-1/2). Un programma di allenamento di resistenza combinato con la supplementazione di PQQ potrebbe quindi stimolare un effetto ergogenico nell'uomo (P. Hwang, D.S. Willoughby).

Lo studio PS Hwang *et al* ha esaminato gli effetti di un programma di allenamento di resistenza di sei settimane combinato con la supplementazioni di 20mg/die di PQQ (oppure di placebo PLC) sulla biogenesi mitocondriale e sulle prestazioni aerobiche di ventitré uomini sedentari. La loro composizione corporea è stata valutata mediante

densitometria assiale a raggi X (DEXA). Inoltre, le prestazioni dell'esercizio aerobico e il PGC-1 α sono stati valutati prima e dopo il programma di allenamento/integrazione di sei settimane.

I risultati hanno mostrato che il gruppo PQQ ha ottenuto un aumento significativo dei livelli di proteina PGC-1 α dal basale all'allenamento di resistenza rispetto al PLC ($p < 0,05$). Inoltre, il gruppo PQQ ha raggiunto livelli di proteina PGC-1 α ancora più elevati dopo 6 settimane di allenamento di resistenza rispetto al PLC ($p < 0,05$) (P.S. Hwang *et al*).

4. SCOPO DEL LAVORO

Il tessuto muscolare è un tessuto altamente ricco di Coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀), ma risulta essere uno dei tessuti umani più refrattari alla supplementazione esogena con Coenzima Q₁₀ (Andreani *et al*). In base a ciò, che è documentato dalla letteratura, la concentrazione di CoQ₁₀ mitocondriale è prossima alla Km dei complessi respiratori mitocondriali; quindi, in condizioni fisiologiche piccole variazioni dei livelli di CoQ₁₀ mitocondriale corrispondono a significative variazioni della funzionalità dei complessi mitocondriali (G. Lenaz *et al*). Questo concetto è alla base del rationale relativo ai benefici della supplementazione; tuttavia, lascia anche pensare che per una ottimale funzionalità respiratoria il CoQ₁₀ non sia naturalmente presente in condizioni saturanti.

Basandoci su queste considerazioni abbiamo ipotizzato che nei tessuti ricchi di mitocondri, quali il muscolo scheletrico, la minore refrattarietà all'incorporazione di CoQ₁₀ esogeno sia legato alla massa mitocondriale e pertanto una valida strategia per aumentare la biodisponibilità muscolare del Coenzima Q₁₀, potrebbe essere quello di aumentare la biogenesi mitocondriale.

In base a ciò lo scopo di questo progetto di tesi è stato quello di conseguire un incremento di biodisponibilità dei livelli di Coenzima Q₁₀ muscolare in un modello in vitro di muscolo scheletrico murino (C2C12 o mioblasti) tramite lo stimolo della biogenesi mitocondriale, indotta dal trattamento con Pirrolochinolina chinone (PQQ), e la coincubazione con il Coenzima Q₁₀.

Successivamente, verificato che lo stimolo della biogenesi mitocondriale avesse aumentato i livelli muscolari di CoQ₁₀, abbiamo analizzato se l'aumento dei livelli di ubiquinone cellulare permettesse alle cellule un miglioramento nel recupero delle capacità antiossidanti a livello cellulare e mitocondriale, dopo uno stress ossidativo indotto da perossido di idrogeno (H₂O₂).

Infatti, lo stress ossidativo è alla base dei meccanismi che innescano a livello cellulare e mitocondriale la sarcopenia muscolare nei soggetti anziani, quindi l'aumento dei livelli di un antiossidante noto, come l'ubichinone, e il miglioramento della capacità antiossidante cellulare e mitocondriale permetterebbero di contrastare a livello biochimico alcune manifestazioni tipiche del muscolo sarcopenico.

Il lavoro è stato suddiviso in tre parti:

- Definizione della dose ottimale di PQQ per aumentare la biogenesi mitocondriale nelle cellule muscolari murine;
- Quantificazione del CoQ₁₀ cellulare e il CoQ totale nel muscolo murino a seguito del trattamento con PQQ da solo e in associazione con CoQ₁₀;
- Verificare che l'aumento di CoQ₁₀ nel muscolo murino aumenti le capacità di recupero cellulare e mitocondriale a seguito dell'esposizione ad un insulto ossidativo (H₂O₂).

5. MATERIALI E METODI

5.1 Riduzione del Coenzima CoQ₁₀

Il coenzima CoQ ossidato è stato disciolto in Cremophor (Polyoxyl 40 Hydrogenated Castor Oil) a bagnomaria a 60°C, a questa soluzione è stato aggiunto del sodio boroidruro diluito in acqua milliQ per l'ossidazione del coenzima Q ed in seguito l'esano per il recupero della frazione di interesse, ad una proporzione di

0.5 (H₂O): 1 (esano): 2.5 (EtOH)

Trascorsi i 15 minuti per la separazione di fase l'esano è stato fatto evaporare sotto cappa

chimica mediante flusso di azoto. Al coenzima CoQ ridotto così ottenuto è stato quindi aggiunto Kremophor e glicerolo a 60°C alla proporzione finale di

10 (kre):4 (CoQ):6 (glicerolo)

Il campione è stato aliquotato in eppendorf successivamente conservate a -80°C. È stata infine effettuata una quantificazione della concentrazione e dei livelli di ossidazione del Coenzima Q₁₀ tramite HPLC.

5.2 Preparazione Pirrolochinoline-chinone

Il prodotto è stato acquistato dalla Mitsubishi (Japan) sottoforma di polvere, è stato sciolto direttamente in mezzo completo per ottenere delle stock alla concentrazione di 10 mM, da conservare al -20°C.

5.3 Colture cellulari

Per il progetto sono stati coltivati mioblasti murini (C2C12) in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplementati con 10% di siero fetale bovino (FBS) inattivato al calore, 1% di glutammina (2mM), penicillina e streptomina, mantenuti in incubatore alle condizioni standard di 37°C e 5% CO₂.

Per quanto riguarda le misurazioni di CoQ₁₀ cellulare, i mioblasti una volta raggiunta una confluenza del 90% sono stati trattati per 48 ore con PQQ (30 e 100 µM) e durante le ultime 24 ore è stato aggiunto CoQ₁₀ per consentire la co-incubazione di PQQ e ubichinone.

5.4 Quantificazione numero di copie DNA mitocondriale (mtDNA/nDNA)

Per misurare il numero di copie di DNA mitocondriale nei mioblasti murini abbiamo eseguito una real-time-PCR su DNA genomico.

La real-time PCR (o PCR quantitativa, qPCR) è un metodo di PCR con il quale si misura

l'aumento della quantità di DNA mentre viene amplificato. Questa tecnica prevede come una normale PCR la denaturazione del DNA, l'appaiamento dei primer, e la loro estensione ad opera di una DNA polimerasi termostabile come la Taq polimerasi.

Tuttavia, differisce da una normale PCR durante la fase di estensione dei primer (allungamento). La miscela di reazione per la sintesi del DNA contiene il SYBR Green, un intercalante del DNA a elevatissima sensibilità. Durante la PCR, quando il DNA è a singolo filamento non c'è fluorescenza rilevabile (il SYBR Green libero emette una debole fluorescenza) mentre quando i primer vengono estesi e viene prodotto DNA a doppio filamento il colorante SYBR Green si lega alle regioni di DNA a doppio filamento ed emette un'intensa fluorescenza.

Quantificando la fluorescenza, si misura in tempo reale, durante la sintesi di nuovo DNA, la quantità di DNA a doppio filamento nella reazione. Questa misura richiede l'uso di uno speciale termociclatore che utilizza un sistema laser per rilevare la fluorescenza prodotta dopo ogni ciclo di PCR. Il prodotto di reazione (il DNA amplificato e marcato con SYBR Green) può essere confrontato con controlli che contengono quantità note di DNA di riferimento (P.J. Russell).

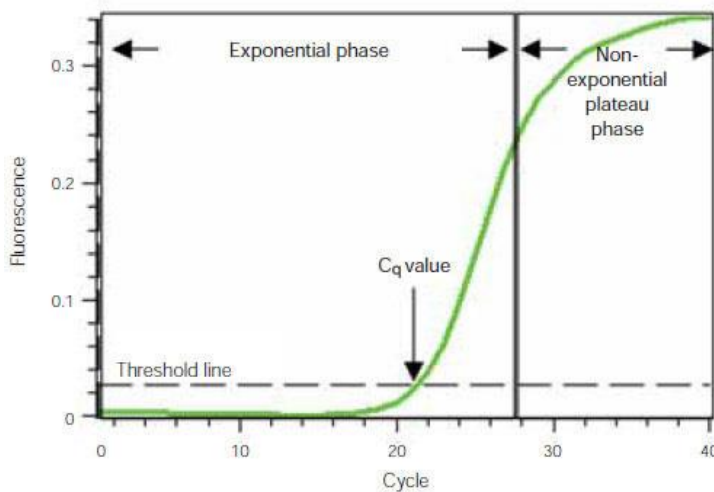


Figura 7. diagramma di amplificazione qPCR: l'asse x indica i numeri di cicli PCR mentre l'asse y la fluorescenza dalla reazione di amplificazione (proporzionale alla quantità di prodotto amplificato in provetta). È suddiviso nella fase esponenziale (dove il prodotto della PCR raddoppia a ogni ciclo) seguita da una fase di plateau (dove uno o più componenti della reazione diventano limitanti). (Biorad)

Per eseguire la real-time PCR sono stati adoperati due primer diretti verso sequenze geniche codificate una sul genoma mitocondriale e l'altra sul genoma nucleare. Nello specifico per

amplificare e quantificare il gene mitocondriale è stata utilizzata una regione di DNA mitocondriale (mtCOX1, complesso respiratorio mitocondriale), mentre per il gene nucleare normalizzatore è stata utilizzata una regione di DNA nucleare (Tubulina). Di seguito sono riportati i due primers utilizzati:

- mtCOX1-F: 5'- TCTACTATTTCGGAGCCTGAGC-3'
- mtCOX1-R: 5'-CAAAAGCATGGGCAGTTACGA3'
- Tubulin F: 5'-TAGCAGAGATCACCAATGCC-3'
- Tubulin R: 5'- GGCAGCAAGCCATGTATTTA-3'

I mioblasti seminati alla concentrazione iniziale di 6250/cm₂ sono stati lasciati crescere fino ad ottenere la confluenza. In seguito, sono stati trattati con concentrazioni crescenti 100nm-100µM di PQQ per 48h, ed i campioni sono stati tripsinizzati e centrifugati (600g X 5min) per ottenere dei pellet secchi (conservati a -80°C).

Il DNA totale è stato estratto dai mioblasti utilizzando l'Exgene kit (Geneall), il DNA totale è stato quantificato al lettore di piastra.

Sono stati adoperati circa 10ng di DNA con il SYBR green dye (iQTMUniversal SYBR Green Supermix, Bio-Rad Laboratories Inc., US) su un sistema di rilevamento CFX Connect Real Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Inc., US). La quantificazione delle differenze relative al numero di copie è stata condotta utilizzando il metodo delta deltaCt.



Figura 8. CFX Connect Real Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Inc., US).

5.5 Quantificazione massa mitocondriale tramite citofluorimetro e microscopio a fluorescenza

Le C2C12 sono state seminate su multiwell da 24 alla concentrazione iniziale di 6250/cm₂.

Raggiunta la confluenza sono state trattate con PQQ per 48h a concentrazioni crescenti da 100nm-100µM. Al termine dell'incubazione sono state osservate al microscopio invertito (Olympus) per accertare l'assenza di cellule morte. Le C2C12 sono state quindi lavate con tampone fosfato (PBS) e incubate con soluzione Mitotracker Green FM (MTG) 100nM in PBS per 30 min al buio.

Mitotracker Green FM (Invitrogen), è una sonda mitocondriale fluorescente verde (Ex/Em: 490/516 nm) contenente una parte clorometilica leggermente reattiva ai tioli. Dopo incubazione con cellule vive si localizza nei mitocondri indipendentemente dal potenziale di membrana mitocondriale. Inoltre, è essenzialmente non fluorescente in soluzioni acquose e diventa fluorescente solo quando si accumula nell'ambiente lipidico dei mitocondri (*ThermoFisher, MitoTracker probes*).

Chemical Structures

Molecular formula: C₃₄H₂₈Cl₅N₃O

Molecular weight: 671.8797

CAS Name/Number: Benzoxazolium, 2-[3-[5,6-dichloro-1,3-bis[4-(chloromethyl)phenyl]methyl]-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-ylidene]-1-propenyl]-3-methyl-, chloride 201860-17-5

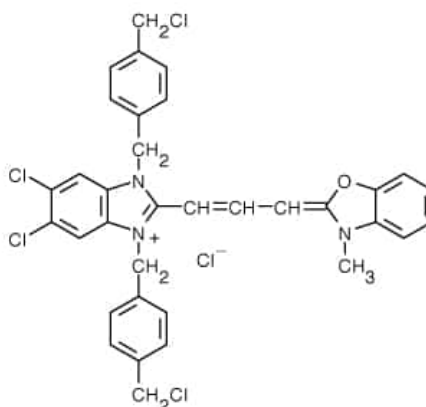


Figura 9. Struttura della sonda Mitotracker Green FM

Le cellule sono state lavate in PBS e tripsinizzate in modo da ottenere dei pellet secchi, in seguito risospesi in PBS freddo e analizzati utilizzando il citometro a flusso GuavaEasyCyte (Luminex, USA). I parametri impostati sono stati: FSC 53,8; SSC 30,6; G 39,7; Y 1; R 1. La fluorescenza è stata misurata nel canale verde GRN, i controlli negativi sono stati settati arbitrariamente con un gate corrispondente ad un 40% di popolazione con un'alta fluorescenza verde.

gate corrispondente ad un 40% di popolazione con un'alta fluorescenza verde.

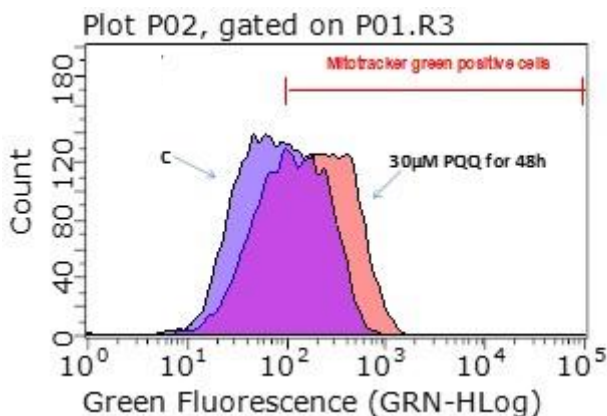


Figura 10. diagramma dello shift di fluorescenza emessa dal MitoTracker Green FM. Istogramma blu rappresenta controllo negativo (C) e l'istogramma rosso rappresenta il trattamento con 30 μ M PQQ per 48h.

5.6 Quantificazione contenuto CoQ₁₀ e CoQ cellulare

Per quanto riguarda le misurazioni di CoQ₁₀ cellulare, i mioblasti, una volta raggiunta una confluenza del 90%, sono stati trattati con PQQ e CoQ₁₀ come riportato nel paragrafo relativo alle colture cellulari. Successivamente le C2C12 sono state raccolte, tramite centrifugazione a 600g per 5 minuti a temperatura ambiente, il pellet recuperato è stato risospeso in 100 μ L di PBS e suddiviso in due eppendorf da 50 μ L: una destinata alla misurazione HPLC e la seconda portata a secco per il BCA assay). Nel campione destinato alla quantificazione in HPLC la fase lipidica è stata estratta con 250 μ L di isopropanolo e successivamente quantificata utilizzando il sistema HPLC (Nanospace, Shiseido, Tokyo, Giappone) dotato di un rivelatore elettrochimico.

Nello specifico il sistema HPLC è composto da un autocampionatore, un comparto a temperatura controllata dedicato ad ospitare le colonne analitiche impiegate, una doppia pompa, una switching valve (valvola di commutazione), un degasatore e un rivelatore elettrochimico (ECD). Per quantificare le diverse isoforme di CoQ, questo sistema utilizza due diverse fasi mobili:

- Fase mobile 1 = metanolo-acqua (95:5 v/v)
- Fase mobile 2 = metanolo-propanolo (70:30 v/v)

Non appena il campione viene iniettato dall'autocampionatore, la prima fase mobile, viene pompata a 200 μ L/min trasportando il campione nella colonna concentrante che è in grado di trattenere i composti lipofili (incluso il CoQ).

Dopo 3 minuti, la switching valve commuta permettendo alla seconda fase mobile di entrare nella colonna concentrante al flusso inverso e di raccogliere le molecole trattenute e trasportarle nella colonna analitica.

Dopo la separazione delle molecole in base alle loro caratteristiche chimiche e chimico-fisiche, queste vengono convogliate nella colonna riducente posizionata a valle di quella analitica. Quest'ultima rappresenta una particolarità del sistema: è una colonna in grado di ridurre tutte le molecole ossidate prima di essere rilevate dal detector. Si tratta di un passaggio fondamentale in quanto, il detector elettrochimico impiegato in questo sistema ossida tutti gli analiti che lo attraversano generando una differenza di potenziale elettrico proporzionale alla loro quantità. Pertanto, per rendere le molecole rilevabili, devono essere ridotte.

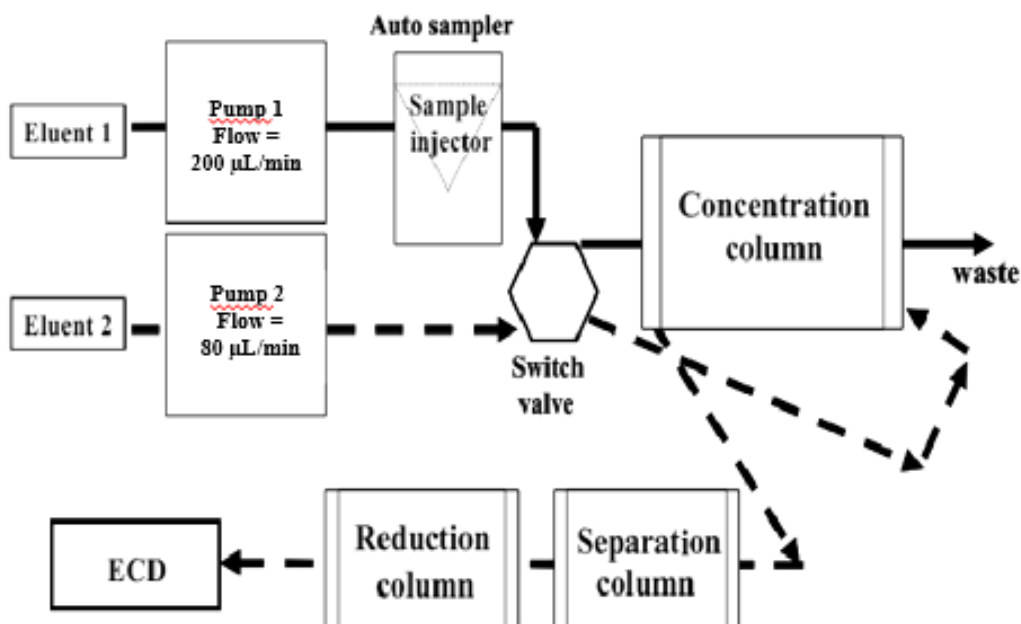


Figura 11. schema del percorso di elaborazione dei campioni con l' HPLC

Per quantificare le aree dei picchi ottenuti in seguito alla corsa cromatografica di ciascun campione, in ogni giornata sperimentale viene eseguita una retta di taratura mediante l'impiego di standard di CoQ₉ e CoQ₁₀ ossidati a concentrazioni note. I dati ottenuti, espressi inizialmente come ug/mL), sono stati normalizzati al contenuto proteico totale quantificato dal Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, US).

Questo saggio combina la nota riduzione di Cu⁺⁺ a Cu⁺ delle proteine in un mezzo alcalino

(la reazione del biureto) con la rilevazione colorimetrica altamente sensibile e selettiva del catione rameoso Cu^+ utilizzando un reagente che contiene acido bicinconinico (BCA).

Il prodotto di reazione di colore viola (che dipende dalla struttura macromolecolare delle proteine, il numero dei legami peptidici e la presenza di quattro particolari aminoacidi: cisteina, cistina, triptofano e tirosina) è formato dalla chelazione di due molecole di BCA con uno ione rameoso. Questo complesso idrosolubile mostra un forte assorbimento a 562 nm che è pressoché lineare con concentrazioni proteiche crescenti su un ampio intervallo di lavoro (20-2000 $\mu\text{g/mL}$).

Le concentrazioni proteiche sono determinate e riportate in riferimento agli standard dell'albumina sierica bovina (BSA). Come primo passaggio si prepara una serie di diluizioni a concentrazione nota di BSA che vengono successivamente analizzate insieme ai campioni a concentrazione incognita. La procedura su microplate prevede una proporzione di campione proteico e working reagent (WR) 1:8.

Dopo aver aggiunto il WR alla piastra (preparato miscelando 50 parti del reagente A con 1 parte del reagente B), quest'ultima viene messa in agitazione nel plate shaker per 30 secondi, incubata per 30 minuti a 37°C e lasciata raffreddare al buio per 10 minuti. Si misura quindi l'assorbanza a 562 nm su un lettore di piastra (da cui si sottrae l'assorbanza dei bianchi) e si calcola/traccia una curva standard/retta di interpolazione della misurazione media a 562 nm per ogni standard rispetto alla sua concentrazione in $\mu\text{g/mL}$. Dalla curva standard si determina la concentrazione proteica di ogni campione, dividendo i μg di proteina per campione ottenuti per il volume in μL aggiunti a pozzetto.

Come precedentemente indicato, per quantificare il contenuto CoQ_{10} e CoQ totale (dato dalla somma di CoQ_{10} e CoQ_9) si normalizzano i $\mu\text{g/mL}$ di CoQ_{10} e CoQ cellulare ottenuti tramite la misurazione con l'HPLC con i $\mu\text{g/mL}$ di proteine conseguiti dalla misurazione con il BCA assay. I valori ottenuti saranno così espressi $\text{CoQ}_{10}/\text{Prot}$ ($\mu\text{g}/\text{mg}$) e CoQ totale ($\text{CoQ}_{10}+\text{CoQ}_9$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot).

5.7 Modello di stress ossidativo chimico indotto con perossido di idrogeno (H_2O_2)

Per verificare un miglioramento del recupero delle difese antiossidanti cellulari e mitocondriali dovuto all'aumento intracellulare di CoQ (indotto dallo stimolo della biogenesi mitocondriale), le C2C12 sono state coltivate in una MW24, ad una concentrazione iniziale di $6250/\text{cm}^2$.

Una volta raggiunta una confluenza del 90% i mioblasti sono stati pretrattati con PQQ, CoQ₁₀ e PQQ + CoQ₁₀ come descritto nel paragrafo delle colture cellulari. Per indurre stress ossidativo, i mioblasti sono stati trattati con H₂O₂ [0,3mM] per 1h, poi rimossa e sostituita da DMEM HG per 4h (controllo positivo). Questo tipo di modello di stress ossidativo è stati ripreso e modificato dall'articolo di Guescini *et al.*

5.8 Misurazione ROS intracellulari

Le C2C12 venivano pretrattate con PQQ, CoQ₁₀ e PQQ + CoQ₁₀ come nel paragrafo delle colture cellulari. Al termine dell'incubazione con lo stressore H₂O₂ le C2C12 sono state trattate con la sonda per ROS intracellulari (2'-7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetate (H₂DCFDA), incubate per 30 minuti e lavate in PBS due volte per rimuovere la sonda in eccesso.

In particolare, H₂DCF è presente nella forma diacetata (H₂DCFDA) o nella forma acetometil estere (H₂DCFDA-AM). La sonda entra a livello della membrana cellulare dove le esterasi rimuovono il gruppo acetile (CH₃-C=O) formando un composto ionico e così impedendo la sua fuoriuscita. L'ossidazione da parte dei ROS intracellulari di H₂DCF (è un substrato per le perossidasi in grado di mettere in evidenza sia l'acqua ossigenata che la mieloperossidasi) genera la DCF che è altamente fluorescente ed emette nel verde (Ex/Em: 498/522 nm).

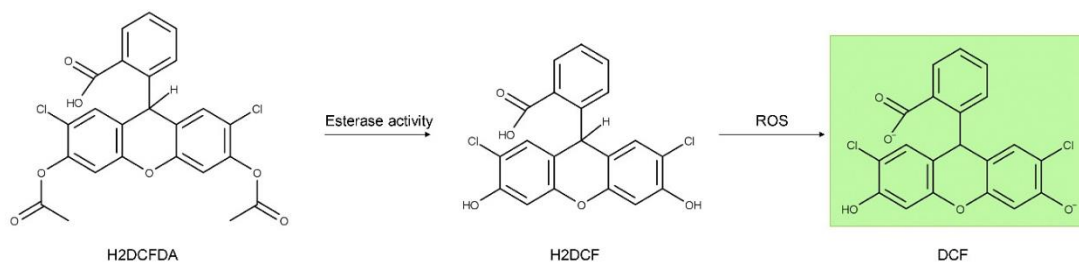


Figura 12. meccanismo d'azione della sonda per ROS citosolici H₂DCFDA. All'interno della membrana cellulare viene processata dalle esterasi a H₂DCF, poi ossidata dai ROS nel composto fluorescente DCF misurabile tramite citofluorimetria a flusso

Le cellule sono state raccolte e trasferite in eppendorf, in seguito centrifugate a 350g per 6 minuti. Sono stati trasferiti 15µL di pellet in 135µL di soluzione PBS-ViaCount (Via Count diluito 5 volte) ed i campioni così ottenuti incubati per almeno 10 minuti ed infine acquisiti al citofluorimetro.



Figura 13. Citofluorimetro GuavaEasyCyte (Luminex,USA).

La soluzione Guava® ViaCount™ consente l'analisi quantitativa della conta cellulare e della vitalità. Può distinguere cellule vitali, apoptotiche e morte grazie alla permeabilità differenziale di due coloranti che legano il DNA. Il primo colorante colora solo le cellule nucleate, mentre il secondo di colora intensamente le cellule apoptotiche (i detriti cellulari sono esclusi dai risultati in base alla colorazione negativa con il colorante nucleare) (Luminex Corporation. A DiaSorin Company).

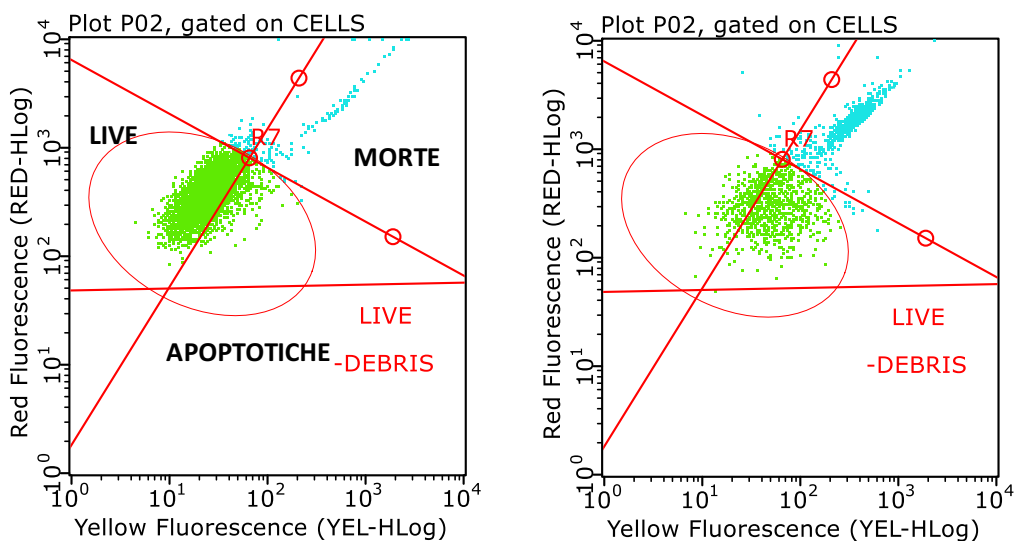


Figura 14. Dot plot caratteristici, fibroblasti di derma umano non trattati (grafico sulla sinistra) e fibroblasti trattati con una forte esposizione agli UVA. Lo shift della popolazione va verso le regioni di cellule apoptotiche e morte

L'analisi al citofluorimetro fornisce un dot plot (dove ogni punto corrisponde a un evento o una cellula) che permette di studiare la vitalità delle sospensioni cellulari (discriminate grazie alla soluzione ViaCount). Selezionando il gate nella regione delle cellule vive si può quindi misurare la popolazione di cellule che emette fluorescenza (grazie alla sonda di ROS

intracellulari DCF) in risposta allo stress ossidativo provocato dall' H_2O_2 . Si ottengono degli istogrammi nel canale di emissione del verde che shiftano o aumentano la loro fluorescenza a seconda del contenuto di ROS cellulari. Il gate o regione HIGH, percentuale di cellule con alto livello di ROS cellulari, viene arbitrariamente stabilito analizzando lo shift tra controllo negativo e cellule stressate con perossido di idrogeno, nel nostro caso il gate HIGH per il controllo negativo è fissato intorno tra il 10 e 15% (Fig. 15). I parametri impostati sono stati: FSC 16; SSC 4,2; G 1; Y 5,66; R 7,66.

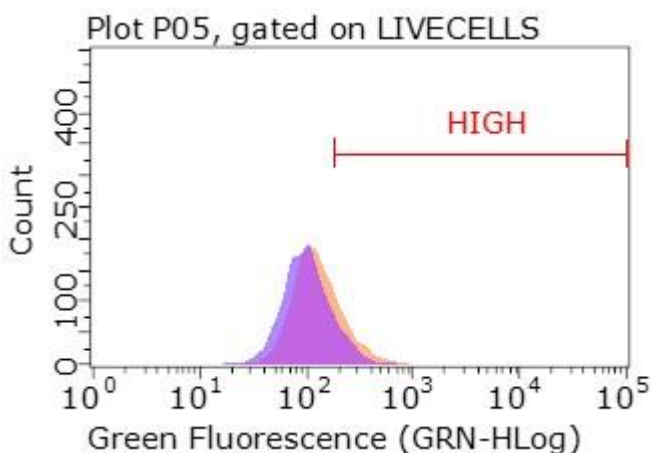


Figura 15. Grafico ad istogrammi riferito alla fluorescenza verde emessa dalla DCF, per la quantificazione dei ROS cellulari. Il gate HIGH viene settato arbitrariamente tra il 10 e 15 % analizzando lo shift di fluorescenza tra il basale (istogramma blu) e il controllo positivo (istogramma rosso)

5.9 Misurazione ROS mitocondriali

Per la determinazione dei ROS mitocondriali, nello specifico dell'anione superossido (prodotto per leakage mitocondriale a livello del complesso III della catena di trasporto elettronico), le C2C12 sono state seminate in una MW24, ad una concentrazione iniziale di $6250/cm^2$, una volta raggiunta una confluenza del 90% sono state trattate con la combinazione di PQQ-CoQ₁₀ (come precedentemente illustrato nel paragrafo delle colture cellulari) ed in seguito con la sonda MitoSOX Red (ossidata dal superossido esibisce una fluorescenza rossa, Ex/Em: 510/580 nm) ed incubata per 15 minuti.

Dopo la rimozione del surnatante le cellule sono state tripsinizzate, raccolte ed acquisite al citofluorimetro. I parametri impostati sono stati: FSC 16; SSC 4,2; G 1; Y 5,66; R 7,66. La fluorescenza è stata misurata nel canale rosso, i controlli negativi sono stati settati arbitrariamente con un gate corrispondente ad un 10% di popolazione con un'alta

fluorescenza di Mitosox o percentuale di cellule con alto livello di ROS mitocondriali (HIGH mtROS) (Fig.16).

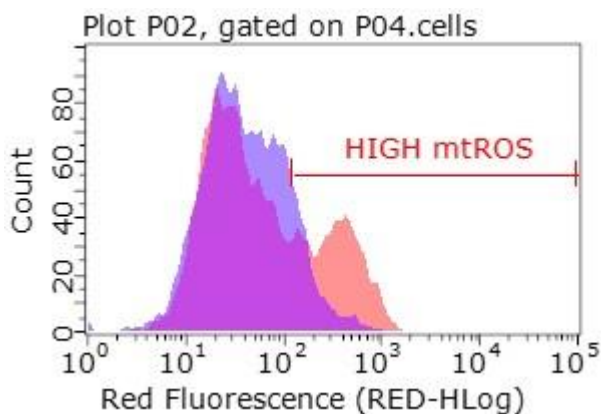


Figura 16. Grafico ad istogrammi riferito alla fluorescenza rossa emessa dal Mitosox, per la quantificazione dei ROS mitocondriali. Il gate HIGH mtROS viene settato arbitrariamente tra il 10 e 15 % analizzando lo shift di fluorescenza tra il basale (istogramma blu) e il controllo positivo (istogramma rosso)

5.10 Statistica

Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato sperimentale.

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

6. RISULTATI

6.1. Definizione della dose ottimale di PQQ per aumentare la biogenesi e massa mitocondriale

È stato testato un range di concentrazioni di PQQ da 100 nM a 100 μ M per 48 ore in relazione alla loro capacità di promuovere la biogenesi mitocondriale nelle C2C12, quantificata mediante il numero di copie del mtDNA e la misurazione citofluorimetrica del Mitotracker Green. Le concentrazioni sono state selezionate in base ai dati riportati in letteratura (Saijara et al 2017, Chohanadisai *et al* 2010).

L'analisi di imaging con Mitotracker Green ha mostrato una fluorescenza verde più brillante nella rete mitocondriale nelle C2C12 trattate con 30 μ M rispetto al controllo negativo (Figura 17).

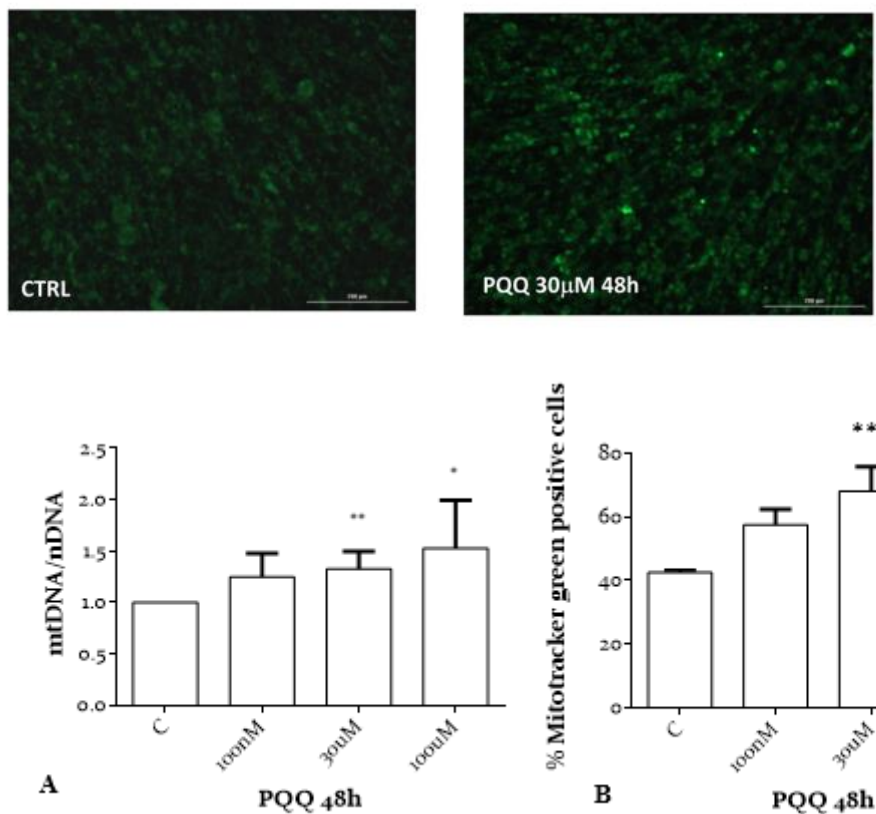


Figura 17. Il trattamento con PQQ aumenta la biogenesi e massa mitocondriale nelle C2C12 (A). Immagini indicative dell'aumento di fluorescenza del Mitotracker Green FM osservato sul trattamento con PQQ 30 μ M per 48h (PQQ 30 μ M 48h) rispetto al controllo negativo (CTRL) (B). Quantificazione numero di copie DNA mitocondriale (C) e misura percentuale cellule Mitotracker verdi positive (D) in mioblasti trattati con PQQ a 100 nM, 30 e 100 μ M per 48h. Dati riportati come media \pm SD (n=3). Statistica calcolata con Anova test (vs C; $p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$; $p^{***} < 0,001$; $p^{****} < 0,0001$)

L'incubazione con PQQ a 30 μ M per 48 ore è stata quindi in grado di aumentare il numero di copie del mtDNA (+33%, $p < 0,01$, Fig.17A), così come la massa mitocondriale (+25%, $p < 0,01$, Fig.17B). L'incubazione con PQQ a 100 μ M per 48 ore è in grado di aumentare in maniera maggiore le copie di mtDNA (+50%, $p < 0,05$, Fig.17A) rispetto all'aumento di massa mitocondriale (+23%, $p < 0,05$, Fig.17B).

6.2. Quantificazione del CoQ₁₀ cellulare e del CoQ totale nel muscolo murino a seguito del trattamento con la combinazione di PQQ e CoQ₁₀

Il CoQ₁₀ non è la principale forma di ubiquinone nelle cellule murine, ne rappresenta infatti solo una frazione mentre la maggioranza è costituita da CoQ₉. Di conseguenza, è stato possibile incorporare efficientemente 10 μ g/ml di CoQ₁₀ esogeno nei mioblasti in coltura aumentandone il livello di 8 volte rispetto al controllo non trattato (0,005 vs 0,042 CoQ₁₀)

$\mu\text{g}/\text{mg prot}$, $p < 0,0001$, Fig.18A). La co-incubazione di PQQ migliora quindi l'assorbimento di CoQ_{10} nei mioblasti in coltura. Tuttavia, in termini di CoQ totale ($\text{CoQ}_9 + \text{CoQ}_{10}$) è stato ottenuto un aumento del 32% ($p < 0,05$, Fig.18B).

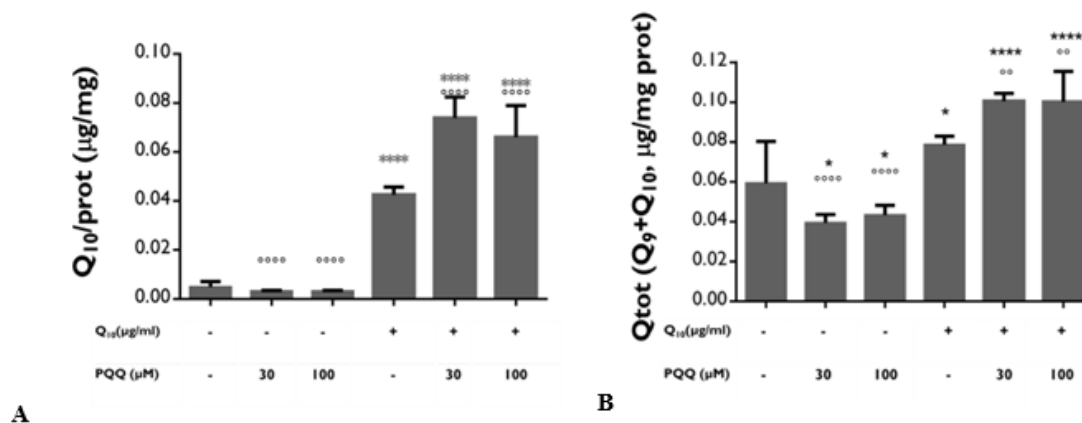


Figura 18. Trattamento con PQQ e CoQ_{10} aumenta la biodisponibilità muscolare di CoQ_{10} e CoQ totale. Nel grafico a sinistra si nota che la co-incubazione di PQQ e CoQ_{10} determina un aumento del livello di CoQ_{10} di circa 8 volte rispetto al controllo non trattato, mentre nel grafico a destra si osserva un aumento del 32% dei livelli del CoQ totale (in quanto il CoQ_{10} rappresenta una frazione nettamente inferiore del CoQ_9 nel CoQ totale). Dati riportati come media \pm SD ($n=3$). Statistica calcolata con Anova test (vs C; $p^* < 0,05$; $** < 0,01$; $*** < 0,001$; $**** < 0,0001$; vs CoQ_{10} ; $p^\circ < 0,05$; $^\circ < 0,01$; $^\circ\circ < 0,001$; $^\circ\circ\circ < 0,0001$)

Il tasso di biosintesi di nuovi mitocondri, stimolato con le sole concentrazioni di PQQ, non è stato però associato ad un aumento del contenuto di CoQ al contrario si registrava una diminuzione complessiva del CoQ totale (-36% $p < 0,05$, Fig. 18B).

6.3. Verifica del miglioramento della capacità di recupero cellulari e mitocondriali esposte ad insulto ossidativo (H_2O_2) in associazione all'aumento di CoQ_{10} cellulare

L'aumento di biodisponibilità di CoQ sembra effettivamente migliorare la capacità di recupero degli antiossidanti cellulari e mitocondriali.

Come riportato nella Figura 19, l'incubazione con perossido di idrogeno aumenta notevolmente il contenuto di ROS cellulari rispetto al controllo negativo (Controllo $13\% \pm 4\%$ vs H_2O_2 $21\% \pm 4\%$, percentuale di cellule con alto livello di ROS cellulari $p < 0,01$). Nelle condizioni non stressate con H_2O_2 , la combinazione PQQ + CoQ_{10} diminuisce in maniera non significativa la percentuale di HIGH ROS cells rispetto al controllo (Controllo $13\% \pm 4\%$ vs PQQ $30\mu\text{M}$, PQQ+ $10\mu\text{g}/\text{ml}$, CoQ_{10} $9\% \pm 1\%$ percentuale di cellule con alto livello di ROS cellulari $p > 0,05$), solo il singolo trattamenti con PQQ risulta

significativamente più protettivo rispetto al controllo (Controllo 13%±4% vs PQQ 30 μM 8%±1%, percentuale di cellule con alto livello di ROS cellulari p<0.05) nel detossificare i ROS cellulari. Nelle condizioni di stress ossidativo si ha un comportamento analogo ed ancora più evidente. Infatti, solo il trattamento con solo PQQ riusciva a diminuire lievemente l'accumulo di ROS citosolici. (H₂O₂ 21%±4% vs PQQ 30μM 15%±1% percentuale di cellule con alto livello di ROS cellulari, p<0.05). La co-incubazione tra i due chinoni risultava la condizione più protettiva nel diminuire l'accumulo di ROS cellulari indotti dall'incubazione con perossido di idrogeno (H₂O₂ 21%±4% vs 30 μM PQQ+10μg/ml CoQ₁₀ 12%±1% percentuale di cellule con alto livello di ROS cellulari, p<0.0001) (Fig.19A).

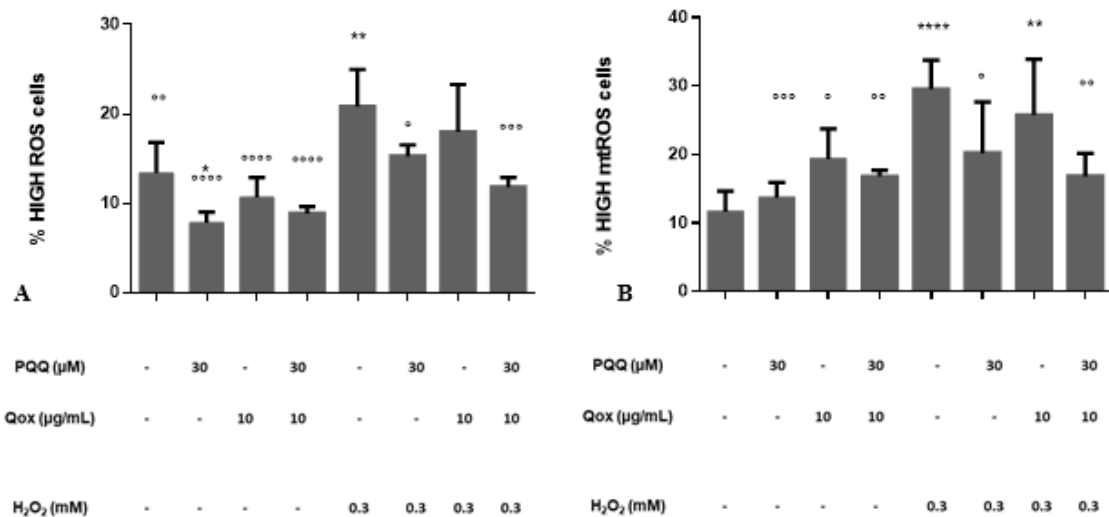


Figura 19. L'aumentata biodisponibilità di CoQ cellulare protegge i mioblasti dallo stress ossidativo cellulare e mitocondriale indotto dal perossido di Idrogeno. Nel grafico a sinistra, la combinazione di PQQ + CoQ₁₀ pare fornire il miglior recupero delle difese antiossidanti cellulari nelle condizioni stressate. Nel grafico a destra, a livello dei ROS mitocondriali la combinazione PQQ + CoQ₁₀ è paragonabile al controllo in condizioni non stressate mentre in condizioni stressate con H₂O₂ risulta la più efficiente nella detossificazione dei ROS. Dati riportati come media±SD (n=3). Statistica calcolata con Anova test (vs C; p* < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001; **** < 0,0001; vs H₂O₂ p° < 0,05; °° < 0,01; °°° < 0,001; °°°° < 0,0001)

A livello di ROS mitocondriali (Fig.19B), l'incubazione con lo stressore H₂O₂ aumenta il contenuto di ROS mitocondriali rispetto al controllo negativo (Control 15%±4% vs H₂O₂ 34%±11, percentuale di cellule con alto livello di ROS mitocondriali p<0.01). In condizioni non stressate con perossido di idrogeno la combinazione di PQQ e CoQ₁₀ è paragonabile al controllo (Fig.19B). Mentre nelle condizioni di stress ossidativo il PQQ singolarmente risulta sempre avere un effetto lievemente protettivo rispetto allo stress con acqua ossigenata (H₂O₂ 34%±11 vs 30 μM PQQ 22%±8% percentuale di cellule con alto livello di ROS

mitocondriali, $p < 0.05$). La condizione più protettiva risulta sempre la con-incubazione tra i due chinoni capace di contrastare l'accumulo di ROS mitocondriali (H_2O_2 $34\% \pm 11$ vs $30 \mu M$ PQQ+ $10 \mu g/ml$ CoQ₁₀ $15\% \pm 5\%$ percentuale di cellule con alto livello di ROS mitocondriali, $p < 0.001$) (Fig.19B)

7. DISCUSSIONE

In conclusione, è noto che la sarcopenia è una malattia degenerativa caratterizzata da disfunzione mitocondriale e squilibrio pro-ossidativo (W.Wang *et al*, B. Chabi *et al*, M. Picard *et al*), i quali portano a danneggiamento e degenerazione del tessuto muscolare.

Basandosi su ciò, molti articoli hanno studiato l'effetto di antiossidanti o fitocomposti che prevenissero lo stress ossidativo e la disfunzione mitocondriale (M.J. Ryan *et al*, M. Ristow *et al*). Il Coenzima CoQ₁₀ è una delle molecole più interessanti nel prevenire o mitigare la disfunzione mitocondriale e il conseguente stress ossidativo nelle fibre muscolari invecchiate. Il limite del trattamento e i dati ancora inconsistenti sugli effetti della supplementazione esogena con il CoQ₁₀ sono legati al limitato uptake di CoQ₁₀ nel muscolo (C. Andreani *et al*, P. Orlando *et al*).

Infatti, la biodisponibilità esogena del CoQ₁₀ nel muscolo è tutt'ora un argomento molto dibattuto e diversi reports evidenziano un assorbimento limitato a livello delle fibre muscolari (Andreani *et al*, L. Ernster, Zhang *et al*), ciò nonostante, in alcuni studi animali è stato osservato un aumento del CoQ₁₀ muscolare dopo l'integrazione con ubiquinone (R.S. Sohal *et al*).

L'evidenza che la concentrazione fisiologica di CoQ₁₀ mitocondriale è prossima alla Km dei complessi respiratori mitocondriali (G. Lenaz *et al*), fa pensare che il numero di mitocondri possano essere un fattore limitante l'uptake di CoQ esogeno, in particolare in cellule ad elevato metabolismo aerobico, e questo spiegherebbe la loro refrattarietà all'incorporazione di CoQ extracellulare. Il numero dei mitocondri potrebbe rappresentare un fattore chiave nell'assorbimento selettivo di CoQ₁₀ nelle cellule caratterizzate da un'elevata velocità del metabolismo aerobico.

Per ottenere questo effetto di aumento della biogenesi mitocondriale abbiamo quindi selezionato il PQQ, un noto chinone con potente azione antiossidante ed efficiente stimolatore della biogenesi mitocondriale su diversi tessuti e linee cellulari (W. Chohanadisai *et al*).

I dati ottenuti in questo lavoro di tesi hanno evidenziato un aumento significativo della massa e biogenesi mitocondriale in presenza di 30 e 100 μM PQQ per 48h (Fig.17)

Una volta stabilito che il PQQ aumenta la massa e la biogenesi mitocondriale nelle cellule muscolari murine si è proseguito con l'analisi dei livelli di CoQ cellulari .

La Figura 18 ha evidenziato che le cellule muscolari murine assorbono il CoQ₁₀ esogeno in maniera notevole ed efficiente, sia a livello di CoQ₁₀ and CoQ totale (Fig.18AeB).

L'incorporazione di CoQ₁₀ esogeno più significativa è stata però ottenuta con la co-incubazione PQQ e CoQ₁₀, come riportato dai grafici relativi al CoQ₁₀ e CoQ totale cellulare (Fig.18AeB).

Questi dati sono in linea con quanto visto in un modello animale murino trattato con ubiquinolo e attività fisica mediante tapis roulant (Andreani et al 2018), che sembra essere efficace nel promuovere la biodisponibilità muscolare dell'ubichinone esogeno rispetto all'integrazione negli animali sedentari.

Inoltre, l'aumento di biodisponibilità del CoQ nei mioblasti è stato in grado di rendere le cellule muscolari murine più resistenti allo stress ossidativo indotto chimicamente tramite il perossido di idrogeno.

In particolare, la co-incubazione PQQ e CoQ₁₀ risulta essere la condizione più efficace nel ridurre i ROS mitocondriali e cellulari (Fig.19AeB).

Un altro aspetto interessante mostrato in Figura 18B ha riguardato il calo di CoQ totale indotto dal solo trattamento con PQQ rispetto ai livelli basali. Questo andamento potrebbe significare che la biogenesi mitocondriale, in queste prime 48h, risulta disaccoppiata dalla biosintesi endogena del CoQ cellulare evidenziando nelle prime fase della biogenesi un deficit di CoQ₁₀ che potrebbe attivare sistemi di traslocazione al momento ignoti. Ulteriori studi a livello di espressione genica sui geni appartenenti al pathway biosintetico del CoQ cellulare e di proteomica saranno necessari per confermare questa ipotesi e investigare in maggior dettaglio potenziali traslocatori attivati in associazione al processo mitocondriogenico.

Il trattamento con la combinazione di PQQ e CoQ₁₀ potrebbe dunque essere una strategia promettente per prevenire la disfunzione mitocondriale nelle fibre muscolari sarcopeniche.

8. CONCLUSIONI

Per confermare l'effetto positivo della biogenesi mitocondriale nell'aumento dell'assorbimento di CoQ₁₀ e per caratterizzare il meccanismo coinvolto nella traslocazione di CoQ₁₀ nei tessuti dovrebbero essere eseguiti ulteriori studi animali o clinici.

L'obiettivo finale in questo contesto sarà quello di approfondire la conoscenza del meccanismo molecolare coinvolto nella relazione tra esercizio fisico, biogenesi mitocondriale e biodisponibilità del CoQ₁₀ con il fine di poter sviluppare un approccio terapeutico basato sulla combinazione personale di esercizio e supplementazione con nutrienti mitocondriali per trattare e prevenire patologie dell'età avanzata come la sarcopenia.

9. BIBLIOGRAFIA

1. T. Dao, A.E. Green, Y.A. Kim , S. Bae , K. Ha, K. Gariani, M. Lee , K.J. Menzies, D. Ryu. Sarcopenia and Muscle Aging: A Brief Overview. *Endocrinol Metab* 2020;35:716-732
<https://doi.org/10.3803/EnM.2020.405>
2. D.J. Wilkinson, M. Piasecki, P.J. Atherton. The age-related loss of skeletal muscle mass and function: Measurement and physiology of muscle fibre atrophy and muscle fibre loss in humans. *Ageing research reviews* 47 (2018) 123-132
3. M. Tieland, I. Trouwborst, B.C. Clark. Skeletal muscle performance and ageing. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2018; 9: 3–19. DOI: 10.1002/jcsm.12238
4. J.Woo MD. Sarcopenia. *Clin Geriatr Med* (2017).
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cger.2017.02.003>
5. E. Marzetti, R. Calvani, M. Cesari, T.W. Buford, M. Lorenzi, B.J. Behnke, C. Leeuwenburgh. Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: From signaling pathways to clinical trials. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45 (2013) 2288–2301
6. P.M. Coen, R.V. Musci, J.M. Hinkley, B.F. Miller. Mitochondria as a Target for Mitigating Sarcopenia. *Front. Physiol.* 9:1883. (2019) DOI: 10.3389/fphys.2018.01883
R. Colombo, E. Olmo *et al.* *Biologia, cellula e tessuti*. Edi-Ermes Edizione 2014, capitolo 8 p203-219
7. Y. Yuana, V. Fernandes Cruzat, P. Newsholme , J. Chenga, Y. Chena, Y. Lua. Regulation of SIRT1 in aging: Roles in mitochondrial function and biogenesis. *Mechanisms of Ageing and Development* Volume 155, April 2016, Pages 10-21
8. D. Seo, S. Lee, N. Kima, K. Ko, B. Rhee, J. Han. Age-related changes in skeletal muscle mitochondria: the role of exercise. *Integrative Medicine Research* (2016) 182–186

M.L. Johnson, M.M. Robinson, K. Nair. Skeletal muscle aging and the mitochondria. Trends Endocrinol Metab. 2013 May; 24(5): 247–256. doi:10.1016/j.tem.2012.12.003.

9. S.E. Alway, J.S. Mohamed, M.J. Myers. Mitochondria Initiate and Regulate Sarcopenia. Exerc Sport Sci Rev. 2017 April; 45(2): 58–69. doi:10.1249/JES.0000000000000101

10. R. Calvani, A. Miccheli, F. Landi, M. Bossola, M. Cesari, C. Leeuwenburgh, C.C. Sieber, R. Bernabei, E. Marzetti. Current nutritional recommendations and novel dietary strategies to manage sarcopenia. J Frailty Aging. 2013; 2(1): 38–53

11. R. S. Sohal, S. Kamzalov, N. Sumien, M. Ferguson, I. Rebrina K. R. Heinrich, and M. J. Forster. Effect of coenzyme Q10 intake on endogenous coenzyme Q content, mitochondrial electron transport chain, antioxidative defenses, and life span of mice Free Radic Biol Med. 2006 Feb 1; 40(3): 480–487. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.037

12. C. Andreani *et al*, Combination of Coenzyme Q10 Intake and Moderate Physical Activity Counteracts Mitochondrial Dysfunctions in a SAMP8 Mouse Model. Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2018, Article ID 8936251, 15 pages <https://doi.org/10.1155/2018/8936251>

13. C. Andreani, C. Bartolacci, M. Guescini, M. Battistelli, V. Stocchi, F. Orlando, M. Provinciali, A. Amici, C. Marchini, L. Tiano, P. Orlando, and S. Silvestri. Combination of Coenzyme Q10 Intake and Moderate Physical Activity Counteracts Mitochondrial Dysfunctions in a SAMP8 Mouse Model. Oxid Med Cell Longev. 2018; 2018: 8936251.

14. I. Hargreaves, R.A. Heaton, D. Mantle. Disorders of Human Coenzyme Q10 Metabolism: An Overview. International Journal of Molecular Sciences 2020

15. A.E. Raizner, Coenzyme Q10. METHODIST DEBAKEY CARDIOVASC J 15 (3) 2019

16. L. Testai, A. Martelli, L. Flori, A.F.G. Cicero, A. Colletti. Coenzyme Q10: Clinical

Applications beyond Cardiovascular Diseases. *Nutrients* 2021, 13, 1697.
<https://doi.org/10.3390/nu13051697>

17. R.S. Sohal, M.J. Forster. Coenzyme Q, oxidative stress and aging. *ScienceDirect Mitochondrion* 7S (2007) S103-S111

18. I Hargreaves, R.A. Heaton and D. Mantle. Disorders of Human Coenzyme Q10 Metabolism: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020

19. P. Navas, M.V. Cascajo, M. Alcazar-Fabra, J.D. Hernandez-Camacho *et al.* Secondary CoQ10 deficiency, bioenergetics unbalance in disease and aging. DOI: 10.1002/biof.1733

20. Mitsugu Akagawa, Masahiko Nakano & Kazuto Ikemoto (2016) Recent progress in studies on the health benefits of pyrroloquinoline quinone, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80:1, 13-22, DOI: 10.1080/09168451.2015.1062715

21. S. Puehringer, M. Metlitzky and R. Schwarzenbacher. The pyrroloquinoline quinone biosynthesis pathway revisited: A structural approach. *BMC Biochemistry* 2008, 9:8 doi:10.1186/1471-2091-9-8

22. P. Hwang, D.S. Willoughby. Mechanisms Behind Pyrroloquinoline Quinone Supplementation on Skeletal Muscle Mitochondrial Biogenesis: Possible Synergistic Effects with Exercise, *Journal of the American College of Nutrition*, 2018 DOI: 10.1080/07315724.2018.1461146

23. P.S. Hwang, S.B. Macheck, T.D. Cardaci, D.T. Wilburn, C.S. Kim, E.S. Suezaki, D.S. Willoughby. Effects of Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) Supplementation on Aerobic Exercise Performance and Indices of Mitochondrial Biogenesis in Untrained Men

24. G. Lenaz , R. Fato, C. Castelluccio, M.L. Genova, C. Bovina, E. Estornell, V. Valls, F. Pallotti, G. Parenti Castelli. The function of coenzyme Q in mitochondria. DOI: 10.1007/BF00226843

25. P.J. Russell, C. Cicchini, A. Marchetti. *Genetica, un approccio molecolare*. Pearson Capitolo 10, p.240
26. M. Guescini, S. Maggio, P. Ceccaroli, M. Battistelli, G. Annibalini, G. Piccoli, P. Sestili, V. Stocchi. Extracellular Vesicles Released by Oxidatively Injured or Intact C2C12 Myotubes Promote Distinct Responses Converging toward Myogenesis. *Int J Mol Sci*. 2017 Nov 22;18(11):2488. DOI: 10.3390/ijms18112488.
27. W. Wang, H. Fang, L. Groom, A. Cheng, W. Zhang, J. Liu, X. Wang, K. Li, P. Han, M. Zheng, *et al*. Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell* 2008, 134, 279–290.
28. Chabi, B.; Ljubicic, V.; Menzies, K.J.; Huang, J.H.; Saleem, A.; Hood, D.A. Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. *Aging Cell* 2008, 7, 2–12
29. M. Picard, D. Ritchie, M.M. Thomas, K.J. Wright, R.T. Hepple. Alterations in intrinsic mitochondrial function with aging are fiber type-specific and do not explain differential atrophy between muscles. *Aging Cell* 2011, 10, 1047–1055.
30. M.J. Ryan, H. J. Dudash, M. Docherty *et al*. Vitamin E and C supplementation reduces oxidative stress, improves antioxidant enzymes and positive muscle work in chronically loaded muscles of aged rats. *Experimental Gerontology*, vol. 45, no. 11, pp. 882–895, 2010.
31. M. Ristow, K. Zarse, A. Oberbach *et al*. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 21, pp. 8665–8670, 2009.
32. P. Orlando, J. Sabbatinelli, S. Silvestri, F. Marcheggiani, I. Cirilli, P. Vusi Dlundla, A. Molardi, F. Nicolini, and L. Tiano. Ubiquinol supplementation in elderly patients

undergoing aortic valve replacement: biochemical and clinical aspects. *Aging* (Albany NY). 2020 Aug 15; 12(15): 15514–15531. DOI: 10.18632/aging.103742

33. L. Ernster and G. Dallner, Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1271, no. 1, pp. 195–204, 1995

34. Y. Zhang, M. Turunen, E.L. Appelkvist. Restricted uptake of dietary coenzyme Q is in contrast to the unrestricted uptake of α -tocopherol into rat organs and cells. *J Nutr* 1996;126:2089–2097. PubMed: 8814196

35. W. Chohanadisai , K.A. Bauerly, E. Tchapanian, A. Wong, G.A. Cortopassi, R.B. Rucker. *J Biol Chem*. 2010 Jan 1;285(1):142-52. Pyrroloquinoline quinone stimulates mitochondrial biogenesis through cAMP response element-binding protein phosphorylation and increased PGC-1alpha expression. DOI: 10.1074/jbc.M109.030130. Epub 2009 Oct 27.

36. Ng, N. and Ooi, L. (2021). A simple Microplate Assay for Reactive Oxygen Species Generation and Rapid Cellular Protein Normalization. *Bio-protocol* 11(1): e3877. DOI: 10.21769/BioProtoc.3877.