

Molecole con attività antiossidante pluri-funzionale da sostanze di origine naturale

G. Beretta¹, A. Ghirardini², P. Granata³, M. Carini¹, R. Maffei Facino¹

¹ Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica “Pietro Pratesi”, Università degli Studi di Milano - Viale Abruzzi 42, 20131, Milano, Italy

² BOTTEGA VERDE s.r.l. – Strada per Pollone 13, 13900, Biella, Italia

³ FEDERCHIMICA – via G. Da Procida 11, 20149, Milano, Italia

Abstract: Da molti anni il nostro laboratorio di ricerca collabora con l'industria cosmetica nel settore degli antiossidanti. Riportiamo in questa presentazione degli interessanti risultati frutto di recenti collaborazioni con l'Industria Bottega Verde. Da una proficua interazione di competenze tra Industria e Università è nato un filone di ricerca nell'ambito delle sostanze naturali volto alla individuazione di molecole che posseggano attività antiossidante pluri-funzionale, in grado di: 1) bloccare i processi perossidativi di natura radicalica, 2) intrappolare le specie promotrici di tali fenomeni (metalli di transizione) e, 3) prevenire i danni cutanei indotti da stress carbonilico, quest'ultimi dovuti all'interazione di specie reattive carboniliche (RCS) che sfuggono alla prima linea di difesa cutanea (glutazione), e sono causa di profonde modificazioni delle molecole strutturali del derma e della loro perdita di funzionalità (invecchiamento cutaneo). Con un approccio tipicamente chimico-farmaceutico, abbiamo selezionato una serie di peptidi di origine naturale, e identificato l'istidil-tirosina (Pluridence®) quale molecola a più ampio ed efficace spettro d'azione, sia in studi in vitro (test in colture di cheratinociti ed in epidermide ricostituita, Episkin®), sia in studi clinici. Da questi promettenti risultati sono nati successivi progetti di ricerca che hanno avuto come oggetto il miele, matrice complessa vegetale già nota in cosmesi ma recentemente riscoperta da “Bottega Verde”. Esso è stato studiato a livello di caratterizzazione della sua componentistica e delle sue proprietà antiossidanti, onde fornire un razionale al suo impiego quale agente dermo-protettivo e dermo-rigenerante. Anche in questo caso l'attività antiossidante, precedentemente caratterizzata da un punto di vista analitico, è stata saggiata in sistemi cell-free e in colture cellulari. Gli studi, ancora in corso, sono attualmente orientati alla identificazione di nuove sue componenti biologicamente attive, ma la cui natura chimica è a tutt'oggi sconosciuta. Infine, sempre nell'ambito di questa collaborazione, sono attualmente oggetto di ricerca sostanze di origine naturale con attività stimolatoria/modulatrice della biosintesi dell'ossido d'azoto presente nella pelle, noto modulatore dermo-protettivo.

INTRODUZIONE

Da alcuni anni stiamo osservando che ciò che spinge l'industria cosmetica a far uso di principi attivi naturali non è più frutto di una moda ma è il risultato di un suo progressivo avvicinamento alla scienza del Naturale. Sempre più frequentemente il mondo dell'industria cosmetica si rivolge al mondo della botanica, della fitochimica, della farmacognosia e delle biotecnologie vegetale per individuare nuovi, originali e sempre più attivi elementi da introdurre nel cosmetico, non più a solo scopo di immagine ma alla ricerca del “funzionale”. L'impulso che ha provocato questo cambio di tendenza che, perché no, ha comportato un notevole salto di qualità nei prodotti nasce dal fatto che nell'area Ricerca e Sviluppo (Research and Development, R&D) dell'industria cosmetica è cambiata l'ottica con cui ci si avvicina al mondo del Naturale. È nata quindi una R&D nel cosmetico che sempre più mutuata dal mondo farmaceutico conoscenze e tecniche: parole come isolamento, caratterizzazione, standardizzazione, saggi di attività in vitro, studi clinici, ecc, ricorrono sempre più spesso nel vocabolario del Chimico Cosmetologo. A questa immagine di serietà e scientificità molto ha contribuito il rapporto instauratosi tra Università e Industria Cosmetica sulla spinta di una collaborazione voluta dal Ministero della Pubblica Istruzione con i Progetti Finalizzati “Chimica Fine” del CNR già all'inizio degli anni '80.

È ispirandoci a questo modello che riportiamo una sintesi dei lavori di ricerca e dei progetti che vedono coinvolti il nostro Laboratorio in collaborazione con il Laboratorio di R&D dell'industria cosmetica Bottega Verde. Alcuni progetti si sono già conclusi con lusinghieri esiti brevettuali, altri sono ancora in corso o ad un buon stadio di avanzamento, ed altri hanno avuto appena inizio.

In particolare in questa presentazione riportiamo gli aspetti salienti delle nostre ricerche, che hanno preso in considerazione 1) il disegno e lo sviluppo di nuovi antiossidanti pluri-funzionali; 2) lo studio e l'approfondimento delle attività biologica e della componentistica del Miele, una matrice vegetale/alimento le cui proprietà cosmetico-biologiche sono ancora in parte da scoprire 3) lo studio di attivatori/modulatori della produzione di ossido d'azoto (NO), noto mediatore della vasodilatazione cutanea.

Non a caso la maggior parte delle nostre ricerche abbraccia settori di nostra specifica competenza e "tradizione", anche per quanto riguarda gli studi al di fuori del campo cosmetico: gli antiossidanti come antiaging, il loro ruolo nei processi di detossificazione cutanea, e un loro possibile intervento come promotori della sintesi di NO.

MATERIALI E METODI

Tutti i reagenti e solventi erano di grado analitico ed acquistati da Sigma-Fluka-Aldrich Chemical Co (Milan, Italy). I solventi HPLC-grade sono stati acquistati da Merck (Bracco, Milan, Italy). L'acqua HPLC-grade è stata preparata mediante un apparato di purificazione Milli-Q water. Il 4 idrossi-non-2-enal-dietilacetale (HNE-DEA) è stato acquistato da Oxis Research (Prodotti Gianni, Milano, Italia); L'HNE è stato preparato per idrolisi acida dell'HNE-DEA (1 mM, HCl). La calceina acetossimetil-estere (Calcein-AM) e β -ficoeritrina è stata acquistata da Molecular Probes (Space Import-Export, Milano, Italia). Glutathione (GSH), N-acetil-cisteina (NAC), istidina, β -alanina, o-ftalaldeide (OPA) sono state acquistate da Sigma-Aldrich (Milan, Italy). Carnosina and N-acetilcarnosina sono state fornite da Flamma S.p.A. (Chignolo d'Isola, Bergamo, Italia). Il 2,2-azobis-(2-amidinopropano)-di-cloridrato (AAPH) è stato acquistato da wako chemicals (Milano, Italia). Materiali e reagenti per colture cellulari sono state acquistate da Life Technologies (Milano, Italia).

HNE quenching da parte di aminoacidi e peptidi

L'attività quenching dei peptidi contenenti istidina e cisteina è stata studiata in soluzione omogenea incubando l'HNE (200 μ M in tampone fosfato 10 mM, PBS, pH 7.4) al rapporto molare di 1:10, tempo di incubazione 1 h a 37°C. Alla fine del periodo di incubazione, aliquote di campione sono state analizzate direttamente in HPLC (consumo HNE) e mediante spettrometria di massa interfacciata ad una sorgente Electrospray (ESI-MS; tecnica in infusione).

Analisi HPLC dell'HNE

Il consumo di HNE è stato determinato mediante HPLC usando uno strumento HP1050 series (Hewlett Packard, Milano, Italia) equipaggiato con una pompa quaternaria, un autocampionatore, un rivelatore programmabile UV-VIS Diode Array operante a 223 nm, un degasatore online e una stazione HPLC^{3D} ChemStation. Le analisi sono state condotte in fase inversa con una colonna Supelco LC18 column (250 x 4.6 mm i.d.; particle size 5 μ m). La fase mobile era costituita dal 60% A (water/acetonitrile/formic acid; 90:10:0.1, v/v/v) and 40% B (water/acetonitrile; 10:90 v/v) al flusso di 1 ml/min. Per verificare eventuali interferenze dovute ai peptidi, venivano condotte corse cromatografiche anche a 210 nm.

Analisi ESI-MS

Le analisi ESI/MS ed ESI-MS/MS sono state condotte con uno strumento Thermo Finnigan LCQ Advantage (Thermoquest, Milano, Italia) dotato di uno spettrometro di massa Ion Trap (ITMS), operante nelle seguenti condizioni: temperatura del capillare 250°C; voltaggio di ionizzazione 5 kV. Come gas di nebulizzazione è stato usato azoto. I campioni venivano diluiti 1:5 con una miscela

CH₃CN : H₂O (30:70) e quindi introdotti nello spettrometro di massa usando una pompa per siringa Harvard al flusso di 5 µl/min. Gli spettri sono stati acquisiti in ioni negativi e positivi, con uno scan range da m/z 100 a 1000 (scan rate 0.5 scans/s). Gli esperimenti di dissociazione indotta da collisione (CID) in negativo sono stati condotti in eccitazione risonante con ottimizzazione dell'energia di collisione mediante LCQ-Xcalibur software. Gli esperimenti LC-MS sono stati condotti con un sistema Thermoquest Surveyor equipaggiato con una pompa quaternaria, un detector programmabile UV/VIS Surveyor Diode Array 6000 LP, un autocampionatore Surveyor AS, un degasatore pneumatico, un software Xcalibur e connesso ad un sistema ITMS. Le separazioni sono state realizzate con eluizione in fase inverse con una colonna Phenomenex Synergy RP8 (150 x 2 mm i.d.; particle size 4 µm) protetta da una pre-colonna MAX-RP (4 x 2 mm; 4µm). Il flusso della fase mobile, acqua/acetone/acido trifluoroacetico (60:40:0.1, v/v/v), era 0.20 ml/min.

Studio clinico

Allo studio hanno partecipato, 40 soggetti di età compresa tra 40 e 60 anni che avevano fornito consenso informato all'atto del reclutamento. I criteri di inclusione ed esclusione comprendevano:

Inclusione: sesso femminile, disponibilità a non esporsi alla radiazione solare naturale o artificiale, non usare altri prodotti ad uso topico, farmaci e/o integratori alimentari durante il periodo dello studio e inoltre di astenersi dal consumo di alcool e fumo di sigaretta.

Esclusione: tutte le condizioni che non soddisfano i criteri di inclusione, stato di gravidanza, presenza di patologie del sistema immunitario, situazioni infiammatorie/allergie, disturbi psicologici.

Per la valutazione dell'efficacia del prodotto contenente istidil-tirosina i soggetti sono stati randomizzati in due gruppi: ad uno veniva applicato un prodotto placebo (GRUPPO 1, n=10) ed al secondo il prodotto contenente il principio attivo (GRUPPO 2, n=10). 15 giorni prima dell'inizio dello studio a tutti i soggetti è stato vietato l'uso di altri prodotti cosmetici. Il prodotto veniva applicato sul viso una volta al giorno per 40 giorni e le misure strumentali analitiche sono state condotte in corrispondenza dei giorni 0 (inizio) e 40 (fine). Le misure sono state condotte in un ambiente controllato alla temperatura di 20 C° con umidità relativa del 45±5%.

Lo studio è stato condotto presso il laboratorio del Prof. Enzo Berardesca, dell'Istituto Dermatologico San Gallicano, Roma. Sono stati monitorati con metodi non-invasivi i seguenti parametri:

- **Idratazione:** L'idratazione superficiale è stata determinata con un Corneometer® CM 825 (Courage & Khazaka, Germania). Il principio di misurazione di questo strumento si basa su una misura della capacitance di un mezzo dielettrico. Ogni cambiamento nella costante dielettrica della pelle dovuto alla diversa idratazione superficiale altera la capacitance del dispositivo (capacitore) inserito nel sistema di misura.
- **Colore:** Il colore della pelle è dovuto principalmente a due fattori: il contenuto di melanina e di emoglobina. Per le misure di colore è stato usato uno strumento Mexameter® MX 18 (Courage & Khazaka, Germania). La misura è basata sul fenomeno di assorbimento/riflessione. Il probe strumentale emette radiazione a tre lunghezze d'onda in corrispondenza dell'assorbimento spettrale di ogni pigmento (568 nm, 660 nm, 880 nm), e un rivelatore misura la radiazione riflessa dalla pelle. I risultati relativi ad ogni parametro sono espressi con un indice numerico il cui valore varia tra 0 (bianco) a 1000 (nero). La accuratezza strumentale è ±5%.
- **Elasticità:** La elasticità cutanea è stata valutata mediante uno strumento Cutometer® MPA 580 (Courage & Khazaka, Germania). Il suo principio di funzionamento si basa sul metodo elastometrico a suzione: la pressione negativa generata dall'apparecchio "attira" la pelle nell'apertura del probe strumentale e la conseguente resistenza meccanica (firmness) e la capacità a tornare allo stato iniziale elasticità vengono misurate e rappresentate come curve alla fine di ogni misura.

- **Levigatezza, ruvidità, secchezza e volume delle rughe:** Questi quattro parametri descrivono quantitativamente e qualitativamente lo stato e l'aspetto della superficie della cutanea; essi vengono misurati mediante una video-camera a luce UV (Visioscan® VC, Courage & Khazaka, Germania). Una volta acquisite, le immagini della superficie della cute vengono elaborate da un particolare software che permette il calcolo dei parametri.
La levigatezza (smoothness) è la media della larghezza e profondità delle rughe. La ruvidità (roughness) è il parametro opposto. La scaliness misura il livello di secchezza dello strato corneo.

Analisi statistica

I risultati sono stati riportati come valore medio \pm deviazione standard.

La significatività delle differenze tra i diversi set di dati è stata valutata mediante il test t di Student e le differenze sono state considerate significative quando $p < 0.05$.

EFFETTO CITOPROTETTIVO DEL MIELE

Colture cellulari. La parte sperimentale prevedeva l'utilizzo di due tipologie di colture cellulari: le cellule endoteliali (linea cellulare EA hy926, Flow Laboratories, Irvine, UK) e i cheratinociti umani immortalizzati (linea cellulare NCTC 2544, Flow Laboratories, Irvine, UK). Le colture cellulari venivano allestite e mantenute utilizzando le procedure standard [12, 13] e una volta raggiunta una confluenza pari all'80-90 utilizzate per le diverse sperimentazioni. Si determinava l'entità del danno ossidativo a livello del "bilayer" fosfolipidico incorporando il marker fluorescente lipofilo. La valutazione della vitalità cellulare veniva condotta mediante test dell'MTT test e calceina e analisi morfologica. Le misure spettrofluorimetriche sono state effettuate con un fluorimetro multiwell (Victor², Wallac multiwell, Perkin-Elmer). In tutti gli esperimenti è stato utilizzato un miele di castagno, opportunamente standardizzato, che possiede un'elevata attività antiossidante, come evidenziato da diversi marker analitici (DPPH, ORAC, FRAP, ABTS) [9]. Il miele controllo era costituito da una soluzione zuccherina costituita dal 40% di fruttosio, 30% di glucosio e 10% di maltosio.

Cellule endoteliali. Inizialmente veniva allestita una soluzione standard di miele al 10% in acqua distillata, filtrata (0,2 μ m, Schleicher & Schuell) e successivamente diluita con tampone fosfato (PBS) fino a raggiungere la concentrazione finale dell'1%.

Per valutare l'effetto protettivo diretto della componente antiossidante del miele nei confronti dello stress radicalico, le cellule venivano esposte per 15 min a stress radicalico indotto da CuOOH (500 μ M). Le cellule, dopo rimozione del promotore radicalico e ripetuti lavaggi del monostrato, venivano addizionate con 0,5 mL di soluzione di miele all'1%, equivalente ad una soluzione di Trolox 30 μ M (analogo idrofilo della vitamina E) e la cinetica di ossidazione a livello di membrana e intracellulare monitorata per via fluorimetrica nell'intervallo di un'ora. BODIPY: marker di membrana, DCFH marker intracellulare.

In un'altra serie d'esperimenti, per valutare l'effetto preventivo *anti-stress* del miele, le cellule endoteliali venivano pre-incubate con miele (1%, 15 ore), e successivamente (dopo lavaggio con PBS), sottoposte a stress radicalico indotto da CuOOH (100 μ M) (marker: BODIPY, morfologia e vitalità cellulare) o da CuOOH 10 μ M (marker: morfologia e vitalità cellulare, contenuto intracellulare di GSH). I controlli erano costituiti da cellule incubate in PBS o in miele controllo in assenza dell'induttore radicalico.

Cheratinociti: La frazione antiossidante del miele veniva isolata utilizzando un metodo precedentemente descritto: la soluzione al 10% di miele veniva sottoposta ad un processo d'arricchimento su colonna di Amberlite (XAD-2) e la frazione ricca in componenti antiossidanti

eluita con metanolo. Su questa veniva valutato il contenuto in polifenoli totali secondo il metodo precedentemente descritto [9], e l'effetto citoprotettivo veniva saggiato in colture di cellule epiteliali: co-incubazione in presenza di AAPH (1mM), o H₂O₂ (1, 2 mM). Marker considerati: BODIPY, DCFH, morfologia e vitalità cellulare.

Analisi statistica: I risultati sono stati espressi come media \pm deviazione standard (SD) di 5 esperimenti indipendenti (livello di significatività $p < 0.05$, t test di Student).

RISULTATI E DISCUSSIONE

ANTIOSSIDANTI DI SECONDA GENERAZIONE: NUOVE STRATEGIE ANTIAGING

L'approccio cosmetico a tutt'oggi utilizzato per prevenire l'invecchiamento cutaneo si basa principalmente sull'utilizzo di molecole ad attività *radical scavenging*, cioè di molecole in grado di 1) disattivare, mediante un meccanismo di trasferimento di elettroni (es. acido ascorbico) o di idrogeno (es. vitamina E, polifenoli), le specie radicaliche responsabili del processo di ossidazione indotto da fattori endogeni, ed aggravato da quelli esogeni (inquinanti ambientali) e 2) di interagire con gli antiossidanti endogeni extra- ed intra-cellulari (in particolare con il glutatione, GSH) in modo da proteggerli, rigenerarli, risparmiarli 3) intrappolare i promotori radicalici (metalli di transizione) che, secreti dalla cute o derivanti da inquinamento ambientali, svolgono la funzione di veri e propri catalizzatori del processo radicalico. Questa strategia risulta efficace quando lo stress ossidativo è di limitata entità.

Nel caso in cui si verifichi un massiccio *burst* radicalico, questa prima linea di difesa non è più sufficiente a prevenire il processo di lipido-perossidazione degli acidi grassi poli-insaturi (contenuti circa per il 20% nella pelle). In queste condizioni, quest'ultimi subiscono una massiccia degradazione con formazione di una cascata di prodotti aldeidici α,β -insaturi [1] altamente reattivi in grado di reagire con le macromolecole strutturali del derma.

Appare quindi evidente come la scoperta di molecole caratterizzate sia da attività *radical scavenging* che da attività detossificante verso composti carbonilici reattivi (attività *carbonyl quenching*) costituisca un nuovo approccio alla prevenzione dell'invecchiamento cutaneo cronologico e indotto.

Per lo sviluppo di tali antiossidanti "pluri-competenti" da noi definiti *ibridi funzionali*, è stata inizialmente considerata una serie di composti dipeptidici contenenti un residuo istidinico, nucleo che, come da noi precedentemente dimostrato nello studio del meccanismo d'azione della carnosina (β -alanil-L-istidina), interviene nel *quenching* di specie carboniliche mediante reazione di Michael dell' N^{ϵ} del residuo istidinico. Non a caso la carnosina è presente in elevate concentrazioni nel tessuto muscolare di mammifero (10-20 mM), in quanto responsabile del processo di detossificazione dei composti aldeidici che si formano durante lo *stress* ossidativo muscolare [2,3].

I derivati dipeptidici sono quindi stati saggiati sia per quanto riguarda l'attività *carbonyl quenching*, utilizzando HNE come prototipo di aldeide α,β -insatura e valutando mediante l'analisi HPLC la % di HNE disattivata, HNE *quenching*. Per l'attività anti-perossidante (radical-scavenger) è stata utilizzata una metodologia ampiamente consolidata, il metodo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) ed i risultati espressi in termini di equivalenti di Trolox [4].

I risultati relativi ad una serie di dipeptidi istidinici evidenziano l'andamento dell'attività antiossidante in relazione all'attività *carbonyl quenching* mediante analisi etero-correlata (**Figura 1**). L'obiettivo di tale *screening* è stato quello di individuare i composti per i quali risultino massime entrambe le attività. Il grafico risultante può essere suddiviso in quattro quadranti: **A** identifica molecole con scarsa attività *carbonyl quenching* ed elevata attività *radical scavenging*; **B**, molecole con modesta attività *radical scavenging* e *carbonyl quenching* come la istidina e la β -alanina; **C**, molecole ad elevata attività *carbonyl quenching* e scarsa attività *radical scavenging*, tra cui la carnosina e la H-His-His-OH.: la H-His-Tyr-OH e H-Tyr-His-OH hanno evidenziato proprietà

ottimali (riquadro **D**), dove il residuo istidinico manifesta attività anti-carbonilica e il residuo tirosinico manifesta attività anti-ossidante, come si evidenzia sostituendo la tirosina con altro aminoacido (**Figura 1**). E' importante sottolineare come il residuo tirosinico non svolga soltanto attività radical scavenger nei confronti delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), ma come già dimostrato, sia in grado di svolgere anche una azione disattivante nei confronti di specie reattive derivanti dall'ossidazione dell'NO (ONOO[•] e NO₂[•]), specie altamente diffuse come inquinanti ambientali a livello esogeno, e a livello endogeno come metaboliti citotossici del processo infiammatorio indotto dall'attivazione delle NOS [5]. In questo contesto la selezione di questo aminoacido si giustifica nell'ottica di un più ampio spettro di azione antiossidante.

Dal momento che le due specie molecolari evidenziavano attività sovrapponibili, la H-Tyr-His-OH è stata da noi selezionata per i successivi esperimenti in vitro ed in vivo.

L'attività antiossidante dell'H-Tyr-His-OH è stata successivamente valutata in un modello costituito da colture cellulare di cheratinociti umani sottoposti a stress ossidativo indotto da radicali perossidici (induttore radicalico AAPH, 40 mM). Quale marker di danno ossidativo cellulare sono stati valutati i seguenti parametri: vitalità cellulare (metodo MTT), morfologia cellulare (analisi in microscopia a contrasto di fase), e perossidazione lipidica di membrana (marker, BODIPY) [6,7]. Come mostrato in **Figura 2**, dopo 6 ore di esposizione al flusso di radicali perossidici, si verificava un significativo effetto citotossico e l'analisi morfologica evidenziava un quadro di necrosi cellulare e ridotta vitalità cellulare (45 ± 3.2 vs. $95.6 \pm 2.1\%$; $p < 0.001$) accompagnato da un significativo incremento nella perossidazione lipidica (indice di perossidazione: 0.743 ± 0.021 vs 0.01 ± 0.005 nelle cellule controllo; $p < 0.001$).

La pre-incubazione delle colture cellulari (15-30 min) con quantità crescenti di H-Tyr-His-OH ha esibito un effetto di protezione cellulare dose-dipendente che è risultato significativo su tutti i parametri cellulari già alla concentrazione di 0.5 mM, per raggiungere un effetto di completa protezione alla concentrazione di 5 mM (**Figura 2**).

Per quanto concerne la valutazione dell'attività anti-HNE dell'H-Tyr-His-OH, in un successivo esperimento i cheratinociti venivano sottoposti a stress ossidativo UVB (1 MED) e successivamente esposte ad insulto con HNE. L'esposizione a radiazione UVB ha lo scopo di mimare una situazione che si verifica in vivo a livello della cute dove, a seguito della lipidoperossidazione degli acidi grassi poli-insaturi di membrana, si innesca lo stress carbonilico che, nel nostro modello, è stato successivamente amplificato dall'aggiunta di HNE.

Come evidenziato in **Figura 3**, la cascata d'insulti genera una totale necrosi cellulare, come risulta dall'analisi morfologica e da un drammatico calo di vitalità cellulare. La pre-incubazione delle colture cellulari con concentrazioni crescenti di H-Tyr-His-OH (2-20 mM) provoca un effetto protettivo dose-dipendente pressoché completo alla concentrazione di 20 mM.

L'analisi in spettrometria di massa del surnatante cellulare prelevato al termine dell'esperimento, evidenzia la formazione di un prominente addotto tra H-Tyr-His-OH e HNE (**Figura 4**), a dimostrazione di come il meccanismo di citoprotezione sia riconducibile anche alla capacità di H-Tyr-His-OH di intrappolare l'agente citotossico HNE, svolgendo una azione detossificante nei suoi confronti in quanto il prodotto di adduzione è una specie altamente idrofila e facilmente escretabile e detossificabili da parte del cheratinocita. L'H-Tyr-His-OH mimando da un punto di vista strutturale i siti nucleofili cellulari ed extracellulari bersaglio dell'HNE, si comporta in tal modo da "substrato sacrificale".

In uno studio successivo, l'attività *carbonyl quenching* del dipeptide è stata confermata in un modello di epidermide umana multistrato, costituita da cheratinociti primari altamente differenziati (EpidermTM). L'epidermide umana è stata incubata in presenza di HNE (70 nmol/mg proteine totali, controllo positivo) e in presenza di una monodose di H-His-Tyr-OH (rapporto molare HNE/H-Tyr-His-OH 1:20). La localizzazione dell'HNE a livello del pluristrato è stata condotta mediante utilizzo di anticorpi poli-policlonali specifici per la rivelazione degli addotti HNE-substrato.

Da questa sperimentazione si conferma come l'aldeide α,β -insatura sia in grado di localizzarsi a livello nucleare e questo a causa della sua natura anfipatica che ne consente la elevata diffusibilità all'interno della cellula con conseguente genotossicità. La citotossicità nucleare veniva drasticamente ridotta quando gli inserti di Epiderm® venivano pre-trattati con H-Tyr-His-OH (**Figura 5**), a conferma che la molecola, a causa del suo carattere idrofilo, è in grado di aderire alla superficie del bilayer fosfolipidico dando luogo ad un efficace effetto-barriera.

I risultati della prima parte dello studio (colture cellulari) evidenziano come la concomitanza di stress radicalico e carbonilico costituisca per la cellula un evento altamente cito-tossico in quanto coinvolge diversi stadi del network di difese antiossidanti cellulari (dalla vitamina E al GSH).

Studio clinico

Alla luce dei promettenti risultati ottenuti dalle prove in vitro, l'efficacia dell'H-Tyr-His-OH è stata infine valutata in uno studio clinico. Nel disegno sperimentale sono stati inclusi alcuni parametri tipici dell'assetto strutturale e funzionale della cute e sono stati valutati all'inizio (dati basali) e dopo 40 giorni di trattamento. L'efficacia del trattamento è stata valutata in base della variazione (incremento-decremento) di ogni singolo parametro.

TABELLA 1.

giorno	Placebo (gruppo 1)		Pluridefence® (gruppo 2)	
	0	40	0	40
Idratazione	52.8 ± 12.5	42.8 ± 10.9	56.1 ± 12.9	46.7 ± 13.1
Colore				
$\lambda=$	287.3 ± 73.1	288 ± 77.2	281 ± 79.6	283.8 ± 62.7
$\lambda=$	133.9 ± 33.8	131.0 ± 27.7	124.9 ± 35.4	130.7 ± 34.2
Elasticità	1.18 ± 0.21	1.17 ± 0.25	1.10 ± 0.21	1.18 ± 0.29
Levigatezza (Smoothness)	28.25 ± 8.4	29.0 ± 6.6	36.1 ± 23.7	21.5 ± 7.5*
Ruvidità (Roughness)	2.71 ± 0.59	2.74 ± 0.49	2.71 ± 0.51	2.30 ± 0.51*
Profondità delle rughe	31.8 ± 7.7	31.8 ± 4.9	34.8 ± 11.4	29.6 ± 6.5*
Secchezza (Scaliness)	0.30 ± 0.25	0.28 ± 0.17	0.30 ± 0.53	0.52 ± 0.10

*P<0.05 vs giorno 0, T-test

I risultati riportati in **Tabella 1** evidenziano chiaramente che al termine della sperimentazione non si osservavano variazioni significative a livello di idratazione (misure corneometriche e di secchezza cutanea), di pigmentazione, e di elasticità.

Viceversa, la levigatezza (volume medio delle rughe), la ruvidità (roughness) cutanee e profondità delle rughe, che risultavano inalterate nel gruppo placebo, diminuivano in modo statisticamente significativo nei soggetti sottoposti a trattamento con H-His-Tyr-OH opportunamente veicolata (Pluridefence®).

Il trattamento con H-Tyr-His-OH risultava quindi efficace nel diminuire in modo specifico il grado di rugosità (wrinkling) della cute, misurato in termini di profondità delle rughe e di levigatezza.

Dal momento che uno dei meccanismi fondamentali nel processo di formazione della ruga è attribuibile alla formazione di cross-link a livello del collagene e di altre molecole strutturali provocati da un processo di carbonilazione che inesorabilmente si instaura dopo i 40 anni di età, i risultati in vivo qui riportati sembrano avvalorare le evidenze preliminari già osservate in vitro, e che cioè queste aldeidi citotossiche, se non opportunamente detossificate, siano responsabili di un

incremento di rugosità della cute e che alcune molecole in grado di prevenirlo portino ad una effettiva diminuzione di questo fenomeno.

LA RISCOPERTA DEL MIELE IN COSMESI

Le proprietà cosmetiche del miele erano note fin dall'antichità e venivano fondamentalmente attribuite alle sue proprietà idratanti, dermo-purificanti e lenitive, ma solo all'inizio degli anni '90 si è cominciato a disegnare un razionale sulle proprietà dermatologiche del miele. Ad esempio è stato chiarito che il suo effetto dermo-riparatore e disinfettante è solo in parte legato al classico meccanismo di attivazione della Glucosio ossidasi con sviluppo di acqua ossigenata, e che a questo partecipino anche altre sostanze, ad esempio derivati fenolici. Per quanto concerne l'attività anti-infiammatoria del miele [8], solo recentemente è stata individuata in questa matrice una serie di composti ad attività radical-scavenger che, oltre a svolgere una azione inibitoria sulla cascata dell'acido arachidonico, posseggono una azione inibitoria selettiva sulla ciclo-ossigenasi 2 (COX-2). In questo contesto, non è da escludersi che altri componenti del miele, a tutt'oggi in corso di studio nel nostro laboratorio, possano esercitare una azione modulatoria nei confronti delle NO-sintasi (NOS) costitutiva e inducibile, quest'ultima coinvolta in particolare nei processi di natura infiammatoria.

È evidente che nel momento in cui si consolida un razionale che spieghi l'attività biologica di una molecola o di una matrice naturale, immediatamente ne segue un rinnovato interesse nel settore cosmetico ed è per questo che in questa seconda parte del nostro studio parliamo di "riscoperta" del miele, focalizzando l'attenzione sulle sue proprietà citoprotettive.

Lo studio è stato affrontato dopo che su questa matrice vegetale complessa era stata condotta una estesa caratterizzazione della sua attività antiossidante in una serie di diversi modelli cell-free (DPPH, ORAC, FRAP) con l'ausilio di una opportuna analisi chemometrica [9].

Nella prima parte della ricerca, si è voluto verificare se il miele fosse in grado di inibire/rallentare un processo di natura radicalica già in corso.

Gli esperimenti sono stati condotti su colture di cellule endoteliali, e sottoposte a stress radicalico generato dall'induttore radicalico cumene idroperossido (CuOOH). Questa specie, grazie alla sua lipofilia, è in grado di permeare la membrana cellulare e di indurre uno stress radicalico con conseguente danno strutturale della membrana. Il protocollo sperimentale prevedeva: 1) incubazione delle colture cellulari con l'induttore, CuOOH (500 μ M, 5 min); 2) successiva incubazione con il probe (BODIPY 100 μ M o DCFH-DA 10 μ M, 15 min), 3) applicazione di PBS (cellule controllo) o di miele (1% in PBS) e registrazione della relativa cinetica di ossidazione (1 h) mediante una tecnica fluorimetrica.

A seguito dell'instaurarsi del processo di perossidazione si evidenzia un significativo incremento dei valori di fluorescenza del probe di ossidazione di membrana BODIPY (**Figura 6A**) e del probe intracellulare DCFH (**Figura 6B**). Contemporaneamente si osserva un marcato calo della vitalità cellulare che diminuisce del 30% rispetto alle cellule controllo ($p < 0.001$, **Figura 6C**). Tale effetto si riflette a livello morfologico con una evidente alterazione dell'assetto cellulare e formazione di vescicole a livello di membrana (**Figura 6D**), probabile conseguenza di una alterazione di permeabilità della stessa.

All'atto dell'aggiunta al medium d'incubazione di una soluzione di miele si osserva un blocco dei processi ossidativi a livello di membrana: inibizione pressoché totale dell'aumento della fluorescenza del probe BODIPY (**Figura 6A**), mentre per quanto riguarda l'ossidazione intracellulare si verifica un rallentamento del processo ossidativo (**Figura 6B**). In parallelo si instaura un rallentamento del calo della vitalità cellulare (**Figura 6C**), e all'analisi morfologica (**Figura 6D**) le cellule si presentano adese e prive di strutture vescicolari superficiali a livello di membrana (**Figura 6C**).

L'insieme di questi risultati indica che le specie antiossidanti del miele sono in grado di rallentare il progredire del processo perossidativo indotto nella cellula endoteliale, sia a livello di membrana

che intracellulare, conferendo alla cellula una maggiore resistenza nei confronti di un massiccio insulto ossidativo e, in ultima analisi, di inibire un fenomeno di destrutturazione già in atto.

Nella seconda parte dello studio è stato valutato l'effetto citoprotettivo del miele a livello preventivo. Il protocollo sperimentale prevedeva la pre-incubazione delle cellule con un terreno arricchito con miele (1%) per 15 ore. Al termine di tale periodo, il medium veniva rimosso con un lavaggio con tampone fosfato, e le cellule esposte a stress radicalico con CuOOH, analogamente a quanto sopra descritto.

I risultati dimostrano che le cellule endoteliali arricchite delle componenti antiossidanti del miele manifestano dopo 1h un decremento del fenomeno perossidativo (pari al 30%) rispetto alle trattate con miele controllo (**Figura 7A**). Questi risultati sono confermati da un significativo recupero della vitalità cellulare (**Figura 7B**), e da un apparente ripristino dell'assetto morfologico (**Figura 7C**).

Al fine di chiarire se l'effetto protettivo del miele nei confronti del danno radicalico osservato in nel precedente esperimento fosse dovuto a una possibile interazione del suo corredo di antiossidanti con gli antiossidanti intracellulari, è stata svolta una successiva sperimentazione dove è stato valutato l'andamento dei livelli di GSH utilizzando lo stesso protocollo sperimentale.

Dopo pre-incubazione delle colture cellulari con un medium arricchito con miele (1%) si verifica un significativo risparmio GSH intracellulare pari al 42.1 % rispetto alle cellule trattate con miele controllo (**Figura 8**) che raggiunge il 108.6% con N-acetilcisteina (NAC), precursore fisiologico del GSH (controllo positivo, **Figura 8**).

È interessante sottolineare che il pre-trattamento delle cellule con vitamina E (50 μ M) non evidenzia alcun effetto di risparmio nei confronti del GSH (**Figura 8**), e questo è probabilmente dovuto alla sua specifica localizzazione a livello di membrana.

Nel caso del miele l'effetto protettivo nei confronti del GSH potrebbe essere dovuto al fatto che alcuni suoi componenti, quali gli esteri dell'acido cumarico, ferulico, e caffeico, in grado di permeare la membrana cellulare, possono rigenerano il GSH attraverso: 1) un meccanismo di radical scavenging diretto dell' idroperossido; 2) un processo di trasferimento di equivalenti riducenti al GSH.

Come ultimo aspetto di questa ricerca anche se a livello preliminare, è stato valutato in colture di cellule epiteliali l'effetto protettivo di un estratto di antiossidanti del miele ottenuto mediante arricchimento cromatografico. A tal scopo i cheratinociti sono stati sottoposti a stress ossidativo indotto dall'iniziatore radicalico AAPH (1mM) (probe di ossidazione BODIPY) in presenza dell'estratto di miele (**Figura 9A**). L'entità dell'ossidazione a livello di membrana risultava significativamente ridotta già alla concentrazione di 10 μ g/10⁶ cellule, e si osservava una protezione pressoché totale alla concentrazione di 30 μ g/10⁶ cellule equivalenti equivalente a circa 60 mg di miele nativo/10⁶ cellule).

Analoga inibizione si riscontrava quando il processo di ossidazione veniva condotto utilizzando perossido di idrogeno (H₂O₂, 1-2 mM), noto agente ossidante pato-fisiologico in grado di permeare la membrana, e DCFH come probe di ossidazione intracellulare (**Figura 9B**).

In conclusione, i risultati di questo studio, condotto su diversi modelli di stress ossidativo in colture cellulari, indicano che l'attività citoprotettiva esercitata dal miele coinvolge meccanismi di tipo antiossidante diretto e indiretto, e si esplica con un'efficacia anche superiore a quella manifestata da noti antiossidanti endogeni quali vitamina E e GSH.

È interessante rilevare come questi risultati, anche se limitati a semplici modelli di colture cellulari, forniscono spunti di carattere meccanicistico di notevole interesse, in quanto possono fornire un solido razionale a molti degli effetti dermatologici osservati in studi clinici.

Inoltre, la presenza nel miele di specie antiossidanti diversificate da un punto di vista chimico, che molto probabilmente esplicano una sinergia di azione, può costituire la base per la ricerca e lo

sviluppo di nuovi preservanti naturali caratterizzati da un minimo, se non nullo, impatto tossicologico ed ambientale. Questa tematica è attualmente in fase di studio nel nostro laboratorio.

MODULATORI DI ORIGINE NATURALE DELLA NO-SINTASI (NOS)

La cute è l'organo del corpo umano che presenta la maggiore estensione superficiale ed un alto grado di microvascolarizzazione ed innervazione e i suoi componenti cellulari (cheratinociti, melanociti, fibroblasti, cellule endoteliali) sono in grado di produrre NO per intervento di NO-sintasi costitutive e inducibili [10].

È ormai universalmente accertato che l'ossido d'azoto (NO) endogeno prodotto a livello topico in seguito a stimolazione dell'NO-sintasi provoca una vasodilatazione dei micro-capillari della cute, un incremento della micro-circolazione e dell'angiogenesi e un ripristino del tono basale. Conseguentemente una maggiore ossigenazione dei distretti ipossici e la riattivazione dei processi di biosintesi degli elementi strutturali del derma quali collagene, elastina e acido ialuronico.

Studi di letteratura indicano una associazione tra la ridotta disponibilità dell'ossido d'azoto a livello cutaneo e comparsa dei segni tipici dell'invecchiamento, quali l'accentuata rugosità della pelle, la disidratazione e la perdita elasticità [11,12,13]. Se ne deduce quindi che l'attivazione dell'NO-sintasi presente negli strati superficiali del derma con conseguente sviluppo dell'NO e sua diffusione al letto microcapillare rappresenti quindi un possibile approccio cosmetico alla prevenzione dell'invecchiamento cutaneo.

Alla luce di queste premesse, in parallelo all'approfondimento delle ricerche sul miele, abbiamo affrontato un'altra tematica volta all'identificazione di molecole di origine naturale in grado di promuovere o modulare l'attivazione dell'NO-sintasi.

La ricerca è iniziata attraverso uno studio in linea con l'approccio farmaceutico da noi sperimentato, avvalendoci di tecniche di chimica computazionale (docking e dinamica molecolari) al fine di ottenere delle indicazioni strutturali del sito attivo dell'enzima e del possibile sito allosterico (**FIGURA 10**), onde facilitare lo screening di opportune molecole biologicamente attive. In parallelo è in corso la messa a punto di un modello di colture di cellule endoteliali primarie di suino in sospensione al fine di valutare l'entità del rilascio di ossido d'azoto in condizioni basali in presenza di substrato (L-arginina) e di validarlo con opportuni inibitori. L'ossido d'azoto convertitosi spontaneamente a nitrito (NO_2^-) viene determinato per via chemiluminometrica, una tecnica ampiamente convalidata e applicata nel nostro per la determinazione di questo importante mediatore.

Anche se ha livello preliminare i risultati sembrano promettenti!

FIGURA 1 . Ibridi dipeptidici ad attività *radical scavenging* e HNE *quenching*: analisi etero-correlata

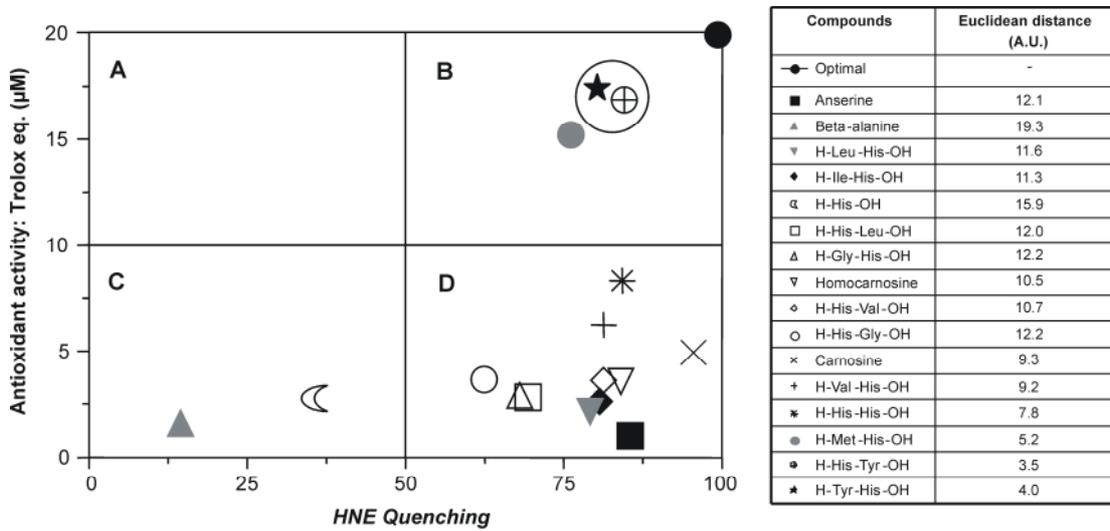


FIGURA 2 Attività anti-ossidante di H-Tyr-His-OH (TH) in un modello cellulare di cheratinociti umani (NCTC 2544) esposti a danno ossidativo indotto dall'induttore radicalico AAPH (40 mM)

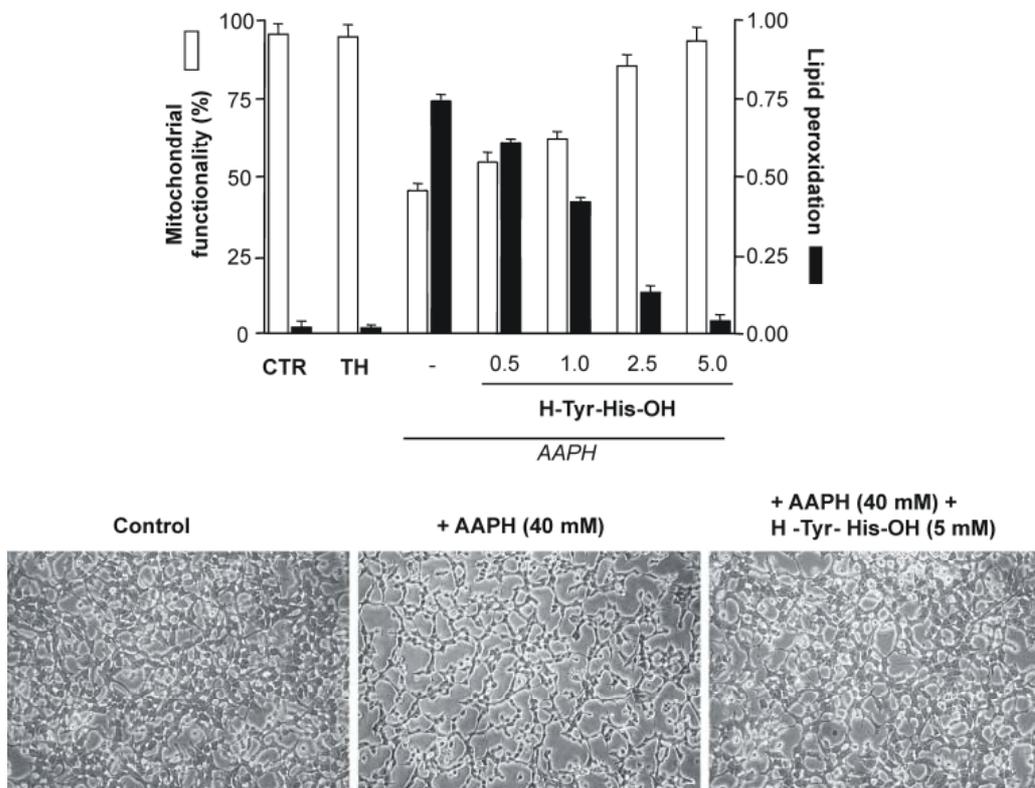


FIGURA 3 . Attività *carbonyl quenching* di H-Tyr-His-OH (TH) in un modello cellulare di stress ossidativo in cheratinociti umani esposti al danno sequenziale UVB (50 mJ/cm², 1 MED) - HNE (70 nmoli/mg proteine).

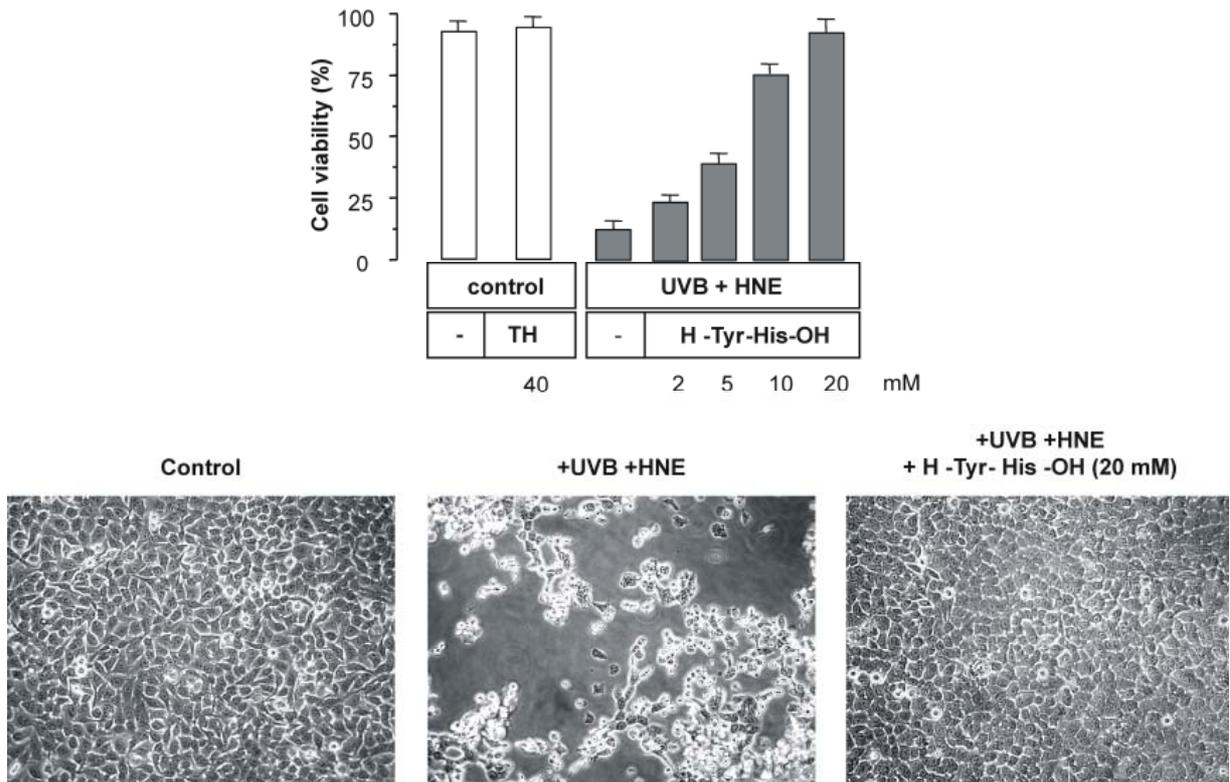


FIGURA 4. H-Tyr-His-OH come quencher di HNE: analisi ESI-MS e meccanismo di reazione

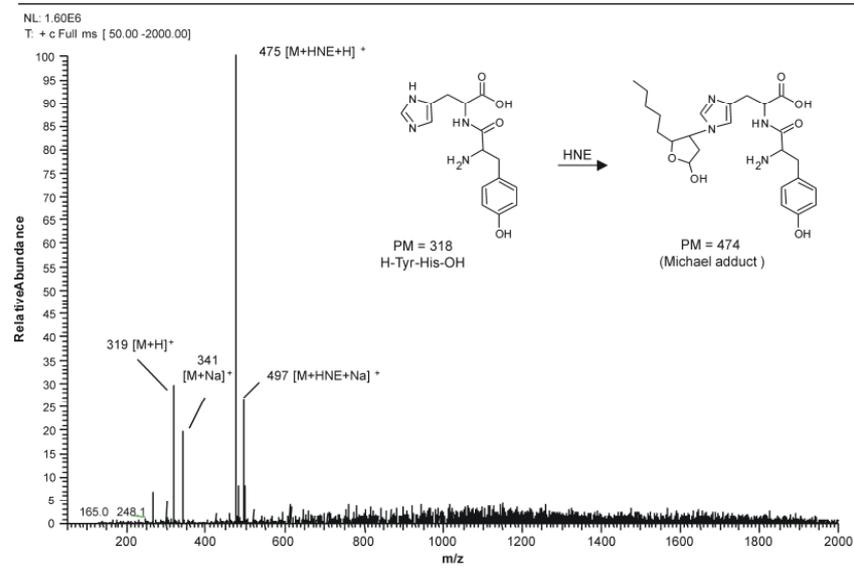
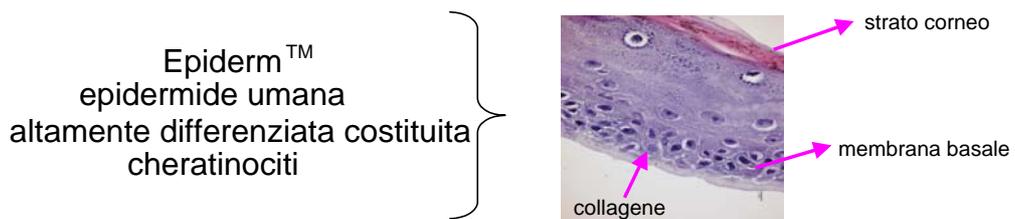


FIGURA 5. Attività HNE quenching di H-TYR-HIS-OH in epidermide ricostituita (Epiderm®) e analisi immunocistochemica

Attività HNE quenching di H-Tyr-His-OH in epidermide ricostituita



Localizzazione immunocistochemica dell'HNE in Epiderm mediante in anticorpi policlonali

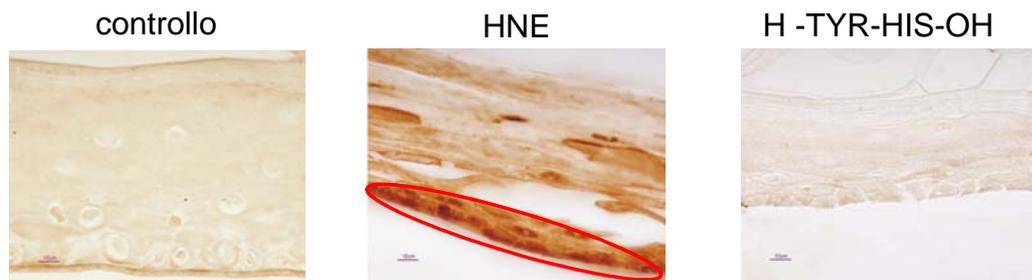


FIGURA 6. Effetto inibitorio del miele nei confronti della propagazione della cascata radicalica indotta da CuOOH (500 μ M) marker: A) ossidazione di membrana, B) ossidazione intracellulare, C) vitalità (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ vs controllo, ° $p < 0.01$ vs CuOOH), D) morfologia.

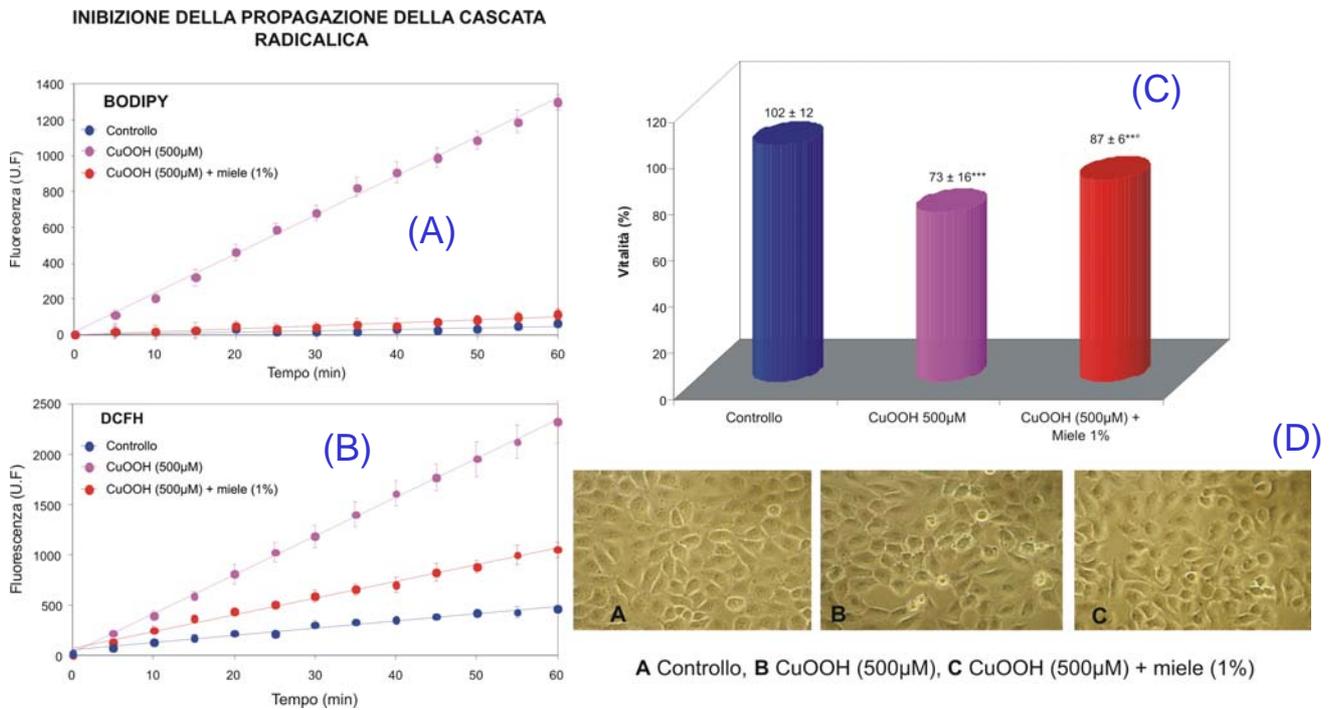


FIGURA 7. Effetto preventivo del miele nei confronti della progressione del danno radicalico: marker: A) ossidazione di membrana B) vitalità (***) $p < 0.001$ vs controllo, ° $p < 0.05$ vs CuOOH), C) morfologia.

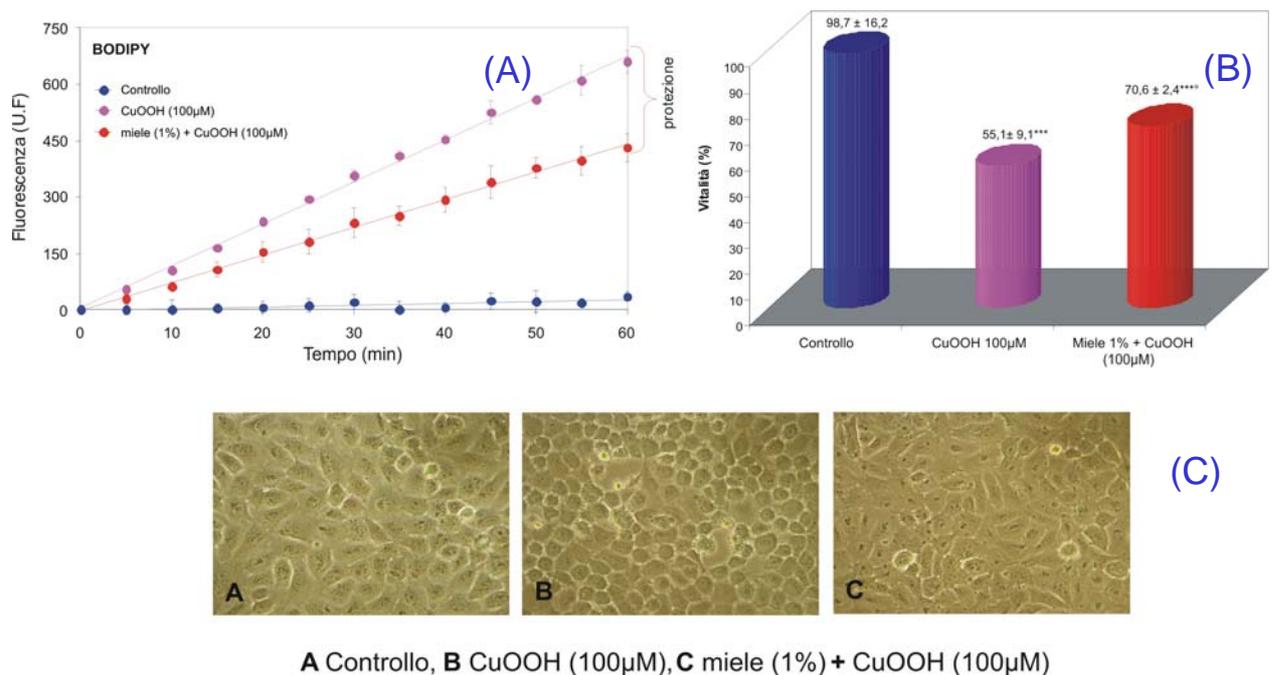


FIGURA 8. Effetto di risparmio del glutatione (GSH) da parte del miele: % protezione (***) $p < 0.001$, * $p < 0.05$).

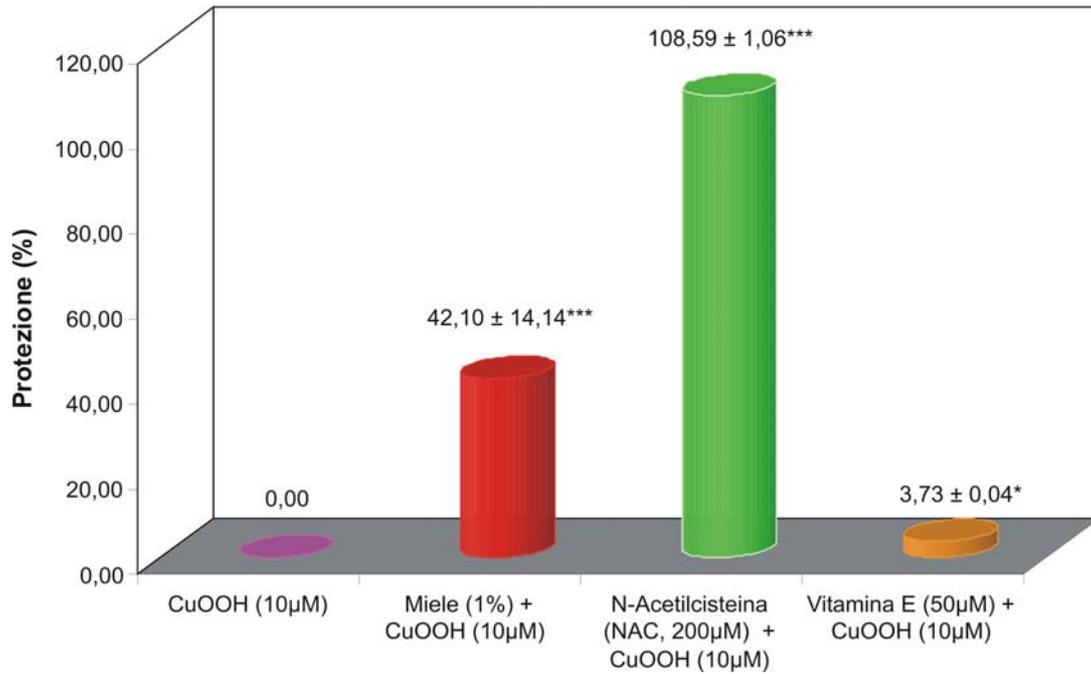


FIGURA 9. Effetto protettivo dell'estratto di miele in colture di cheratinociti marker: ossidazione A) di membrana e B) intracellulare (***) $p < 0.001$ vs H_2O_2)

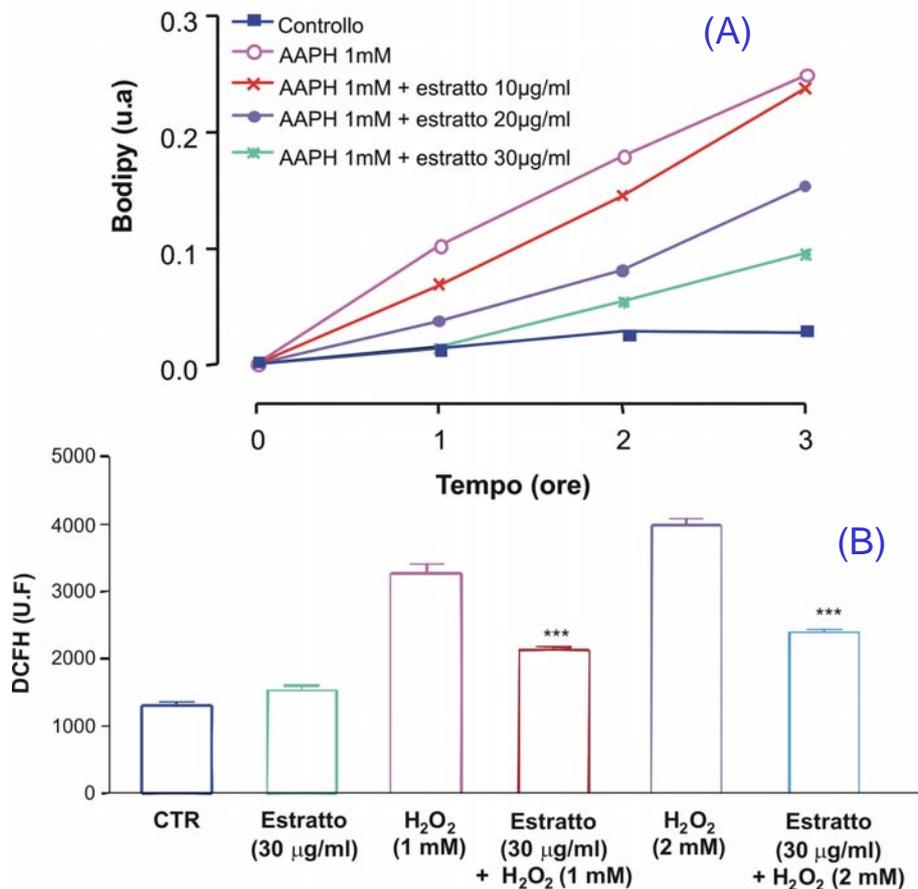
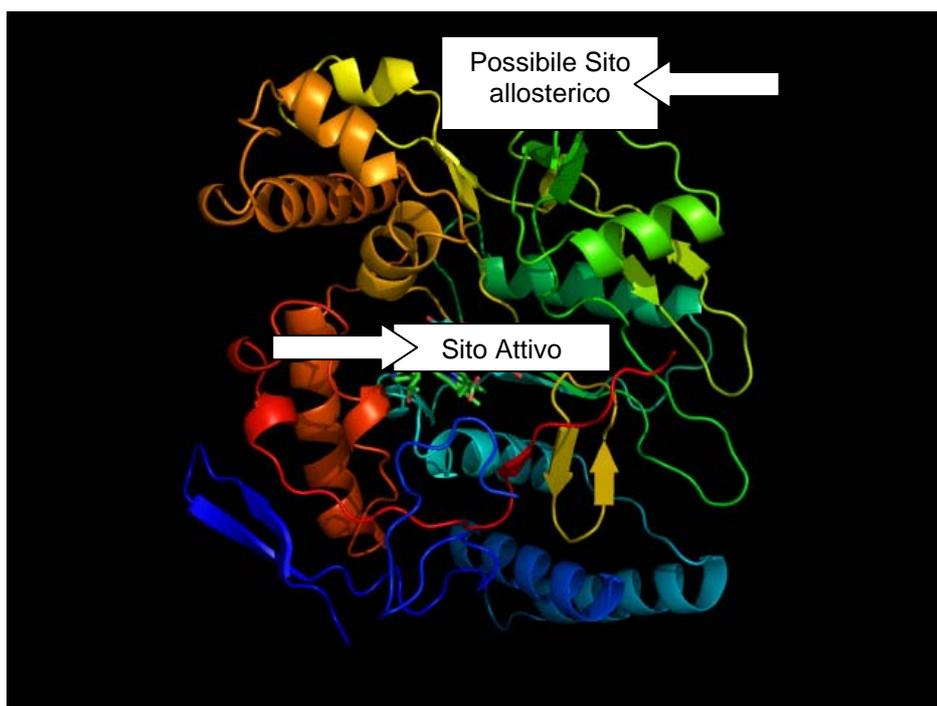


FIGURA 10. *Struttura della NO-Sintasi endoteliale umana: sito attivo e possibile sito allosterico*



CITAZIONI

- [1] Esterbauer H, Schaur R.J., Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.* **11** (1991) 81-128
- [2] Aldini G, Carini M, Beretta G, Bradamante S, Facino RM. Carnosine is a quencher of 4-hydroxy-nonenal: through what mechanism of reaction? *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 298: 699-706
- [3] Aldini G, Granata P, Carini M. Detoxification of cytotoxic α,β -unsaturated aldehydes by carnosine: characterization of conjugated adducts by electrospray ionization tandem mass spectrometry and detection by liquid chromatography/mass spectrometry in rat skeletal muscle. *J Mass Spectrom.* 2002;37:1219-1228
- [4] Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med.* 1993;14:303-311
- [5] Sawa T, Akaike T, Maeda H. Tyrosine nitration by peroxynitrite formed from nitric oxide and superoxide generated by xanthine oxidase. *The Journal of Biological Chemistry.* 2000; 275: 32467-32474
- [6] Aldini G, Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI. A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. *Free Radic Biol Med.* 2001;31:1043-50
- [7] Beretta G, Aldini G, Maffei Facino R, Russell RM, Krinsky NI, Yeum, K-J. Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. *Anal. Biochem.* 2006; 354: 290-298
- [8] Subrahmanyam M. A prospective randomised clinical and histological study of superficial burn wound healing with honey and silver sulfadiazine. *Burns.* 1998; 24: 157-161
- [9] Beretta G, Granata P, Ferrero M, Orioli M, Maffei Facino, R. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal. Chim. Acta.* 2005; 533: 185-191
- [10] Cals-Grierson MM, Ormerod AD. Nitric oxide function in the skin. *Nitric Oxide.* 2004; 10: 179-193
- [11] Lyons D. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation and total body nitric oxide production in healthy old age. *Clinical Sci.* 1997; 93: 519-525.
- [12] Holowatz LA. Nitric oxide and attenuated reflex cutaneous vasodilation in aged skin. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003; 284: H1662-H1667
- [13] Singh N. Ageing is associated with impairment of nitric oxide and prostanoid dilator pathways in the human forearm. *Clinical Sci.* 2002; 102: 595-600

