

Granata Paola

"Nuovi approcci molecolari nella prevenzione dell'invecchiamento cutaneo"

Riassunto

Numerose evidenze di carattere morfologico/istochimico hanno di recente dimostrato come le aldeidi α,β -insature e le chetoaldeidi, sia di origine endogena (prodotti di ossidazione lipidica, proteica e glucidica) che esogena (inquinanti ambientali), sono implicate nei processi degenerativi associati all'invecchiamento/fotoinvecchiamento cutaneo. Risultano tuttavia non ancora definiti i meccanismi biochimici coinvolti e i processi di detossificazione/metabolizzazione da parte dei costituenti cellulari della cute (cheratinociti, fibroblasti). Dal momento che a) i cheratinociti costituiscono un potenziale bersaglio dei prodotti di perossidazione lipidica che si originano in seguito ad esposizione a radiazioni UV; b) il 4-idrossi-trans-nonenale (HNE) è, fra le aldeidi α,β -insature che si originano per perossidazione di membrana, quella dotata di maggiore reattività chimica, scopo del lavoro è stato quello di valutare l'effetto citotossico dell'HNE a livello dei cheratinociti (linea cellulare NCTC2544) e la loro capacità di detossificazione, studiando le principali vie metaboliche implicate nei processi di biotrasformazione dell'HNE. In particolare la ricerca si è articolata nelle seguenti fasi:

- 1) studio dell'effetto dose-dipendente di HNE sulla vitalità/integrità cellulare.
- 2) studio delle principali vie metaboliche responsabili del processo di biotrasformazione/detossificazione dell'HNE (caratterizzazione delle specie metaboliche attraverso un approccio analitico combinato HPLC-UV-DAD e HPLC-MS/MS).
- 3) studio dell'effetto combinato delle radiazioni UVB e dell'HNE sulla citotossicità (valutazione della vitalità e morfologia cellulare)
- 4) studio dell'effetto delle radiazioni UVB sulla capacità dei cheratinociti di bioinattivare l'HNE.

I risultati relativi all'incubazione dei cheratinociti con HNE (10-140 nmoli/mg di proteine) possono essere così schematicamente riassunti: 1) la vitalità e morfologia cellulare non variano in maniera significativa rispetto alle cellule controllo fino a due ore di incubazione dei cheratinociti in presenza di HNE; 2) mediante analisi HPLC-UV/DAD si è osservato un consumo tempo-dipendente di HNE nel medium extracellulare, che risulta totale dopo 2 ore di incubazione; 3) l'analisi LC-ESI-MS/MS (Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry) ha consentito di identificare e caratterizzare nel medium di reazione, 4 metaboliti

derivanti dalla coniugazione dell'HNE con il glutatione (GSH) e che risultano assenti a livello intracellulare [1].

Dai dati ottenuti risulta che HNE é in grado di permeare la membrana citoplasmatica del cheratinocita per diffondere a livello citoplasmatico ove va incontro ad una reazione di bioinattivazione/metabolizzazione, prevalentemente mediata dal GSH, con formazione di addotti idrofili e non reattivi che vengono successivamente estrusi a livello extracellulare.

Nella seconda parte del lavoro è stato valutato l'effetto di una singola esposizione di radiazioni UVB (50 mJ/cm², corrispondente alla dose minima eritematosa nell'uomo, MED) in presenza e in assenza di HNE; mentre l'esposizione UVB non induce un effetto citotossico significativo, l'esposizione sequenziale dei cheratinociti a radiazioni UVB (50 mJ/cm²) e a HNE (70 nmoli/mg proteine) si traduce in una significativa riduzione, tempo-dipendente, della vitalità cellulare (10% all'ultimo tempo di osservazione, 8 h successive all'esposizione UVB). L'effetto citotossico sinergico indotto dalla combinazione HNE/UVB é in parte riconducibile ad una significativa riduzione, UVB-dipendente, del contenuto intracellulare di glutatione (circa il 25% rispetto alle cellule non irradiate), con conseguente alterazione nella capacità dei cheratinociti di biotrasformare l'HNE. In queste condizioni sperimentali si è infatti potuto dimostrare, mediante analisi HPLC-MS, che la formazione e l'estrusione nel medium di incubazione dei 4 addotti dell'HNE con il glutatione (GSH) si riduce del 15-25%.

In base ai risultati ottenuti, si può quindi affermare che i cheratinociti sono in grado di detossificare/metabolizzare le aldeidi α,β -insature attraverso un processo GSH-dipendente, che risulta tuttavia compromesso dalla co-esposizione con radiazioni UVB, già alla dose minima eritematosa. Tale effetto é in parte riconducibile ad un significativo consumo di GSH (causato dai processi ossidativi intracellulari indotti da UVB) [2], cofattore essenziale per i processi di disattivazione metabolica di specie elettrofile quali le aldeidi α,β -insature. Come conseguenza, la quota di aldeidi non bioinattivata è in grado di diffondere a livello intracellulare dove, mediante reazioni di addizione a proteine e acidi nucleici, induce l'effetto citotossico osservato.

I risultati descritti in questo studio aprono nuove prospettive nel settore cosmetico/dermocosmetico per un innovativo approccio razionale alla prevenzione del danno cutaneo fotoindotto, che accelera e potenzia il processo fisiologico di invecchiamento cutaneo.

Attualmente sono in fase di studio composti che, mimando i componenti cellulari bersaglio dell'HNE a livello cutaneo, si comportano da "falsi substrati" prevenendo in tal modo la reazione dei composti aldeidici reattivi con i substrati cellulari, e la conseguente reazione citotossica.

Di particolare interesse si è dimostrata la carnosina (b-alanil-L-istidina), un dipeptide endogeno presente a livello mM nel tessuto muscolare scheletrico e cerebrale e di cui non è stata ancora definita la sua funzione fisiologica. Studi preliminari effettuati sui cheratinociti indicano inoltre come l'aggiunta di carnosina al medium di incubazione (20 mM), sia in grado di prevenire l'effetto citotossico indotto dalla esposizione sequenziale UVB/HNE. Il meccanismo proposto ed in corso di conferma, è riconducibile alla capacità della carnosina di reagire a livello extracellulare con l'HNE impedendo una sua diffusione a livello intracellulare.

[1] Carini M. et al. 22th IFSCC Congress, Edinburgh, 2002.

[2] Carini M. et al. *Il Farmaco*, 55; 526-34, 2000.