

Università degli Studi della Toscana

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE AMBIENTALI CICLO XXIII

**Coordinatore
Prof. Maurizio Petruccioli**

**“Composti di origine naturale e xenobiotici,
caratterizzazione chimica, valutazione dell'attività
biologica su linee cellulari e potenziali utilizzi
chemioterapici”**

**Dottoranda
Dott.ssa Doriana Triggiani**

**Tutor
Prof. Fernando Porcelli**

RIASSUNTO

I prodotti naturali ottenuti dalle piante e da altri organismi biologici hanno costituito una continua fonte per l'ottenimento di farmaci. Da uno studio recente è emerso che, di 847 molecole divenute farmaci, il 5% è costituito da prodotti naturali, il 27% da derivati di prodotti naturali e le rimanenti 572 sono molecole sintetiche; di quest'ultime inoltre, 262 possono essere considerate analoghi di prodotti naturali (Newman e Cragg 2007). È interessante sottolineare che i dati riportati non comprendono prodotti biologici e i vaccini che per definizione provengono dalla natura. Si definisce, inoltre, con il termine "xenobiotico" una molecola di qualsiasi tipo, di origine naturale o sintetica, estranea ad un organismo e che può esplicare sia la funzione di farmaco che di veleno tossico.

La ricerca svolta nell'ambito del Dottorato si è posta come obiettivo lo studio di composti di origine naturale e xenobiotici mediante la loro caratterizzazione chimica, la valutazione dell'attività biologica e lo studio dei loro potenziali utilizzi come chemioterapici.

In particolare, l'attività di ricerca si può così riassumere:

A) Identificazione e caratterizzazione di composti biologicamente attivi estratti da *Rubus ulmifolius*

B) Valutazione e analisi della chimica biologica dei composti organostagno(OT).

A) Identificazione e caratterizzazione di composti biologicamente attivi estratti da *Rubus ulmifolius*

Il *Rubus ulmifolius* Schott è una pianta perenne ampiamente diffusa in Italia e nota come "Rovo" (Pignatti 1982). La pianta di rovo contiene triterpeni, acidi grassi, tannini, flavonoidi (Panizzi *et al.* 2001) e altre molecole aventi proprietà farmaceutiche non ancora completamente studiate.

La ricerca è stata così condotta.

In una prima fase è stata indagata *in vitro* l'attività biologica, citotossica e/o antiproliferativa, dell'estratto alcolico, con particolare attenzione agli effetti sulla proliferazione cellulare e alle modificazioni morfologiche e ultrastrutturali.

L'effetto dell'estratto di *Rubus ulmifolius* è stato valutato sulle linee cellulari tumorali mane HeLa, HepG2, HL60 e HL60/MX2 .

Al fine di evidenziare eventuali effetti antiproliferativi o citotossici, inizialmente sono state valutate le conte cellulari e le curve di crescita in seguito a trattamento con estratto di RoVo. Successivamente sono state applicate tecniche di microscopia al fine di verificare le alterazioni a livello morfologico, citoscheletrico e di espressione proteica imputabili al trattamento con l'estratto.

Studi successivi, condotti per mezzo di cromatografia su strato sottile (TLC) hanno permesso di isolare tra tutti uno spot denominato "R", la cui azione biologica è sembrata essere più elevata.

Sono state poi effettuate analisi chimiche atte ad individuare la natura del o dei singoli principi attivi presenti nell'estratto di foglie di *Rubus ulmifolius* ed in particolare nello spot più attivo: Kamferolo glucuronide, Quercetina glucuronide e Acido clolorogenico

Considerando la struttura chimica dei composti attivi individuati, i quali evidenziano una analogia strutturale con i composti in grado di inibire l'attività dell'enzima acetilcolinesterasi, si è proceduto con l'effettuazione di test di inibizione del suddetto enzima.

I risultati ottenuti permettono di affermare che all'interno delle foglie di rovo esistono molecole di potenziale interesse farmacologico. E' da evidenziare come l'intensa attività di inibizione della proliferazione cellulare e dell'attività dell'enzima acetilcolinesterasi degli estratti di foglie di *R. ulmifolius* sia ascrivibile non tanto alle molecole già molto studiate, i flavonoidi quercetina e kamferolo, quanto, e soprattutto, ai loro derivati glucoronici.

B) Valutazione e analisi della chimica biologica dei composti organostagno

I composti organostagno (OT) sono composti xenobiotici ubiquitari nell'ambiente. Essi rappresentano gli inquinanti noti più tossici per la vita acquatica; l'inquinamento ambientale da composti OT si è esteso notevolmente a seguito delle ampie applicazioni industriali e agricole. Alcuni composti OT hanno mostrato un effetto anti-neoplastico mentre altri sono

risultati citotossici, genotossici, mutageni e neurotossici.

Nonostante sia noto il sito di interazione dei composti OT a livello della membrana mitocondriale, i meccanismi di tossicità e di degradazione biologica rimangono poco chiari (Tobin *et al.* 1999). Studi precedenti hanno dimostrato che un peptide sintetico (SNN-PEP, I₁LGCWCYLR₉), derivato dalla sequenza primaria della stannina (SNN), proteina coinvolta nei processi di detossificazione da composti organostagno e contenente due residui di cisteina vicinali (motivo CXC), è in grado di dealchilare il trimetilstagno a dimetilstagno.

Partendo da tali presupposti, sono stati condotti studi con lo scopo di verificare se il SNN-peptide fosse in grado di dealchilare anche i composti organostagno tetra sostituiti a specie dialchilate, modificandone conseguentemente la citotossicità e l'attività biologica.

È stata quindi studiata la cinetica di dealchilazione del TetraMT (o 4MT, tetrametilstagno) e di due tra i più comuni OT trisostituiti, TMT (cloruro di trimetilstagno) e TET (bromuro di trietilstagno) mediante spettroscopia di fluorescenza. Il meccanismo di reazione è stato razionalizzato attraverso una reazione pseudoenzimatica che termina in un complesso costituito dalla specie di-alchilata e SNN-PEP legati covalentemente.

Poiché i composti tetra- e i tri-alchilstagno mostrano un marcato ritardo nella loro azione tossica rispetto ai corrispondenti analoghi di-e mono-alchilati, è stato ipotizzato che la tossicità ritardata sia una conseguenza della dealchilazione progressiva dei composti OT con produzione di di-e mono-derivati più tossici, che legano e interagiscono con gli enzimi e le proteine coinvolte nella detossificazione.

In studi precedenti è stato inoltre ipotizzato che i composti organo stagno, interagendo con la stannina o direttamente con il DNA, possano avviare una cascata di eventi atti ad indurre la morte cellulare o a controllare l'espressione e la sintesi della stannina stessa.

È stata quindi studiata l'attività biologica dei diversi composti organostagno utilizzando come modelli cellulari le linee HeLa e NB2a sulle quali sono stati condotti saggi MTT, analisi morfologiche (microscopia ottica) e citoscheletriche (microscopia a fluorescenza). I composti organostagno usati nei trattamenti sono stati i seguenti: cloruro di trifenilstagno (TPT), tetrametilstagno (4MT) ed in particolare dicloruro di dimetilstagno (DMT), cloruro di trimetilstagno (TMT), bromuro di trietilstagno (TET), alle concentrazioni comprese tra 1 e 100 μ M.

Indagini in vitro, per verificare eventuali modificazioni nell'espressione della SNN in seguito al trattamento delle cellule Hela (adenocarcinoma della cervice umana) e NB2a (neuroblastoma murino) con concentrazioni crescenti di tre composti organo stagno DMT, TMT e TET, sono state effettuate mediante immunofluorescenza.

ABSTRACT

Natural products derived from plants and other biological organisms are a continuous source for new drugs. A recent study shows that of 847 drug molecules, 5% are natural products, about 27% derives from natural products and the remaining 572 are synthetic molecules (Newman and Cragg 2007), of which 262 can be considered analogous to natural products. It is interesting to note that these dates do not include biological products and vaccines, which by definition come from nature.

It's called "xenobiotic" any type of molecule, having natural or synthetic origin, foreign to an organism, that can exert the function both of drug than toxic poison.

The research activity, during the PhD, was pointed out on the study of natural and xenobiotic compounds, their chemical characterization, evaluation of biological activity and consequently their potential uses as drugs.

The researches were focused on two different topics:

A) Identification and characterization of biologically active compounds from *Rubus ulmifolius* extracts

B) Evaluation and elucidation of the biological chemistry of organotin compounds.

A) Identification and characterization of biologically active compounds from *Rubus ulmifolius* extracts

Rubus ulmifolius Schott is a perennial plant widely diffused in Italy and well known as "rovo" (Pignatti 1982). *Rubus* leaf extract contains triterpenes, fatty acids, tannins, flavonoids (Panizzi *et al.* 2001) and other molecules having pharmaceutical properties not completely studied.

Outline.

First, we investigated the biological activity (cytotoxic or antiproliferative) of alcoholic extract, with particular attention to the effects on cell proliferation and morphological changes.

The evaluation of the effect of *Rubus ulmifolius* extract was evaluated on human tumor cell lines HeLa, HepG2, HL60 and HL60/MX2.

In order to detect the cytotoxic or antiproliferative effects, we evaluated the cell countings and the growth curves upon treatment with different extracts..

Subsequently, the morphological and cytoskeletal alterations at cellular level were studied by microscopy techniques.

Further, by thin layer chromatography (TLC) we isolated a spot, named "R", showing the highest biological activity.

Then we identified the molecules contained in the active spot from *Rubus ulmifolius* leaves extract, as: Quercetin glucuronide, Kaempferol glucuronide and Chlorogenic acid.

On the basis of these results and seen the similarity between the chemical structure of the molecules identified and tacrine, an inhibitor of the

Acetylcholinesterase previously studied in our lab, we tested these compounds as inhibitors of Acetylcholinesterase.

The results obtained suggest that molecules from spot "R" have some pharmacological interest.

Interestingly the inhibition activity of *R. ulmifolius* extracts on cell proliferation and on Acetylcholinesterase is not only due to the molecules already known and studied, the flavonoids quercetin and kaempferol, but also to their glucuronide derivatives.

B) Evaluation and elucidation of the biological chemistry of organotin compounds.

Organotin compounds are xenobiotic compounds ubiquitous in the environment. They represent the most toxic pollutants known for aquatic life; environmental pollution caused by OT compounds extended widely as a result of large industrial and agricultural applications. Some OT compounds showed an anti-neoplastic action while others were cytotoxic, genotoxic, mutagenic and neurotoxic.

Although the site of interaction of the OT compounds, at mitochondrial membrane level, is well known, the mechanisms of toxicity and biological degradation remain unclear (Tobin *et al.* 1999). Previous studies have shown that a synthetic peptide (SNN-PEP, I₁LGCWCYLR₉), derived from the primary sequence of stannin, a protein involved in the detoxification of OT,

and containing two vicinal cysteine residues (CXC motif), is able to dealkylate TMT to DMT suggesting that this reaction is also involved in triggering of cell death by apoptosis.

Starting from this point, studies were conducted with the aim of verified whether the SNN-peptide was able to dealkylate organotin compounds in species less substituted, thus altering their cytotoxicity and biological activity.

Therefore, we investigated the kinetics of the dealkylation TetraMT and two of the most common OT trisubstituted, TMT and TET by fluorescence spectroscopy,. The reaction mechanism can be described as a pseudoenzymatic reaction that ends in a covalent complex formed by the di-alkyltin compound bound to SNN-PEP.

Tetra-and tri-alkyltin compounds show a marked delay in their toxic action when compared with the corresponding molecules di- and mono-alkylated. So, it was hypothesized that the delayed toxicity is a consequence of progressive dealkylation of compounds with production of more toxic di- and mono-derivatives.

In previous studies it was suggested that organotin compounds, interacting with stannin or directly with the DNA, could initiate a cascade of events necessary to induce cell death or else, to control the stannin expression . Thus we study the biological activity of different organotin compounds on two cell lines: HeLa and NB2a by MTT assays, morphological analysis (light microscopy) and cytoskeletal observations (fluorescence microscopy). Organotin compounds used in treatments were: Triphenyltin chloride (TPT), Tetramethyltin (4MT), in particular Dimethyltin dichloride (DMT), Trimethyltin chloride (TMT), Triethyltin bromide (TET) at the concentrations ranging from 1 to 100 μM .

Investigations by immunofluorescence were carried out to verify changes in the SNN expression after treatment of Hela (human cervical adenocarcinoma) and NB2a cells (murine neuroblastoma) with increasing concentrations of DMT, TMT and TET.

INDICE

CAPITOLO I

1 INTRODUZIONE	13
1.1 <i>La pianta di Rubus ulmifolius Schott</i>	13
1.2 <i>Composizione chimica del Rubus ulmifolius</i>	13
1.3 <i>Studi chimico-farmacologici</i>	15
1.4 <i>Morte cellulare: Necrosi, Apoptosi e Autofagia</i>	20
2 MATERIALI E METODI	24
2.1 <i>Preparazione dell'estratto di Rubus ulmifolius</i>	24
2.2 <i>Cromatografia su strato sottile (Thin Layer Chromatography)</i>	24
2.3 <i>Cromatografia HPLC</i>	25
2.4 <i>LC – Massa</i>	26
2.5 <i>Purificazione delle molecole contenute nello spot R</i>	27
2.6 <i>Linee cellulari</i>	27
2.7 <i>Conta cellulare</i>	29
2.8 <i>Curve di crescita e trattamenti</i>	29
2.9 <i>Saggi MTT</i>	31
2.10 <i>Immunofluorescenza su cellule hela</i>	32
2.10.1 <i><u>Visualizzazione del citoscheletro mediante microscopia a fluorescenza</u></i>	33
2.10.2 <i><u>Visualizzazione della proteina P53 mediante microscopia a fluorescenza</u></i>	33
3 RISULTATI	34
3.1 <i>Valutazione degli effetti dell' estratto di foglie di Rubus ullmifolius</i>	34
3.2 <i>Microscopia ottica</i>	35
3.3 <i>Valutazione degli effetti degli spots (TLC)</i>	37
3.4 <i>Saggi MTT</i>	38
3.5 <i>Immunofluorescenza</i>	38
3.6 <i>TLC e HPLC</i>	40
3.7 <i>LC – Massa</i>	42
3.7.1 <i><u>Spot 6</u></i>	42
3.7.2 <i><u>Spot R</u></i>	43
4 DISCUSSIONE	45

CAPITOLO II

1 INTRODUZIONE	50
1.1 <i>L'enzima acetilcolinesterasi</i>	51
1.2 <i>Acetilcolina</i>	52
1.3 <i>Inibitori della colinesterasi</i>	54
1.4 <i>Morbo di Alzheimer</i>	57
2 MATERIALI E METODI	59
2.1 <i>Saggio enzimatico</i>	59
2.2 <i>Inibizione dell'enzima</i>	59
2.3 <i>Calcolo della percentuale di inibizione</i>	60
3 RISULTATI E DISCUSSIONI	61

CAPITOLO III

1 INTRODUZIONE	66
1.1 <i>Tossicità dei composti organo stagno</i>	67
2 MATERIALI E METODI	72
2.1 <i>Preparazione del peptide</i>	72
2.2 <i>Spettroscopia di fluorescenza</i>	72
2.3 <i>Determinazione delle affinità di legame</i>	72
2.4 <i>Studio della Stato Stazionario</i>	73
3 RISULTATI	74
3.1 <i>Monitoraggio della cinetica dealchilazione mediante spettroscopia di fluorescenza</i>	74
3.2 <i>Modello cinetico</i>	76
4 DISCUSSIONE	79

CAPITOLO IV

1 INTRODUZIONE	83
2 MATERIALI E METODI	84
2.1 <i>Composti OT</i>	84
2.2 <i>Culture cellulari</i>	84
2.3 <i>Saggio MTT</i>	84
2.4 <i>Immunofluorescenza</i>	85
2.5 <i>Microscopia ottica</i>	86
3 RISULTATI	87
3.1 <i>Vitalità cellulare</i>	87
3.1.1 <i><u>TPT e 4MT</u></i>	87
3.1.2 <i><u>TET, TMT e DMT</u></i>	88
3.2 <i>Microscopia ottica</i>	89
3.3 <i>Immunofluorescenza</i>	91
3.4 <i>Vacuolizzazione</i>	95
3.5 <i>NB2a</i>	96
4 DISCUSSIONE	98
 BIBLIOGRAFIA	 101

CAPITOLO I

1 INTRODUZIONE

1.1 La pianta di *Rubus ulmifolius* Schott

Il Rovo è una pianta legnosa, dai numerosi fusti, angolosi o cilindrici, lunghi da 1 a 4-5 metri, ordinariamente biennali, ricadenti, striscianti o più o meno rampicanti, munita di aculei di forma variabile, foglie alterne, picciolate. Le foglie sono palmate, a 3 o 5 foglioline di forma e grandezza variabili. Le foglioline sono dentate, talvolta lobate, più o meno spinose sulle nervature della pagina fogliare inferiore; il picciolo è spinoso. I fiori sono riuniti in grappoli o in pannocchie terminali di varia forma: larghi 2 cm circa, con sepali bianco-tomentosi o verdi, petali separati rosei o bianchi, numerosi stami. I frutti (le “more”) sono neri alla maturazione, talvolta bluastri o rossi, formati da numerose drupeole polpose a 1 seme, riunite in un ricettacolo convesso o conico.

Sono state descritte in Europa circa 2.000 specie di Rovi. Da ciò si esplica un’ibridazione intensa (forse anche con delle mutazioni) suscitando delle forme nuove geneticamente stabili e che si riproducono per apogogamia (partenogenesi vegetale: il frutto si sviluppa senza fecondazione, vale a dire senza la partecipazione del polline); poiché il processo di ibridazione continua e ne appaiono sempre di nuovi, la maggior parte dei Rovi europei è di origine assai recente.

1.2 Composizione chimica del *Rubus ulmifolius*

La composizione chimica del *Rubus ulmifolius* Scott è complessa a causa della presenza di molti composti diversi e di molecole non ancor identificate precisamente. Genericamente la pianta contiene polisaccaridi, proteine, acidi grassi saturi e insaturi, acidi organici, vitamine, sali minerali oltre ai componenti molecolari caratteristici degli organismi vegetali quali ad esempio flavonodi, tannini, antocianine e polifenoli.

L’isolamento e la caratterizzazione delle molecole specifiche contenute nella pianta di *Rubus ulmifolius* sono il risultato di numerose indagini chimiche.

Studi effettuati tramite gas cromatografia hanno permesso l’isolamento e l’identificazione dei composti organici contenuti nelle foglie di Rovo tra i quali quercetina, kamferolo, trifolin,

iperina, acido clorogenico e acido caffeico (Tzouwara-Karayanni *et al.* 1981). La tabella sottostante mostra i risultati di questa ricerca:

Estratti	Composti
<i>Esano</i>	Acidi grassi da C16 a C24, idrocarburi da C13 a C33, alcoli alifatici da C18 a C24, steroli, triterpeni (tracce)
CHCl₃ e CHCl₃ /MeOH (9:1)	Acido Ursolico, acido oleanolico, acido tormentico, acido euscafico, corosina, acido 23-idrossi tormentico, acido 2a-idrossiursolico, acido ursolico 28-glucoside, acido tormentic 28-glucoside, acido euscafico 28-glucoside, nigaichigoside, quercetina, kamferolo
MeOH EtOH	Acido ferulico, acido 3-caffeochinico, acido 5-caffeolchinico, acido 1,4-dicafeolchinico, nigaichigoside, tiliroside, metilglucopiranosio, 3 α ,19 α , 23-triidrossiuro-12-en-28 glucosilestere, acido 4-caffeolchinico, luteolina-7-O- β -D-glucuronide, acido gallico, kamferolo 3-O- β -D-glucuronide, quercetina-3-O- β -D-glucuronide, kamferolo-3-O- β -D-galactoside, kamferolo-3-O- β -D-glucoside, kamferolo-3-O- α -L-arabinopiranoside, quercetina-3-O- β -D-glucoside, quercetina-3-O- α -L-rhamnoside

Tra le molecole individuate, la quercetina e il kamferolo sono state definite quantitativamente dopo estrazione da foglie secche di Rovo attraverso un dosaggio fluorimetrico (λ : 350nm) da cui sono risultate le seguenti concentrazioni: kamferolo 19.0 μ M (λ_{em} 510nm) e quercetina 14.9 μ M (λ_{em} 530nm) (Tzouwara-Karayanni *et al.*, 1982).

Indagini spettrofotometriche eseguite anche sui frutti di Rovo (le more) hanno consentito l'isolamento dall'estratto etanologico di tre antocianine: una di queste mostra un'assorbanza massima a 535 nm e una reattività al AlCl₃ tipica delle cianidine, le altre due sono glicosilate; ulteriori osservazioni delle TLC e degli spettri hanno indicato che queste molecole sono costituite da cianidina 3-glucoside e cianidina 7-glucoside (Diaz *et al.* 1982).

Analisi cromatografiche delle parti aeree del *Rubus ulmifolius* (Flamini *et al.* 2001) hanno permesso l'individuazione di tre antroni che non erano mai stati precedentemente isolati in natura. A differenza degli altri antroni che mostrano tre o quattro gruppi idrossilici, si tratta di esa- o epta-ossigenati, che presentano una catena laterale metilencarbossilica, e possono essere legati a zuccheri e/o a gruppi prenili o geranilici. Le molecole individuate sono: il rubantrone A, il rubantrone B e il rubantrone C.

Al fine di verificare l'attività antimicrobica su funghi e batteri degli estratti metanolici di *R. ulmifolius*, sono state purificate tramite cromatografia Sephadex tre frazioni contenenti rispettivamente: (I) triterpeni, (II) flavonoidi quali Quercetina-3-O- β -D-glucoronide e Kamferolo-3-O- β -D-glucoronide, acido caffeoilchinico, acido gallico, acido ferulico e (III) tannini. Da questo studio, inoltre si è anche dedotto che i suddetti flavonoidi glicosilati rappresentano i composti più abbondanti in questa specie (Panizzi *et al.* 2001).

Le foglie di Rovo, infine, sono ricche in Mn (941 ppm) e Mg (3.77 g/kg). Oltre a questi elementi sono presenti anche Na, K, Ca, Fe, Zn e Cu (Zimma *et al.* 1990).

1.3 Studi chimico-farmacologici

Le ricerche chimico-farmacologiche sono state indirizzate sia sull'effetto dell'estratto di *Rubus ulmifolius* (foglie e frutti) che sull'attività delle molecole in esso contenute (singolarmente o in combinazione tra di loro).

E' stato dimostrato che l'estratto metanolico di Rovo possiede notevoli proprietà antimicrobiche su funghi e batteri (McCutcheon *et al.* 1994). Partendo da questi risultati, sono stati effettuati ulteriori studi che hanno condotto all'isolamento dei costituenti responsabili di questo effetto su batteri GRAM + e GRAM – (in particolare su *Staphylococcus aureus*) e su *S. cerevisiae* e *C. albicans*. L'estratto metanolico iniziale è stato purificato su colonnina di Sephadex ottenendo tre frazioni distinte contenenti: solo triterpeni (frazione **I**), flavonoidi glicosilati, acido caffeoilchinico, acido gallico, acido ferulico (frazione **II**) e tannini (frazione **III**). Si è poi osservato che l'attività antimicrobica era concentrata nella frazione III e in due molecole della frazione II: acido gallico e acido ferulico (Panizzi *et al.* 2001).

Come in precedenza riportato, lo stesso gruppo di lavoro ha identificato tre nuove molecole dall'estratto di Rovo, i rubantroni A, B e C tra cui il rubantrone A si è dimostrato attivo contro lo stesso *Staphylococcus aureus* (Flamini *et al.* 2001).

Studi recenti hanno dimostrato l'attività antimicrobica contro *Helicobacter pylori* dell'estratto di rovo e di alcune molecole in esso contenute (acido ellagico e kamferolo) (Martini *et al.* 2009), attività strettamente correlata alle proprietà antiossidanti di tale estratto (Dall'Acqua *et al.* 2008).

E' stata anche studiata l'attività ipoglicemica esercitata da diverse piante, tra le quali il *R. ulmifolius*, in topi nei quali era stato indotto il diabete. L'infusione concentrata (200 g di pianta in polvere/L di acqua bollente) ha presentato una notevole attività ipoglicemica, con un graduale decremento della glicemia e con un massimo dell'effetto a 3h dal trattamento. In topi normali (controllo) la somministrazione dell'infuso non ha generato alcun effetto ossia non ha modificato in modo significativo il livello di glicemia (Lemus *et al.* 1999).

Un'altra vasta area di ricerca riguarda le proprietà antiossidanti dell'estratto di Rovo e di specifiche molecole appartenenti al gruppo dei flavonoidi che questa ed altre piante sono in grado di sintetizzare (Deighton *et al.* 2000). I flavonoidi rappresentano un gruppo di sostanze largamente distribuite in natura e che esplicano svariate attività biochimiche e farmacologiche. Chimicamente la struttura di base è rappresentata da due anelli benzenici combinati tra loro da un terzo anello C piranico contenente ossigeno. I flavonoidi sono metaboliti secondari che nelle piante da cui sono prodotti svolgono svariate funzioni biologiche importanti per la sopravvivenza tra le quali: la pigmentazione fiorale, la protezione nei confronti della componente ultravioletta della luce solare e la resistenza contro attacchi di funghi e batteri. Da notare che gli organismi animali non sono in grado di sintetizzare tali sostanze.

L'interesse per i flavonoidi è dato da numerose evidenze relative alle svariate attività biologiche che tali composti possono esercitare a livello cellulare.

I flavonoidi sono sostanze potenzialmente importanti in medicina come antinfiammatori e antiossidanti: tali proprietà ne giustificano l'impiego in diverse patologie dermatologiche a carattere infiammatorio, tra le quali la psoriasi. L'attività antinfiammatoria si realizza mediante l'inibizione della fosfolipasi A2, della cicloossigenasi e della lipoossigenasi con conseguente riduzione della produzione di metaboliti dell'acido arachidonico (prostaglandine, prostacicline, leucotrieni, trombossani) (Lindahl 93, Berezait 90, Yamamoto 84). Inoltre i

flavonoidi sembrano esplicare un'azione inibitoria sul rilascio di enzimi lisosomiali da parte dei neutrofili e sono attivi nel ridurre la produzione di istamina da parte dei mastociti.

Molti studi inoltre ne attestano l'azione neuroprotettiva e cardioprotettiva e il loro meccanismo di azione si inserisce anche in alcuni processi antisclerotici, radioprotettivi, epatoprotettivi e antivirali (Rodak *et al.* 1996).

Notevole interesse è suscitato dagli studi riguardanti il loro effetto chemopreventivo e, in particolare, i flavonoidi stanno assumendo un ruolo sempre più importante tra le sostanze che possono influenzare lo stato ossidativo dell'ambiente intra ed extracellulare. Le proprietà antiossidanti sono correlate soprattutto alla capacità di neutralizzare sostanze ossidanti come l'H₂O₂ e il radicale anione superossido responsabili della perossidazione delle membrane cellulari e del danneggiamento di proteine ed acidi nucleici. (Ogasawara 1985, Thart 1990, Rice-Evans 1995, Rice-Evans *et al.* 1996, Rice-Evans 2001).

E' stato visto che le piante europee appartenenti al genere *Rubus* contengono, soprattutto nel tessuto fogliare, notevoli quantità e varietà di sostanze (Khanani *et al.* 1997) la cui attività antiossidante è stata provata. Infatti, adottando uno specifico test che si avvale di uno strumento manometrico, è stato misurato un alto grado di assorbimento di ossigeno durante l'ossidazione di isopropilbenzene (Denisov *et al.* 1975).

Da emergenti ricerche e teorie però si evince che i flavonoidi e i loro metaboliti, *in vivo*, non attuerebbero solo le reazioni antiossidanti convenzionali ma eserciterebbero un'attività modulatoria sulle cellule attraverso la loro azione su proteine kinasi (PI 3-kinasi, tirosina kinasi, proteina kinasi C, MAP kinasi) coinvolte nei processi di trasduzione del segnale e quindi anche nell'espressione genica (Kobuchi *et al.* 1999, Kong *et al.* 2000). Si parla infatti di "fitoestrogeni" (Walle 2004) per i quali numerosi studi si concentrano sul loro coinvolgimento nell'induzione di apoptosi.

Molto studiati sono i due flavonoidi più abbondanti nelle foglie di *Rubus ulmifolius*: la quercetina ed il kamferolo (glicosilati e agliconi) e sulle loro potenzialità come agenti chemiopreventivi e antitumorali .

Studi epidemiologici hanno mostrato che il consumo di vegetali, frutti e tea è associato spesso a un basso rischio di cancro (Block *et al.* 1992) in vari modelli animali (Zhou *et al.* 1998, Shao *et al.* 1998) e che uno dei più comuni flavonoidi trovati negli alimenti vegetali è la quercetina (Anton, 1998). Anche se i meccanismi attraverso i quali questa molecola esercita la sua attività antiproliferativa e apoptotica restano da chiarire, diverse evidenze suggeriscono

che l'azione dei flavonoidi, come appunto la quercetina, sia mediata da specifiche interazioni con i siti di legame per gli estrogeni di tipo II (Ranelletti *et al.* 1992), dato confermato dallo studio sull'inibizione della crescita *in vitro* di cellule tumorali ovariche (Scambia *et al.* 1990). La quercetina inoltre è risultata efficace nell'inibire alcuni enzimi coinvolti nei meccanismi di trasduzione del segnale e nel controllo del ciclo cellulare e della sua progressione (eventi critici per lo sviluppo di alcuni tumori) quali: la proteina chinasi C (Agullo *et al.* 1997), la tirosina chinasi (Haguwara *et al.* 1988), la cdc25 fosfatasi (Aligiannis *et al.* 2001), la PI-3 chinasi (Gamet-Payraastre *et al.* 1999) e la DNA topoisomerasi II (Constantinou *et al.* 1995).

Molti altri studi sono stati eseguiti allo scopo di confermare e chiarire l'effetto anti-cancro della quercetina. *In vitro* questa molecola ha mostrato un'attività antiproliferativa contro varie linee cellulari tumorali di origine umana (Markaverich *et al.* 1988, Hosokawa *et al.* 1990, Larocca *et al.* 1990, Scambia *et al.* 1990): ad esempio, è stata testata su cellule umane di carcinoma della prostata provocando, anche in questo caso, un'inibizione nella crescita cellulare indotta dal legame diretto con una proteina chinasi (Lee *et al.* 1998). Inoltre, blocca il ciclo cellulare tra G₁ e S in cellule di cancro alla prostata così come in cellule leucemiche (Ranelletti *et al.* 1992, Yoshida *et al.* 1992): tale molecola, infatti, è stata saggiata, in terreno semi-solido, su cellule leucemiche sia di tipo mieloide che linfoide, inducendo un'inibizione della crescita superiore al 50% a concentrazioni pari a 2μM (Larocca *et al.* 1991).

La quercetina inoltre inibisce la proliferazione di cellule cancerose intervenendo nel processo che coinvolge le proteine dello shock termico (Wei *et al.* 1994)

La quercetina ha anche mostrato un effetto protettivo sulle ghiandole gastriche danneggiate da etanolo assoluto: in animali sottoposti a pretrattamento orale con alte dosi di quercetina (200mg/Kg), si è osservata una efficace prevenzione della necrosi attraverso l'incremento della produzione di muco accompagnata da una riduzione delle lesioni gastriche (Alarcon de la Lastra *et al.* 1994).

Anche il kamferolo, da solo o in associazione con altri composti aventi una struttura chimica di base simile (p.e quercetina, rutina ed altri flavonoidi) presenta *in vitro* delle attività biologiche antitumorali interessanti. Infatti, pur non essendo noti i precisi meccanismi protettivi, numerose evidenze suggeriscono che il Kamferolo possa assumere un ruolo importante nella prevenzione del cancro.

Da una ricerca basata su cellule umane della linea MCF-7 (tumore al seno), dove gli estrogeni inducono l'incontrollata proliferazione cellulare attraverso il legame con i recettori degli estrogeni stessi (ER), il trattamento con kamferolo, (35-70 μ M) che compete per il sito di legame ER, produce un'inibizione della crescita pari al 50% in 48h (Hung. 2003, Junjian Wang *et al.* 2009).

L'uso del kamferolo si è rivelato efficace soprattutto se associato ad altre molecole. Seguono alcuni esempi.

Chen e collaboratori hanno valutato gli effetti di otto flavoni, tra cui kamferolo, quercetina e morina su cellule di carcinoma colon-rettale appartenenti alle linee HT29, COLO205 e COLO320-HSR *in vitro* e *in vivo*. I risultati indicano un potente effetto citotossico dei flavoni sui tre tipi cellulari e l'induzione di apoptosi caratterizzata dalla frammentazione del DNA e dalla presenza dei corpi apoptotici (Chen *et al.* 2004).

Un'altra indagine si è basata sull'osservazione dell'enzima ciclossigenasi-2 (COX-2) espresso abbondantemente nelle cellule tumorali del colon. Gli sperimentatori hanno testato l'influenza di 14 composti, comprendenti quercetina, kamferolo, resveratrolo e resorcinolo, sul promotore di COX-2 ed hanno osservato che le suddette molecole ne sopprimono l'attività (Mutoh *et al.* 2000, Lee Kyung Mi *et al.* 2010).

Basse concentrazioni di kamferolo, apigenina e quercetina sono state poi utilizzate nel trattamento di cellule umane di carcinoma della prostata allo scopo di investigare sull'attività e sul contenuto di fosfotirosine diretto dalla proteina chinasi oncogenica FA. I risultati della ricerca indicano che questi bioflavonoidi possono funzionare da inibitori della tirosina chinasi FA attraverso la defosforilazione/inattivazione delle tirosine contenute in tale chinasi oncogenica (Lee *et al.* 1998).

Parallelamente allo studio di possibili effetti antitumorali è stata testata anche la carcinogenicità del kamferolo e della quercetina in ratti che hanno assunto per via orale le due sostanze; essi, inoltre, sono stati confrontati con ratti di controllo. Dopo 540 giorni non sono state evidenziate differenze statisticamente rilevanti nell'incidenza di tumori nei due gruppi indicando così che la quercetina e il kamferolo non risultano carcinogenici (Takanashi *et al.* 1983).

Un campo di applicazione particolarmente interessante è, infine, rappresentato dal possibile utilizzo, in futuro, del kamferolo per ridurre i rischi di sviluppo del Morbo di Alzheimer.

Studi clinici hanno mostrato che la terapia sostitutiva di estrogeni in menopausa è fortemente correlata con la diminuzione di incidenza di questa patologia neurodegenerativa. Nelle piante sono stati identificati dei composti (tra cui il kamferolo) che legano i recettori di estrogeni umani, e per questo sono denominati “fitoestrogeni; si ipotizza perciò un loro effetto protettivo comparabile a quello degli estrogeni umani (Roth *et al.* 1999).

1.4 Morte cellulare: Necrosi, Apoptosi e Autofagia

La morte di una cellula può avvenire attraverso tre distinte modalità: necrosi, apoptosi e autofagia.

La necrosi è un processo passivo che avviene quando la cellula, sottoposta ad un grave insulto chimico o fisico, perde irreparabilmente la propria integrità, funzionalità e quindi la capacità di sopravvivenza. Per insulto si intende qualsiasi evento che comprometta la capacità della membrana di mantenere l'equilibrio ionico tra i due versanti e che si traduce in un incremento dell'afflusso di ioni e acqua nel citoplasma. Segue il rigonfiamento della cellula e degli organelli citoplasmatici, in particolare dei mitocondri, e infine la rottura della cellula medesima (lisi). Tale processo comporta perciò il rilascio del contenuto citoplasmatico nello spazio extracellulare con il conseguente innesco di una risposta infiammatoria.

L'apoptosi è un meccanismo di morte cellulare fisiologico e attivo: è cioè la cellula stessa che, in risposta a stimoli esterni di natura fisica o chimica, innesca una cascata di reazioni biochimiche e molecolari che la portano alla morte. Esso richiede pertanto energia ed un apparato trascrizionale e di sintesi proteica integri.

Questa tipologia di morte cellulare è divenuta di notevole interesse nel settore medico-biologico ed in modo particolare in oncologia: un numero crescente di evidenze sperimentali suggerisce infatti che l'efficacia del trattamento antitumorale può essere associata con la possibilità di indurre apoptosi in quelle cellule tumorali dove la malignità e il conseguente aumento della velocità di proliferazione sono associate alla perdita della capacità della cellula ad andare incontro al processo apoptotico.

Le cellule che vanno in apoptosi presentano caratteri biochimici e morfologici particolari, distinti da quelli di una cellula necrotica: sono caratterizzate da una diminuzione del volume cellulare, da un addensamento della cromatina e da una frammentazione non casuale del DNA conservando l'integrità di membrana, anche se si ha la formazione di vescicole di superficie (*blebbing*). Nei tessuti il nucleo e il citoplasma danno origine a vescicole chiuse, avvolte da membrana (corpi apoptotici) che si distaccano dal corpo cellulare e vengono poi riconosciute e fagocitate da macrofagi, evitando così ogni dispersione di materiale citoplasmatico. *In vivo* grazie a questo meccanismo l'apoptosi non compromette l'integrità dell'ambiente circostante. *In vitro* invece i corpi apoptotici vanno incontro alla fase denominata *necrosi secondaria* caratterizzata da rigonfiamento e lisi

I cambiamenti sia morfologici che biochimici tipici dell'apoptosi vengono utilizzati per la valutazione e la quantificazione di questo fenomeno. Utilizzando una combinazione di più metodiche è possibile confermare la presenza e valutare l'entità dell'apoptosi. Ad esempio, la microscopia ottica consente di evidenziare le modificazioni nucleari attraverso l'utilizzo di coloranti fluorescenti che si intercalano al DNA (condensazione della cromatina, suo addossamento all'involucro nucleare, la frammentazione del nucleo e della cellula stessa in "corpi apoptotici", con sostanziale preservazione delle membrane). La microscopia ottica inoltre permette di osservare il caratteristico fenomeno del *blebbing*, ossia la rapida formazione e il rapido trasformarsi di estroflessioni di superficie, che preludono alla frammentazione cellulare.

Nell'apoptosi, l'endonucleasi CAD, attivata dalle caspasi, effettua dei tagli al DNA a livello della regione internucleosomica e genera frammenti di 200 basi o di lunghezza multipla di 200 basi. Il taglio operato dalle endonucleasi apoptotiche costituisce la base anche della tecnica di visualizzazione TUNEL, che consente di individuare, grazie ad una specifica colorazione, i nuclei di cellule in apoptosi nell'ambito di un preparato osservato con la microscopia ottica.

L'autofagia è un processo cellulare complesso, universale, altamente conservato e regolato, ATP-dipendente che avviene in tutte le cellule eucariote. Esso coinvolge il riarrangiamento di membrane subcellulari al fine di sequestrare citoplasma e organuli da esporre all'azione degradativa di organuli, come il vacuolo nel lievito e i lisosomi nelle cellule di mammifero,

dove il materiale sequestrato è degradato e riciclato (Kanazawa *et al.* 2003, Wang and Klionsky 2003).

L'autofagia presenta molteplici funzioni. Questo processo è coinvolto: (1) nel rimodellamento durante lo sviluppo e il differenziamento cellulare (Levine and Klionsky 2004); (2) nella degradazione delle proteine intracellulari (Mortimore *et al.* 1989); (3) nella produzione di aminoacidi quando si presenta un calo di nutrienti; (4) nel meccanismo di ricambio di citomembrane e di organuli come i mitocondri e i perossisomi (Klionsky and Emr 2000); (5) nel controllo del meccanismo della morte cellulare programmata di tipo II (non-apoptotica) (Shintani and Klionsky 2004).

L'autofagia può avere anche un ruolo nel controllo della crescita cellulare, persino in quella tumorale (Klionsky and Emr 2000).

L'autofagia è anche stata proposta come un meccanismo anti-invecchiamento in quanto è coinvolta nell'eliminazione di organuli e citomembrane danneggiati a causa della perossidazione età-dipendente di diverse molecole (Bergamini *et al.* 2003).

L'autofagia viene stimolata in risposta a diverse situazioni di stress come il digiuno, i cambiamenti nel volume cellulare, lo stress ossidativo, l'accumulo di proteine danneggiate, segnali ormonali, l'irradiazione e il trattamento con farmaci e xenobiotici (Meijer and Codogno 2004).

2 MATERIALI E METODI

2.1 Preparazione dell'estratto di *Rubus ulmifolius*

Alle foglie, accuratamente lavate con acqua distillata e pesate, è stato aggiunto un volume di etanolo pari al doppio del loro peso (ml/g). Si è poi proceduto a triturazione e omogeneizzazione mediante l'uso di un Minipimer; l'omogenato così ottenuto è stato lasciato in estrazione per 50 minuti a temperatura ambiente. La parte liquida risultante, di colore verde intenso, è stata ripresa per mezzo di una pipetta pasteur, trasferita in una provetta e centrifugata per 5 minuti a 2500 rpm a temperatura ambiente. Il sopranatante è stato concentrato 3 volte in corrente di azoto gassoso e quindi nuovamente centrifugato per 3 minuti a 15.000 rpm al fine di eliminare ogni residuo in sospensione. Il sopranatante è stato raccolto e utilizzato per le analisi di TLC e HPLC di seguito riportate.

Per effettuare i saggi biologici, invece, ed ottenere una soluzione acquosa, il campione è stato portato a secco con conseguente evaporazione di tutto il solvente di estrazione.

L'estratto così ottenuto è stato sciolto in acqua bidistillata prima dell'utilizzo o conservato a 4°C, coperto da carta stagnola per limitare eventuali alterazioni dovute alla luce.

2.2 Cromatografia su strato sottile (*Thin Layer Chromatography*)

I campioni in esame sono stati caricati su una lastra quadrata di dimensioni 20×20 (ICN Adsorbentien, ICN), a circa 1.5 cm dal bordo inferiore, sotto forma di spot distanti circa 1.5 cm l'uno dall'altro. Per far adsorbire piccole quantità di estratti di *Rubus ulmifolius* alla silice sono stati utilizzati una siringa (Cromagold-ICN) e un phon capace di fornire un getto d'aria fresca. Quest'ultimo ha permesso una più rapida evaporazione del solvente, limitando così le dimensioni degli spot che, per diffusione, tenderebbero invece ad espandersi compromettendo la successiva separazione. Ciascuna lastra è stata caricata con 12 spot, ognuno contenente 30µl di estratto etanologico di Roivo (volume che si è rivelato il miglior compromesso tra quantità di materiale e qualità di separazione). La fase mobile ritenuta idonea è una miscela

(1:1) di etanolo assoluto e di cloroformio (50 ml/ 50 ml)

La fase di rivelazione dell'attività migratoria mediante lampade UV (Blak-Ray) ha permesso di calcolare valori di RF (rapporto frontale), determinati dal rapporto tra la distanza percorsa dal singolo spot e quella percorsa dal fronte della fase mobile.

2.3 Cromatografia HPLC

Le analisi degli estratti derivati dal *Rubus ulmifolius* sono state eseguite per mezzo di un cromatografo Shimadzu SCL-6 A (a due pompe), adoperando una colonna Nucleosil 100 - 5 (250 × 4,6 mm); volume iniettato 20 µl.

La fase mobile era costituita da una miscela di acqua bidistillata (fase A) e metanolo (fase B); le condizioni iniziali del gradiente prevedevano metanolo al 30%. Il flusso era di 1.30 ml/minuto e la lunghezza d'onda del rivelatore UV-visibile pari a 280 e 360nm.

La corsa è stata programmata in sette fasi:

- 1 - eluizione isocratica per 8 minuti con B al 30 %;
- 2 - eluizione in gradiente per 10 minuti con B fino al 50%;
- 3 - eluizione isocratica per 5 minuti con B al 50 %;
- 4 - eluizione in gradiente per 10 minuti con B fino al 70 %;
- 5 - eluizione isocratica per 5 minuti con B al 70 %;
- 6 - eluizione in gradiente per 10 minuti con B fino al 90 %;
- 7 - eluizione isocratica per 5 minuti con B al 90 %.

Gli spot precedentemente separati per mezzo di metodiche di TLC, sono stati grattati dalla lastra con una lametta e posti in microprovette eppendorf con etanolo assoluto (500 µl volume della polvere di silice/700 µl etanolo assoluto) per 20 minuti e sottoposti poi a centrifugazione a 15.000 rpm per 5 minuti. Il pellet è stato scartato ed il sopranatante, concentrato 3 volte in corrente di azoto gassoso, è stato analizzato mediante HPLC ottenendo uno specifico cromatogramma .

L'estratto etanolic di *Rubus Ulmifolius*, non concentrato in corrente di azoto gassoso, è stato anch'esso studiato mediante HPLC con una preliminare filtrazione attraverso membrane filtranti in nylon dal diametro dei pori di 0,22 µm per eliminare il particolato più consistente, ottenendo un cromatogramma caratteristico.

Si è passati quindi all'analisi di standard commercializzati tutti dalla ditta Sigma-Aldrich per osservare eventuali sovrapposizioni con i precedenti risultati.

2.4 LC - Massa

Le analisi LC-MS/MS sono state effettuate con un cromatografo Ultimate 3.000 (Dionex) dotato di un rilevatore di raggi UV e di un campionatore automatico. Il cromatografo è stato accoppiato con uno spettrometro di massa LTQ Orbitrap (ThermoFisher scientifico) tramite un'interfaccia electrospray. La separazione dei composti è stata effettuata utilizzando una colonna C18 150 mm × 2,1 mm (Phenomenex, Supelco); temperatura 25 ° C.

15µl di ciascun campione sono stati iniettati nel sistema LC-MS e gli analiti sono stati separati usando un gradiente lineare utilizzando 0,1% trifluoroacetico acido (A) e acetonitrile (B). Il gradiente lineare utilizzato è stato il seguente: 0-1 min, 30% di B; 1-20 min, 30-100%B; 20-25 min 100% B per poi ritornare alla condizione iniziale in 2 minuti. La colonna è stata quindi equilibrata per 6 minuti. Il flusso pari a 0,2 mL / min; il rivelatore UV-VIS ha registrato gli spettri a 280 e 360 nm. Uno spettrometro massa LTQ Orbitrap (Thermo Fisher, Brema, Germania) dotato di un (ESI) sorgente di ioni di ionizzazione Electrospray Max è stato utilizzato come rivelatore.

Gli spettri di massa completi sono stati acquisiti, sia in bassa che alta risoluzione (60.000 FWHM) e sono stati elaborati utilizzando la versione 2.0 del software Xcalibur.

2.5 Purificazione delle molecole contenute nello spot R

La purificazione e l'ottenimento di adeguate quantità di kamferolo glucuronide e di quercetina glucuronide ha rappresentato un fattore limitante per lo svolgimento dei test biologici. La purificazione mediante HPLC partendo dall'estratto etanologico di foglie di Rovo richiede infatti una lunga procedura con un rendimento di circa 1 mg di molecole per 100g di foglie.

Le molecole derivanti dallo spot R sono state isolate e raccolte mediante HPLC a fase inversa per mezzo di un cromatografo Shimadzu SCL-6 A (a due pompe), adoperando una colonna

semipreparativa Phenomenex C18 (250 ×10 mm).

2.6 Linee cellulari

Il modelli cellulari utilizzati per saggiare gli effetti degli estratti di *Rubus ulmifolius* sono stati i seguenti:

HeLa - Le cellule HeLa sono cellule tumorali immortalizzate altamente stabilizzate, molto utilizzate nella ricerca scientifica. Questa linea cellulare è stata isolata da un cancro della cervice uterina di Henrietta Lacks (dal cui nome deriva quello delle cellule), che morì di questo cancro nel 1951. Le HeLa sono molto resistenti e sono in grado di sopravvivere in condizioni che altre cellule non possono tollerare, sono in grado di vivere per un periodo relativamente lungo anche in assenza di terreno di coltura. Le HeLa possono dividersi molte più volte rispetto alle altre cellule e ciò dipende da una mutazione della telomerasi che previene l'accorciamento del telomero durante la replicazione. Le cellule appartenenti a questa linea crescono adese in terreno di coltura Dulbecco's Modification of Minimum Essential Medium (DMEM), complementato con siero fetale bovino (FCS) al 10% e glutammina 2 mM.

HepG2 - Le HepG2 sono cellule di epatocarcinoma umano che conservano molte delle caratteristiche differenziate specifiche dell'epatocita. Le cellule appartenenti a questa linea crescono adese in terreno di coltura Dulbecco's Modification of Minimum Essential Medium (DMEM), complementato con siero fetale bovino (FCS) al 10%, glutammina 2 mM e piruvato di sodio 1 mM.

HeLa e HepG2 sono cellule che crescono adese al fondo della fiasca fino ad occupare l'intera superficie disponibile: questo stadio si definisce "coltura confluenta". A confluenza la crescita si arresta e le cellule devono essere trasferite in nuove piastre per evitare che vengano favoriti eventuali mutanti capaci di crescere a multistrato.

Per il trasferimento è necessario staccare le cellule dal fondo della piastra con una soluzione di acido etilen diamino tetraacetico (EDTA, 200 mg/l) e tripsina (500 mg/l), previo lavaggio con tampone fosfato (PBS), necessario a rimuovere completamente il siero e i cationi bivalenti presenti nel terreno. L'EDTA chela gli ioni calcio e magnesio, indispensabili all'adesione, mentre la tripsina degrada le proteine della matrice che mantengono le cellule aderenti. Una volta ottenuto il distacco delle cellule, l'azione della tripsina e dell'EDTA viene

neutralizzata con l'aggiunta di terreno completo che contiene sia un eccesso di ioni calcio che inibitori specifici della tripsina (contenuti nel siero). Le cellule vengono quindi seminate in nuove fiasche e fatte crescere per il tempo necessario.

HL60 - Le cellule appartenenti a questa linea (promielocitica umana) presentano una morfologia linfoblastoide e crescono in sospensione in terreno di coltura RPMI complementato con siero fetale bovino (FCS) al 10% e glutammina 4 mM.

HL60/MX2 - Si tratta di cellule resistenti al mitoxantrone, derivanti dalla linea cellulare HL60 che crescono in sospensione in terreno di coltura RPMI complementato con siero fetale bovino (FCS) al 10%, glutammina 2 mM e piruvato di sodio 1 mM.

Il sistema tampone utilizzato in questi terreni è il bicarbonato/acido carbonico. Quest'ultimo deriva in parte dalla CO₂ dell'atmosfera, in parte da quella prodotta dalle cellule.

Il terreno contiene normalmente anche rosso fenolo, un indicatore visivo di pH che ha un colore rosso a pH 7.3, vira al giallo a pH acido, al rosso-viola a pH alcalino. Con il proliferare delle cellule il colore del terreno tende al giallo a causa dell'acidificazione provocata dai cataboliti prodotti dal metabolismo cellulare, perciò è necessario sostituire spesso il terreno "esausto" con terreno fresco (De Filippi e Tarone, 1993).

Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37°C e in un'atmosfera arricchita di CO₂ al 5%.

2.7 Conta cellulare

Le cellule sono state seminate in numero uguale nei pozzetti delle piastre di coltura allo scopo di procedere alla elaborazione di curve di crescita relative sia alle cellule di controllo che alle cellule trattate con i vari estratti di *Rubus ulmifolius* e con gli spot derivanti dalla TLC.

Per la conta cellulare è stata utilizzata la camera contaglobuli di Thoma-Zeiss dove il vetrino è diviso in 16 aree, ciascuna delle quali contiene 16 quadratini. Il lato di un quadratino è 1/20 mm, quindi la sua area è 1/400 mm²; la distanza tra il vetrino e il coprioggetto è di 100 µm, perciò il volume di un quadratino è di 1/4000 mm³.

Dopo aver risospeso bene le cellule di ogni pozzetto, si è lasciato che una goccia passasse per

capillarità tra il vetrino e il coprioggetto della camera di Thoma e si è proceduto alla conta, utilizzando un microscopio ottico invertito. Per ottenere il numero delle cellule/ml è stata calcolata la media delle cellule contate per il numero dei quadratini e quindi moltiplicata per $10^5 \times D$, dove D è il fattore di diluizione. Per valutare la presenza di cellule morte si è usato un test di vitalità a base di una soluzione allo 0.4% in Trypan blue. Questo colorante penetra solo nelle cellule che hanno perso l'integrità di membrana e che sono dunque morte; di conseguenza è possibile valutare, con la conta cellulare, il numero e la percentuale finale di cellule vitali.

2.8 Curve di crescita e trattamenti

Le curve di crescita delle cellule sono state elaborate mediante conte cellulari 20 ore dal trattamento e hanno permesso di valutare, in termini di inibizione di crescita, gli effetti dei vari estratti di *Rubus ulmifolius*. Ogni esperimento è stato condotto almeno cinque volte operando sempre in doppio per verificare che i dati del conteggio cellulare fossero confermati. A causa delle differenti caratteristiche delle linee cellulari utilizzate, sono state applicate due procedure diverse nella preparazione delle cellule da sottoporre a trattamento:

Hela e HepG2 (cellule adese) : sono state seminate 50.000 cellule/ml sui poste in piastra da 24 e 96 pozzetti (1ml/pozzetto nelle piastra da 24; 200 μ l/pozzetto nelle piastra da 96). Dopo 24 ore il medium è stato rimosso, sostituito con un terreno di coltura fresco contenente estratto di RoVo a diverse concentrazioni e lasciato ad incubare a 37 ° C per 20 ore.

HL60 e HL60/MX2 (cellule in sospensione) : è stato seminato un numero costante di cellule (100.000 per pozzetto) in un volume di medium pari ad 1ml e sono stati somministrati rispettivamente 50, 100, 250 e 500 μ g di estratto. Trascorso il tempo prestabilito si è proceduto alla conta cellulare sia delle cellule trattate, che di quelle di controllo che sono state lasciate crescere aggiungendo, al posto degli estratti, un volume equivalente di terreno di coltura, per evitare che le eventuali differenze nelle conte fossero imputabili all'inevitabile diluizione a cui sono andate incontro le cellule trattate con gli estratti.

Allo scopo di procedere alla possibile individuazione di un principio biologicamente attivo tra

gli spot evidenziati grazie alle lampade UV, sono stati saggiati, uno ad uno, i singoli spot compreso il residuo, denominato “ R ”, costituito dal materiale che non ha migrato in presenza della fase mobile.

Tutti gli spot ed R sono stati grattati dalla lastra e sciolti singolarmente in soluzioni contenenti percentuali crescenti di etanolo in acqua (0% per lo spot R fino al 100% di etanolo per lo spot 6). Dopo 60 minuti le soluzioni sono state centrifugate (14.000 giri per 5 minuti) e concentrate tre volte per mezzo di un flusso di azoto gassoso allo scopo di far evaporare tutto l'etanolo ove presente.

Lo spot R è stato sciolto in acqua bidistillata, un solvente che è risultato sicuramente più idoneo all'estrazione delle molecole in esso contenute rispetto alla soluzione alcolica.

Una volta solubilizzati, tutti gli spot sono stati somministrati singolarmente alle cellule HeLa. La dose aggiunta di ogni spot è stata quella ottenuta da 500µg di estratto di Rojo (dose massima di trattamento) . I risultati, poi, sono stati messi a confronto con quelli ottenuti nei saggi con 500 µg di estratto *in toto*.

2.9 Saggi MTT

Il saggio MTT permette di stabilire indirettamente il numero di cellule vitali presenti in un campione attraverso una valutazione della loro attività metabolica. Questo metodo si avvale dell' uso dei sali di tetrazolio, in particolare del 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT), i quali vengono ridotti da deidrogenasi mitocondriali NAD-dipendenti a composti colorati chiamati formazani (Berridge *et al.* 1996). Solo i mitocondri attivi delle cellule vive, infatti, sono in grado di operare questa trasformazione e, poiché l'assorbanza di questi composti è funzione della loro concentrazione, dai dati ricavati da una lettura spettrofotometrica si può ottenere un' informazione quantitativa e risalire al numero di cellule vitali contenute nel campione.

L'MTT è stato sciolto in PBS in modo da ottenere una soluzione con una concentrazione finale di 5 mg/ml che è stata poi filtrata e ripartita in aliquote conservate al buio a -20°C.

I saggi sono stati condotti su cellule di controllo non trattate (Contr.) e su cellule trattate, rispettivamente, con 50, 100, 250 e 500 µg/ml di estratto di foglie di *Rubus ulmifolius*.

Il trattamento è stato effettuato, come per i campioni preparati per le conte cellulari, in piastre

da 96 pozzetti, ognuno dei quali contenente 100.000 cellule/ml di DMEM (200 µl/pozzetto). Per questi saggi è stato utilizzato anche DMEM bianco, privo cioè di rosso fenolo, allo scopo di evitare interferenze con la successiva lettura allo spettrofotometro.

Il saggio MTT è stato effettuato sulle cellule rispettivamente a 20 ore dal trattamento. Trascorso il tempo stabilito, le cellule sono state private del terreno di coltura (mediante centrifugazione a 1000 rpm per 5 minuti nel caso delle linee cellulari HL60 e HL60/MX2 o mediante semplice aspirazione per le cellule HeLa e HepG2), sottoposte a lavaggio in PBS (37°C) e addizionate nuovamente di 100 µl/pozzetto di DMEM fresco (37°C) mediante l'ausilio di una pipetta multicanale.

Ai pozzetti sono stati aggiunti 10 µl di MTT previamente scongelato. Le piastre sono state agitate bene e poi lasciate in incubatore per 4 ore, coperte di carta stagnola, per dare alle cellule il tempo di metabolizzare l'MTT. Trascorso il tempo necessario a ciascun pozzetto sono stati addizionati 100 µl di DMSO per solubilizzare i cristalli formati: si è così ottenuta una colorazione sul violetto. I pozzetti sono stati accuratamente risospesi con l'ausilio di una pipetta multicanale fino al completo ridiscioglimento dei cristalli e, dopo 45 minuti, si è proceduto alla lettura delle piastre utilizzando una lunghezza d'onda di 595 nm (Di Stefano *et al.* 1998).

Per ogni campione sono stati preparati 8 pozzetti (in doppio) e in ogni piastra sono stati allestiti anche 8 pozzetti corrispondenti al cosiddetto "bianco" costituito soltanto da DMEM (100 µl) e MTT (10 µl).

2.10 Immunofluorescenza su cellule HeLa

Per effettuare gli studi di immunofluorescenza, sono state seminate 50.000 cellule/ml/pozzetto sui vetrini coprioggetto poste in piastre da 24 pozzetti. Dopo 20 ore il medium è stato rimosso, sostituito con un terreno di coltura fresco contenente estratto di RoVo a diverse concentrazioni e lasciato ad incubare a 37 ° C per 20 ore.

La procedura di preparazione delle cellule per l'immunofluorescenza è stata la seguente.

Le cellule sono state lavate tre volte con soluzione salina tampone (PBS), fissate con metanolo (Sigma-Aldrich; a -20 ° C) per 5 minuti, lavate tre volte con PBS e quindi permeabilizzate con acetone (Sigma-Aldrich; a -20 ° C) per 5 min.

Successivamente le cellule sono state incubate per 30 min con una soluzione all'1% di BSA in PBS per bloccare i siti di legame non specifici degli anticorpi; le cellule sono state poi incubate con un anticorpo primario adeguatamente diluito in BSA/PBS per 1 ora a RT, lavate una volta con PBS e incubate con un anticorpo secondario per 45 min a RT.

Inoltre è stato visualizzato il DNA mediante la marcatura con DAPI (4,6-diammino-2-phenylindole, dihydrachloride - Molecular Probes, USA).

La colorazione fluorescente è stata osservata utilizzando un microscopio a fluorescenza convenzionale Zeiss (ingrandimento 40X e 100X).

Le procedure di lavaggio e di incubazione devono essere effettuate con grande cura e il numero dei passaggi ridotto al minimo necessario al fine di evitare il distacco delle cellule. Tutte le cellule non fissate alla superficie dei vetrini infatti, e in particolare quelle già gravemente danneggiate a causa di citotossicità dell'estratto, vengono perse durante le fasi di preparazione dei vetrini per l'analisi microscopica.

2.10.1 Visualizzazione del citoscheletro mediante microscopia a fluorescenza

Per la visualizzazione dell'apparato citoscheletrico microtubulare le cellule sono state poi incubate con:

- Anticorpo primario monoclonale anti-tubulina di topo (Amersham, Inghilterra) diluizione 1:1000
- Anticorpo secondario di capra anti-topo Alexafluor 488 IgG (H + L) (Molecular Probes, USA) diluizione 1:200

Il microtubuli citoscheletrici mostrano una colorazione fluorescente verde.

2.10.2 Visualizzazione della proteina P53 mediante microscopia a fluorescenza

Per la visualizzazione della proteina P53 le cellule sono state incubate con:

- Anticorpo primario policlonale anti-p53 di coniglio [Santa Cruz Biotechnology, Inc. (FL-393); sc-6243] diluizione 1:250
- Anticorpo secondario di topo anti-coniglio Alexafluor 594 IgG (H + L) (Molecular Probes, USA) diluizione 1:500

La proteina P53 mostra una colorazione rossa.

3 RISULTATI

3.1 Valutazione degli effetti dell' estratto di foglie di *Rubus ullmifolius*

In Figura 1 è riportato il grafico delle curve di crescita delle cellule tenute in coltura per 20 ore in presenza concentrazioni crescenti di estratti di foglie di *Rubus Ullmifolius*. Insieme al grafico una tabella riporta anche i valori delle conte cellulari espressi percentuale rispetto al controllo non trattato.

Sono state trattate 100.000 cellule/pozzetto rispettivamente con l'estratto di foglie di Rofo (50, 100, 250 e 500 µg/ml) e il DMEM di controllo; questo esperimento è stato condotto numerose altre volte, operando sempre in quadruplo.

Già dopo 4-5 ore dal trattamento si osservano variazioni del numero di cellule nei pozzetti in esame, in particolare in quelli trattati con le concentrazioni più elevate di estratto; 20 ore dopo, i risultati ottenuti evidenziano che la vitalità cellulare trattate con l'estratto di foglie di Rofo, è significativamente inferiore a quella del controllo già a partire dalla somministrazione di 50µg/ml.

L'estratto inoltre risulta attivo su tutte le linee cellulari utilizzate con modalità dose/dipendente; tra tutte, però, le cellule HeLa e le H160 risultano più sensibili, anche alla dose più bassa di estratto.

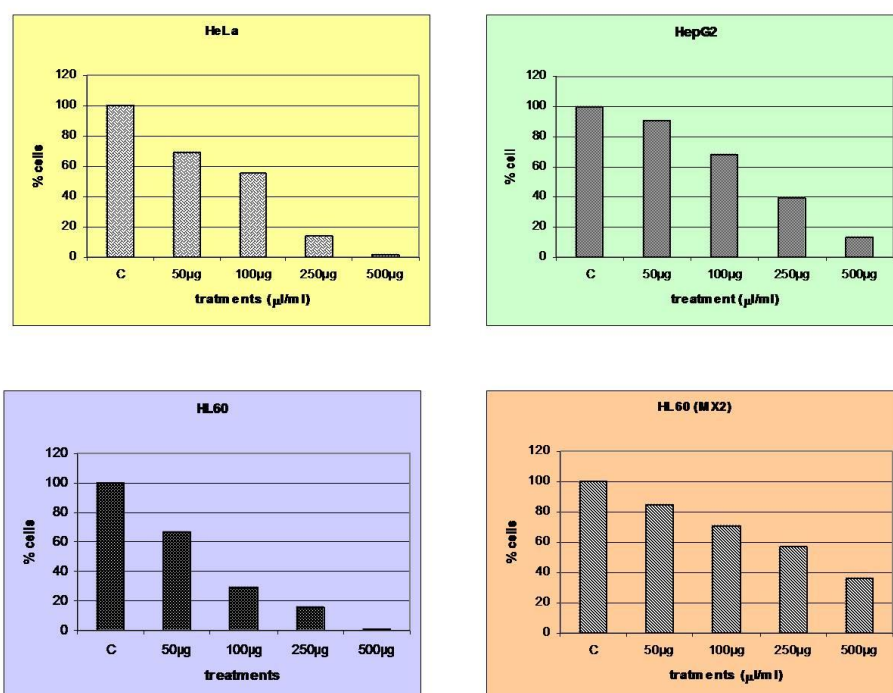


Figura 1 - conte vitali delle cellule Hela, HepG2, H160 e H160/MX2 dopo 20 ore di trattamento con concentrazioni crescenti di estratto di *Rubus ullmifolius*; (cellule di controllo C)

3.2 Microscopia ottica

Una prima osservazione al microscopio ottico invertito delle cellule già 4 ore dopo l'aggiunta dell'estratto permette di rilevare alcuni cambiamenti e lievi alterazioni morfologiche (dati non mostrati) rispetto ai controlli; dopo 20 ore dal trattamento appare ancora più evidente dalle immagini la precisa correlazione dose/effetto (μg /citotossicità).

Immagini rappresentative delle cellule trattate e non trattate sono presentate nelle figure 2, 3, 4 e 5.

Come mostrato nelle figure 2 e 3 (linee cellulari HL60 e HL60/MX2) le cellule di controllo appaiono tondeggianti e la loro membrana cellulare intatta. Dopo il trattamento con la dose più bassa di estratto, si possono osservare numerose cellule che hanno perso la loro vitalità e in quelle ancora vitali la membrana cellulare presenta irregolarità e rugosità. Le cellule sottoposte a trattamenti con le dosi più alte appaiono necrotiche (dimensioni estremamente ridotte) e in quelle ancora vitali il nucleo è condensato. Sono presenti anche residui cellulari.

Le figure 4 e 5 mostrano gli effetti dell'estratto sulle linee cellulari HeLa e HepG2 (cellule adese); le cellule di controllo sono saldamente ancorate al substrato con orientamenti casuali. Nelle cellule HeLa (Fig. 4) trattate con $50\mu\text{g}/\text{ml}$ di estratto si può osservare l'inizio della formazioni di vacuoli estremamente piccoli, nonostante tali cellule rimangano adese al substrato. Nelle cellule trattate con $250\mu\text{g}/\text{ml}$ si assiste ad un aumento progressivo della vacuolizzazione intracellulare con parziale distacco dal substrato. L'aggiunta i $500\mu\text{g}/\text{ml}$ di estratto risulta tossica per le cellule che, dopo poche ore dal trattamento, risultano necrotiche e non più adese alla superficie di crescita.

Le cellule HepG2 (Fig. 5) pur essendo risultate, nelle conte vitali, meno sensibili ai trattamenti, nelle indagini al microscopio ottico risultano staccate dal substrato anche in seguito alla somministrazione delle concentrazioni più basse di estratto.

Effettuando le suddette analisi in periodi diversi dell'anno e nel corso delle diverse fasi fenologiche della pianta si è evidenziata una lieve variabilità dei risultati, nelle proprietà citotossiche e quindi nell'efficacia dell'estratto, anche in concomitanza con la fioritura della pianta.

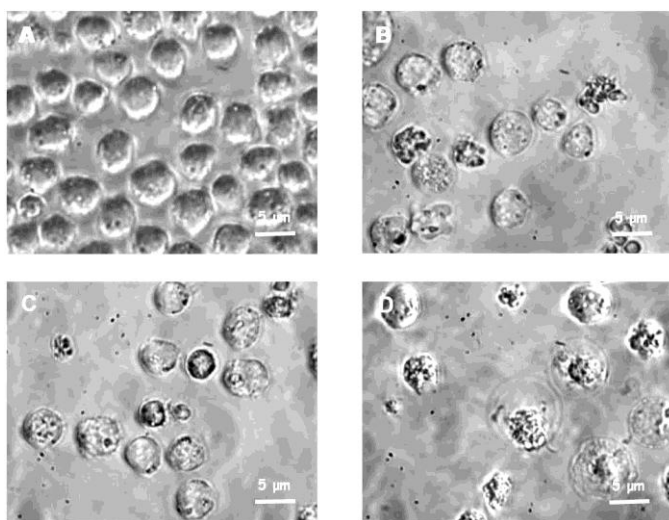


Figura 2 - HL60 trattate con estratto di *Rubus ulmifolius*; a) controllo; b) 50µg/ml; c) 250µg/ml; 500µg/ml; (barra 5µm)

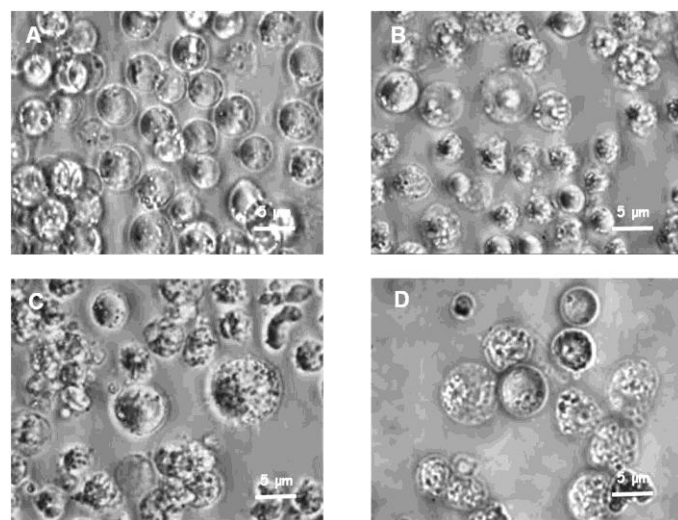


Figura 3 - HL60/MX2 trattate con estratto di *Rubus ulmifolius*; a) controllo; b) 50µg/ml; c) 250µg/ml; 500µg/ml; (barra 5µm)

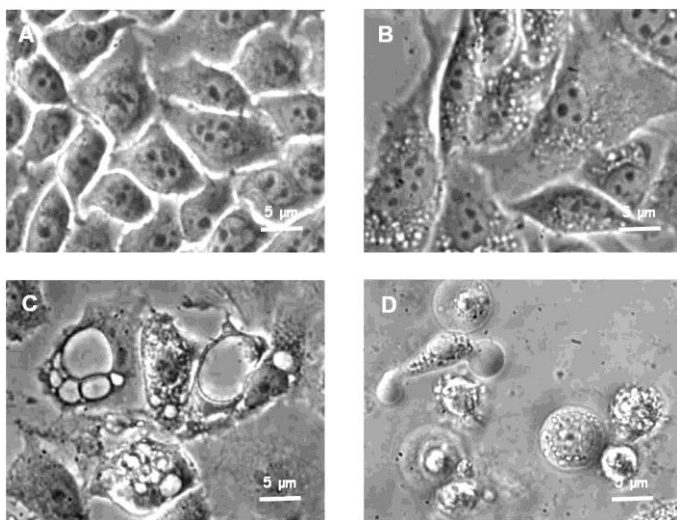


Figura 4 - HeLa trattate con estratto di *Rubus ulmifolius*; a) controllo; b) 50µg/ml; c) 250µg/ml; 500µg/ml; (barra 5µm)

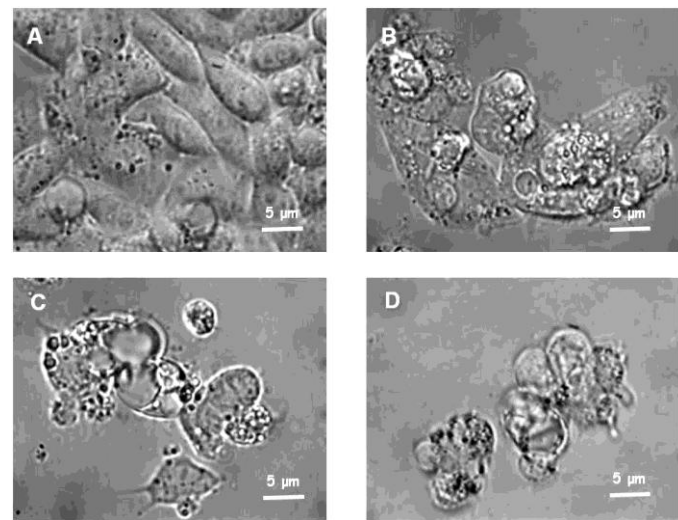


Figura 5 - HepG2 trattate con estratto di *Rubus ulmifolius*; a) controllo; b) 50µg/ml; c) 250µg/ml; 500µg/ml; (barra 5µm)

3.3 Valutazione degli effetti degli spots (TLC)

Allo scopo di individuare uno o più principi attivi responsabili dell'attività biologica dell'estratto, tutti gli spot contenuti nella TLC sono stati saggiati sulla linea cellulare HeLa.

Sono state seminate 50.000 cellule/pozzetto, in 1ml di DMEM e trattate il giorno successivo con le soluzioni derivanti da ciascuno degli spot rilevati nella lastrina.

Parallelamente lo stesso numero di cellule è stato trattato con il DMEM di controllo e l'estratto di Rovo (500µg/ml).

La somministrazione degli estratti è avvenuta una sola volta nel corso dell'esperimento e la conta cellulare è avvenuta dopo 20 ore dal trattamento.

In Figura 6 sono riportati i risultati dei trattamenti con i singoli spot confrontati con l'estratto fogliare. Gli spot 1, 2, 3, 4 e 5 risultano non avere alcun effetto rilevante sulle cellule, tanto che queste continuano regolarmente a dividersi e mostrano un andamento di poco inferiore rispetto al controllo e al controllo etanolo. Tra gli spot, come si ricava dal grafico (Fig. 6), quelli denominati "6", e "R" inducono rispettivamente un'inibizione del processo di crescita cellulare (spot 6) e un forte abbassamento del numero di cellule vive nel pozzetto (spot R) in confronto alle cellule non trattate.

Questo esperimento è stato condotto altre 4 volte operando sempre in doppio per essere certi dell'attendibilità dei dati ottenuti.

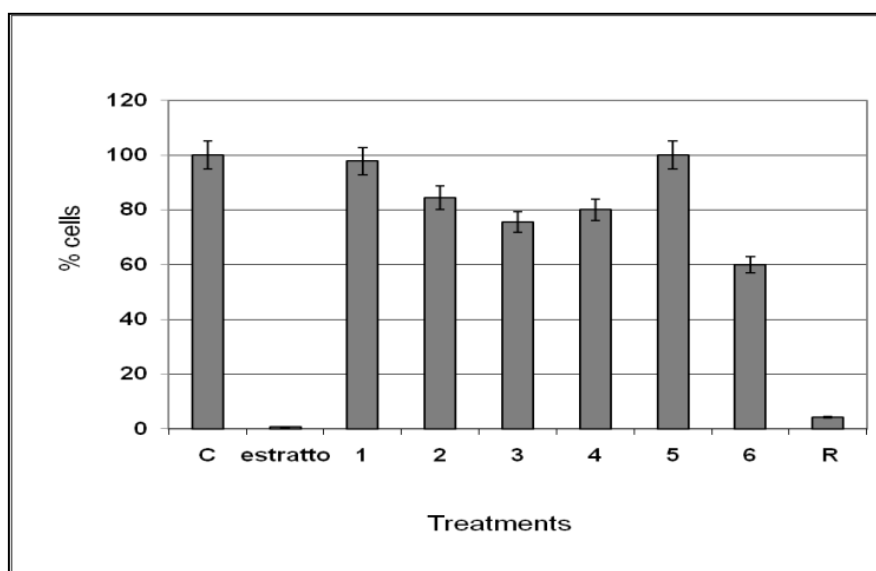


Figura 6 – conte vitali delle cellule HeLa trattate con 500µg/ml di estratto di *Rubus ulmifolius* e con gli spot ottenuti dalla TLC

3.4 Saggi MTT

Nonostante i numerosi tentativi di attuazione, i saggi MTT delle cellule trattate con l'estratto di Rofo non hanno dato risultati attendibili a causa della colorazione conferita dalle molecole contenute nell'estratto ai campioni che ha provocato delle interferenze nella lettura allo spettrofotometro.

3.5 Immunofluorescenza

L'osservazione delle cellule HeLa mediante immunofluorescenza ha permesso di visualizzare il potenziale tossico dell'estratto di Rofo sui microtubuli del citoscheletro. Immagini rappresentative sono riportate in Figura 7.

Nelle immagini ottenute mediante l'impiego di anticorpo anti α -tubulina si possono osservare le cellule HeLa di controllo durante interfase: i microtubuli formano una fitta rete di microtubuli intatti che si irradiano dalla zona perinucleare verso la periferia delle cellule lungo tutto il corpo cellulare (Fig. 7b). Sono visibili anche due coppie di cellule in citodieresi.

Dopo il trattamento con 250 µg/ml di estratto per 20 ore, le cellule, pur non mostrando una disorganizzazione significativa del citoscheletro, presentano addensamenti e fasci paralleli e

più compatti di microtubuli . Le immagini sono state messe a confronto con quelle rilevate attraverso la microscopia ottica al fine di evidenziare la presenza dei vacuoli.

Un significativo incremento relativo al segnale emesso dalla marcatura della proteina p53 si può osservare nelle cellule trattate con 100µg/ml di estratto (Fig. 8).

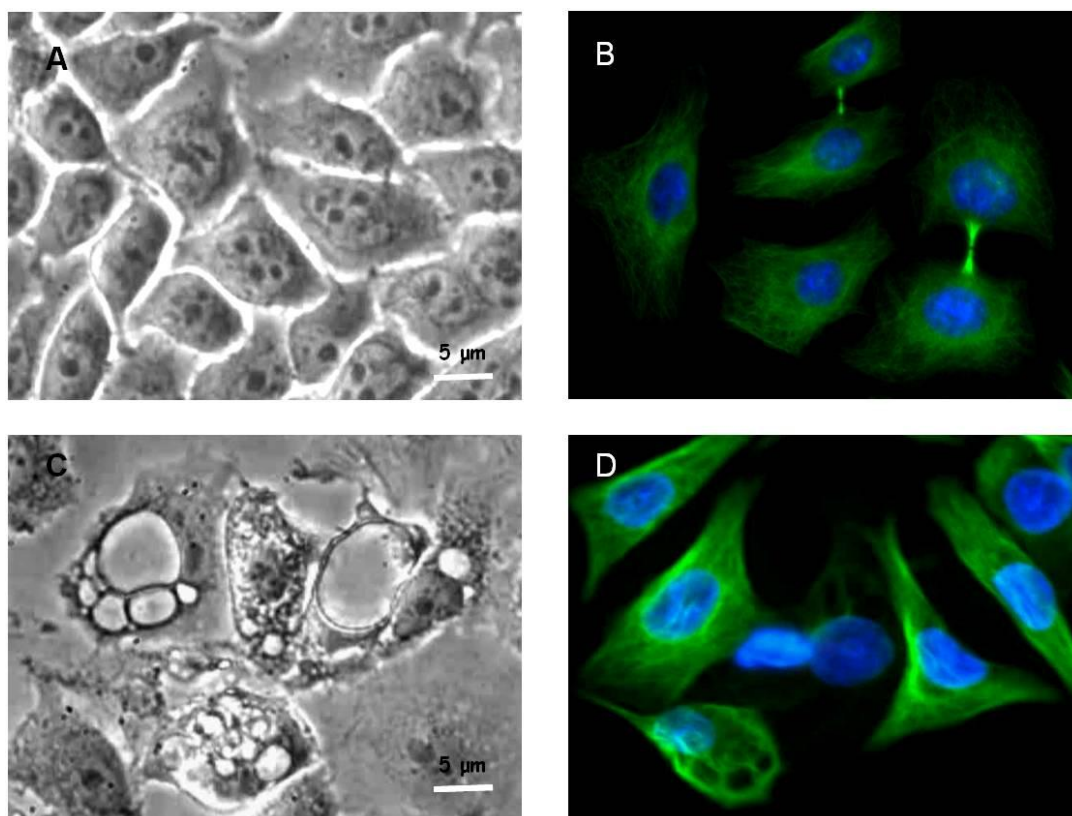


Figura 7 - HeLa trattate con 250µg/ml di estratto di *Rubus ulmifolius*; a) controllo (MO) b) trattato 250µg/ml (MO); c) controllo marcato con Ab anti-tubulina d)trattato 250µg/ml; (barra 5µm)

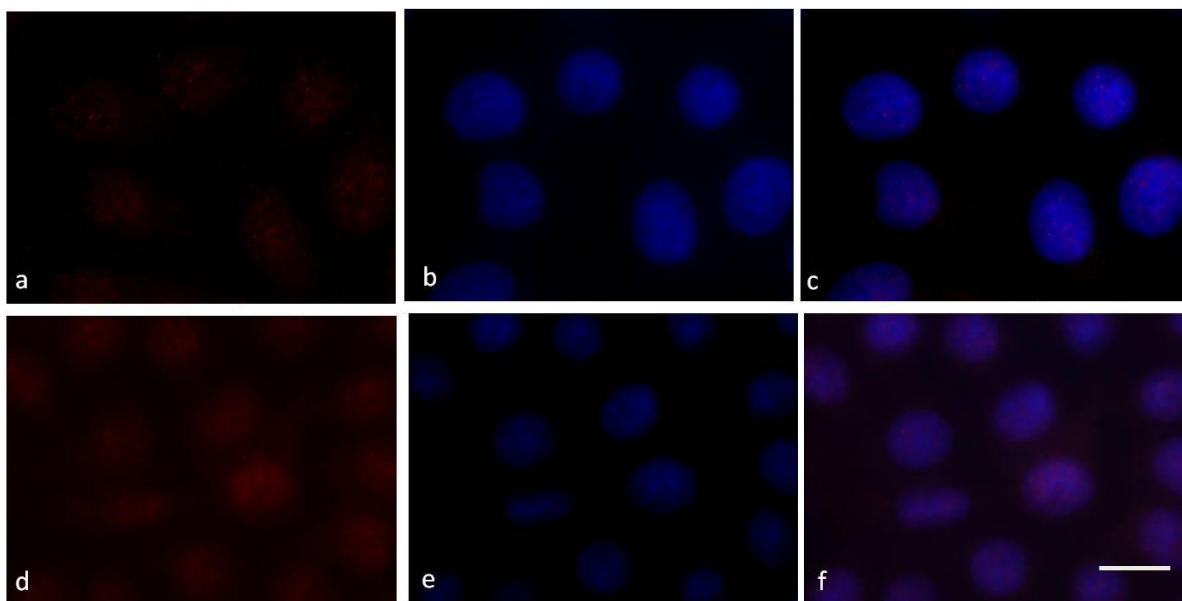


Figura 8 - HeLa marcate con Ab anti-p53 (rosso), DAPI (blu) e sovrapposizione; a) b) c) controllo; d) e) f) trattamento con 100µg/ml di estratto di *Rubus ulmifolius* (barra 5µm)

3.6 TLC e HPLC

Il cromatogramma HPLC dell'estratto in toto di *Rubus ulmifolius* è riportato in Figura 9.

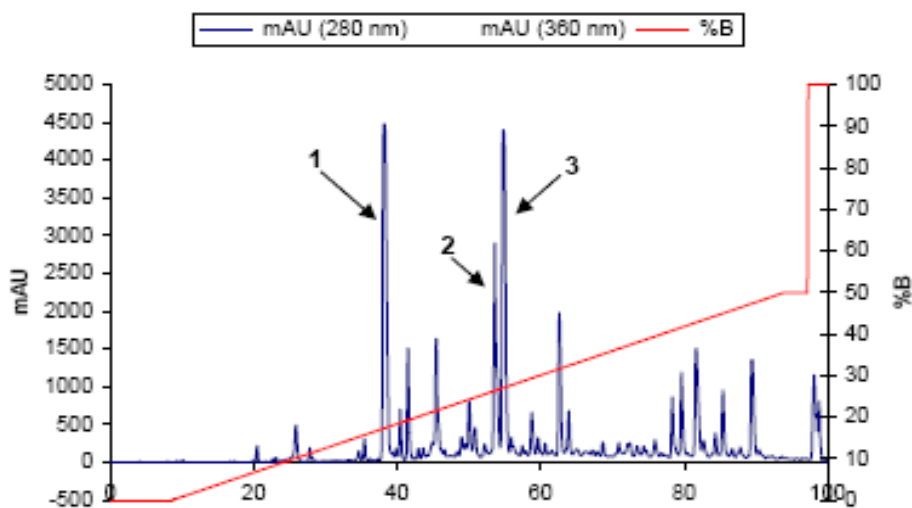


Figura 9 - Cromatogramma HPLC dell'estratto di *Rubus ulmifolius*

La TLC dell'estratto mostra 7 spot che sono stati indicati, dal basso verso l'alto, con le sigle R, 1, 2, 3, 4, 5, 6. Da R a 6 c'è un gradiente di polarità in quanto R è lo spot più polare,

incapace di solubilizzarsi e quindi di migrare con il solvente e avente quindi un valore di RF uguale a 0; 6 è lo spot più apolare avente valore di RF quasi coincidente col cammino percorso dalla fase mobile. Gli altri spot presentano valori di RF intermedi (Tabella 1)

La fluorescenza emessa da questi spot varia tra il verde e il giallo, ad eccezione dello spot R che ha un colore rosso intenso e dello spot 6 che è di colore arancione acceso. Inoltre gli spot R, 1 e 2 risultano adiacenti l'uno con l'altro, mentre lo spot 4 mostra una fluorescenza molto tenue non sempre visibile nelle varie TLC.

SPOT	RF
R	0
1	0.13
2	0.19
3	0.39
4	0.58
5	0.87
6	0.93

Tabella 1 – valori RF degli spot della TLC dell'estratto di *Rubus ulmifolius*

Sia lo spot 6 che lo spot R ottenuti dalla separazione per mezzo di TLC dell'estratto di foglie di *Rubus ulmifolius* sono stati sottoposti ad analisi cromatografica liquida ad alta pressione (HPLC).

Il cromatogramma dello spot 6 ha messo in evidenza al suo interno la presenza di un picco principale e due picchi di entità trascurabile (dato non mostrato).

Nel cromatogramma dello spot R, invece, si può osservare la presenza di tre picchi principali (Fig. 10) Questi ultimi sono evidenziabili anche nel cromatogramma dell'estratto di foglie.

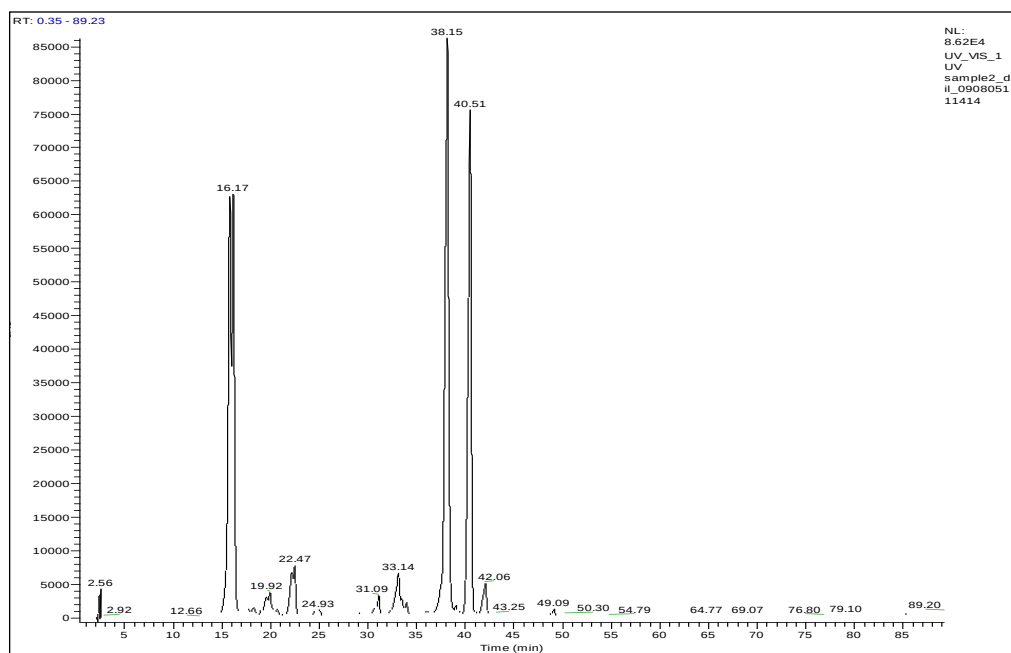


Figura 10 - Cromatogramma HPLC dello spot R

3.7 LC – Massa

3.7.1 Spot 6

L'analisi di spettrometria di massa (spettri non riportati) ha dato i seguenti risultati.

1 - Il campione contiene un composto in grande quantità che in electrospray presenta un peso molecolare di 594. La sua frammentazione porta a 3 pesi molecolari diversi:

- a) uno zucchero dal peso molecolare di 146;
- b) uno zucchero dal peso molecolare di 162;
- c) l'aglicone, con peso molecolare di 286 (corrispondente al peso molecolare della molecola denominata kamferolo).

Sono presenti tracce di altri due composti chimici:

2 - un peso molecolare di 685 contenente cloro: quando viene frammentato dà una molecola con peso molecolare di 487 e una molecola di 198 (zucchero);

3 - Un peso molecolare di 700 contenente cloro che frammentato dà una molecola con peso molecolare di 502 e una molecola di 198.

Il risultato dell'analisi di spettrometria di massa ha perciò confermato le prime indagini

cromatografiche effettuate tramite Hplc dal cui cromatogramma si evincevano 3 picchi dei quali uno molto più grande degli altri due.

3.7.2 Spot R

L'analisi di spettrometria di massa dello spot R ha dato i seguenti risultati.

- a)** Acido clolorogenico - RT: 16.10; m/z: 355 (Fig. 11).
- b)** Quercetina glucuronide - RT: 38.40; m/z: 479 (Fig. 12).
- c)** Kamferolo glucuronide - RT: 40.70; m/z: 463 (Fig.13).

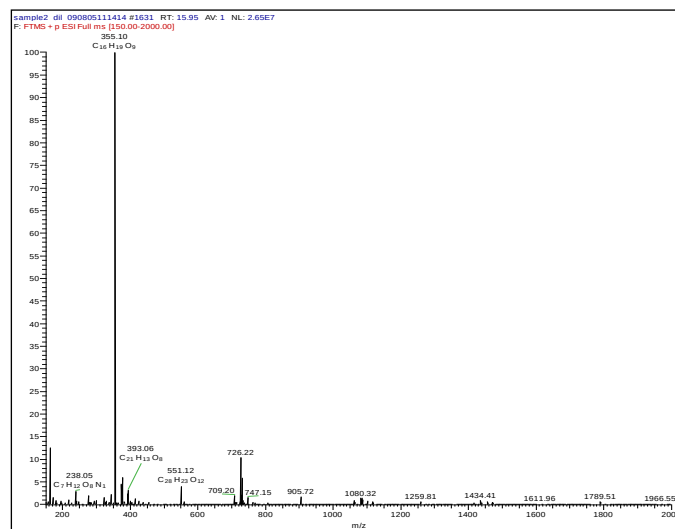


Figura 11 - Acido clorogenico

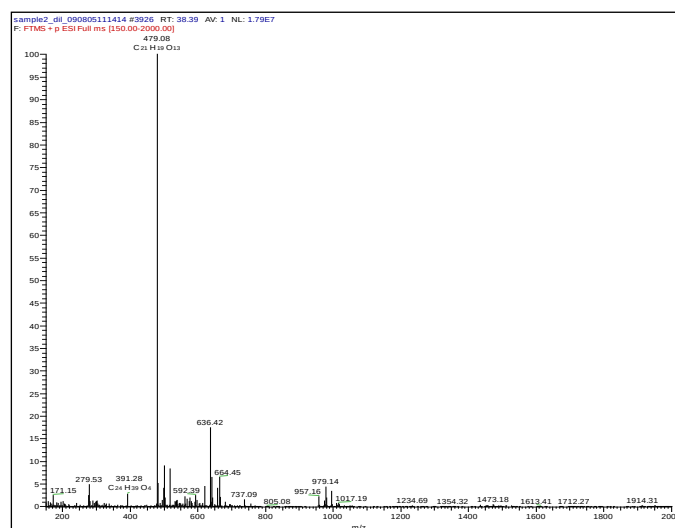


Figura 12 - Quercetina glucuronide

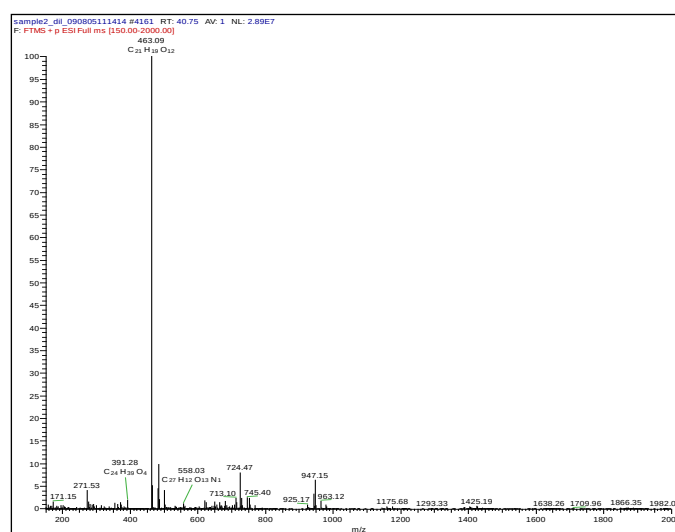


Figura 13 - Kamferolo glucuronide

4 DISCUSSIONE

Oggetto degli esperimenti condotti sono state le cellule appartenenti a 4 linee tumorali umane H160, H160/MX2, HepG2 e più approfonditamente HeLa (cancro della cervice uterina).

Le prime indagini condotte per mezzo del microscopio ottico hanno permesso infatti di appurare che le cellule trattate cambiano la loro morfologia a differenza di quanto avviene nelle cellule di controllo che mantengono inalterata la loro struttura. In particolare, le cellule trattate con l'estratto mostrano crescenti irregolarità (formazione di vacuoli, presenza di "blebs", irregolarità della membrana cellulare, modificazione della morfologia del nucleo, distacco dalla superficie nel caso di cellule adese) sia all'aumentare della concentrazione di estratto somministrato (50, 100, 250, 500 µg/ml) che del tempo trascorso dal trattamento. Inoltre dall'analisi delle curve di crescita ottenute elaborando le conte cellulari effettuate dopo 20 ore dal trattamento, si evince una precisa correlazione dose/effetto e più precisamente dose/tempo/effetto. Infatti, nelle cellule trattate con le dosi più basse di estratto si può osservare una graduale modificazione nella forma e nel volume cellulare che culmina, a 20 o a 48 ore (dati non mostrati) dal trattamento, con la morte della quasi totalità delle cellule, morte che si è ipotizzato avvenga per apoptosi o per autofagia. Questa ipotesi è infatti avvalorata da alcune osservazioni preliminari effettuate mediante immunofluorescenza e che hanno evidenziato un aumento dell'espressione della proteina p53; inoltre è stata osservata un'elevata vacuolizzazione intracellulare in seguito all'incubazione con l'estratto, caratteristica, quest'ultima, tipica della morte cellulare per via autofagica.

Le cellule trattate invece con 500 µg/ml presentano già dopo 4 ore un evidente stato necrotico indice, probabilmente, dell'elevata tossicità dell'estratto quando somministrato a dosi elevate. Tale ipotesi è stata confermata da studi precedenti condotti su cellule appartenenti alla linea 3T3 (fibroblasti di topo appartenenti al ceppo BALB/c - non tumorale) in seguito alla somministrazione dell'estratto di Rovo: in questo caso infatti, l'aggiunta di estratto pari 50 o 100 µg/ml non è risultata tossica per le cellule; viceversa, la somministrazione di dosi più elevate di estratto ha avuto sulle cellule 3T3 un chiaro effetto tossico che si è risolto con la necrosi cellulare ed un conseguente decremento del numero di cellule trattate rispetto alle cellule di controllo. Da questo confronto è possibile quindi ipotizzare che esista una concentrazione critica al di sopra del quale le cellule trattate subirebbero un "avvelenamento"

andando incontro ad un processo di necrosi primaria. Queste analisi preliminari sono state eseguite prima mediante osservazione al microscopio ottico e poi, attraverso delle conte cellulari effettuate utilizzando una camera contaglobuli di Thoma-Zeiss. Allo scopo di rendere più oggettivi i risultati, sono stati condotti anche saggi di tossicità cellulare per mezzo di sali di tetrazolio (saggi MTT). Nonostante però i numerosi tentativi di attuazione, tali test non hanno dato risultati attendibili a causa della colorazione conferita dalle molecole contenute nell'estratto di Rovo ai campioni e che ha provocato interferenze nella lettura al colorimetro. A conferma di quanto osservato, uno studio effettuato sull'interferenza degli estratti di alcune piante con i dosaggi MTT (Bruggisser *et al.* 2002), riporta infatti che tale metodica, se applicata in esperimenti che coinvolgono determinate molecole naturali (ad esempio il kamferolo), può portare false valutazioni.

Ci si è quindi concentrati a) sull'analisi dell'attività antiproliferativa e b) sulla caratterizzazione della natura chimica dei principi attivi c) studi di immunofluorescenza per studiare le alterazioni citoscheletriche.

a) **Analisi dell'azione antiproliferativa** mostrata dagli estratti per verificare se fosse causata una o più frazioni piuttosto che all'estratto *in toto*.

Analisi condotte per mezzo di cromatografia su strato sottile hanno permesso di evidenziare tra tutti, uno spot, denominato "R", in cui sembra essere localizzata l'azione biologica.

Lo spot R, somministrato alle cellule appartenenti alla linea cellulare HeLa, già dopo poche ore dal trattamento, provoca dei cambiamenti evidenti nelle cellule, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo, comparabili a quelli dell'estratto. Infatti, il numero delle cellule vive si riduce progressivamente fino ad arrivare al 4,2 % rispetto al controllo dopo 20 ore dalla somministrazione.

b) **Caratterizzazione della natura chimica dei principi attivi.** Le analisi condotte per mezzo di cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) prima, e dalla spettrometria di massa poi, hanno permesso l'identificazione delle molecole che compongono lo spot "R".

Tale spot è composto da 3 molecole principali e, i risultati ottenuti dall'analisi di spettrometria di massa, comparati con i dati forniti da database molecolari (Shi Finder Scholar; Nist) e le informazioni presenti in bibliografia (Tzouwara-Karayanni *et al.* 1981,

Tzouwara-Karayanni *et al.* 1982, Panizzi *et al.* 2001), hanno permesso di identificare le sostanze contenute nello spot “R”: kamferolo glucuronide, quercetina glucuronide e acido clorogenico.

c) **Investigazioni preliminari di immunofluorescenza** mirate allo studio delle alterazioni citoscheletriche e dei cambiamenti nell'espressione della proteina p53, nelle cellule sottoposte a trattamento con estratto di foglie di *Rubus ulmifolius*.

Queste analisi hanno messo in evidenza che le cellule trattate con 50µg/ml di estratto (la concentrazione di estratto somministrato più bassa e ritenuta più significativa in questo studio) subiscono delle alterazioni a livello citoscheletrico, caratterizzate dalla presenza di microtubuli più spessi ed organizzati in fasci più densi.

La proteina p53 risulta inoltre maggiormente espressa nelle cellule trattate.

Entrambe le modificazioni possono essere messe in relazione con il meccanismo di morte cellulare di tipo apoptotico.

Presi nel loro insieme i risultati mostrano quindi che nelle foglie di *Rubus ulmifolius* sono presenti molecole aventi attività antiproliferativa sulle linee cellulari tumorali umane analizzate; conseguentemente, partendo da questi dati, dovranno essere condotti ulteriori studi.

Si possono al momento però fare delle considerazioni rapportando quanto osservato nel presente studio con quanto presente nella letteratura scientifica sugli agliconi (kamferolo e quercetina) delle molecole identificate contenute nello spot “R”.

Il kamferolo, ad esempio, è una molecola studiata da tempo (Takanashi *et al.* 1983), il suo effetto antiproliferativo è ben noto (Lee *et al.* 1998, Mutoh *et al.* 2000, Hung. 2003, Chen *et al.* 2004) e proprio gli ampi studi condotti, hanno permesso di considerare questa molecola come possibile principio attivo di vari tipi di farmaci (Roth *et al.* 1999). Il kamferolo puro è facilmente reperibile sul mercato dei prodotti chimici (Sigma, Fluka, Aldrich, ecc.). Il suo effetto, così come quello della quercetina, non è comparabile a quello delle corrispondenti molecole glicosilate.

Sui due flavonoidi glicosilati individuati, e soprattutto sulla loro azione biologica, invece, in letteratura esistono pochi studi. Inoltre, queste due molecole, che rappresentano i flavonoidi più abbondanti nel *Rubus ulmifolius* (Panizzi *et al.* 2001), non sono reperibili facilmente

presso le aziende specializzate nella produzione di sostanze chimiche di origine naturale e la loro purificazione richiede tempi e procedure molto lunghe.

Attualmente gli studi stanno procedendo allo scopo di verificare se, quanto qui mostrato, possa costituire una base per un ipotetico prodotto farmacologico con funzioni antitumorali.

CAPITOLO II

1 INTRODUZIONE

Considerando la struttura chimica dei composti attivi individuati nell'estratto di *Rubus ulmifolius* ed avendo osservato una loro analogia strutturale con i farmaci in grado di inibire l'attività dell'enzima acetilcolinesterasi, e per questo impiegati nel trattamento del Morbo di Alzheimer, si è deciso di effettuare dei saggi enzimatici allo scopo di verificare l'eventuale attività anticolinesterasica dell'estratto *in toto* e dei composti in esso contenuti.

La acetilcolinesterasi (Fig. 1) è un enzima appartenente alla classe delle idrolasi, normalmente presente nell'organismo dei mammiferi e localizzato nella membrana post-sinaptica delle giunzioni colinergiche, che idrolizza l'acetilcolina ad acido acetico e colina. Nel cervello l'acetilcolina è un neurotrasmettitore coinvolto nella comunicazione tra le cellule nervose. Ricerche condotte su alcune malattie neurodegenerative hanno dimostrato una carenza di acetilcolina nel cervello dei malati di Alzheimer (ipotesi colinergica). Si è quindi visto che l'inibizione dell'enzima AChE, può permettere il mantenimento di una più elevata concentrazione di tale molecola a livello sinaptico con conseguente miglioramento della comunicazione tra le cellule nervose (Holzgrave 2007).

1.1 L'enzima acetilcolinesterasi

Sono noti due distinti tipi di colinesterasi, l'acetilcolinesterasi (AChE) e la butirrilcolinesterasi (BChE). Entrambe sono costituite da subunità catalitiche globulari, che costituiscono le forme solubili presenti a livello plasmatico e nel fluido cerebrospinale. In altri siti, le subunità catalitiche sono legate ai glicolipidi o a gruppi simili al collagene, attraverso i quali esse sono ancorate alla membrana cellulare o alla membrana basale (Silman 1988).

In particolare, l'AChE è legata alla membrana basale nello spazio sinaptico delle sinapsi colinergiche, dove la sua funzione consiste nell'idrolizzare il trasmettitore liberato (Fig. 2). La forma solubile dell'acetilcolinesterasi è presente all'interno delle terminazioni colinergiche, dove sembra avere un ruolo nella regolazione della concentrazione di acetilcolina libera, e dalle quali può essere rilasciata.

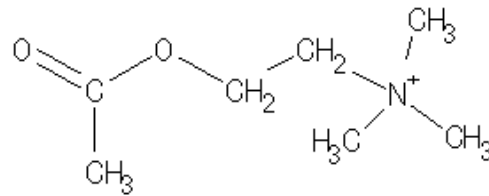
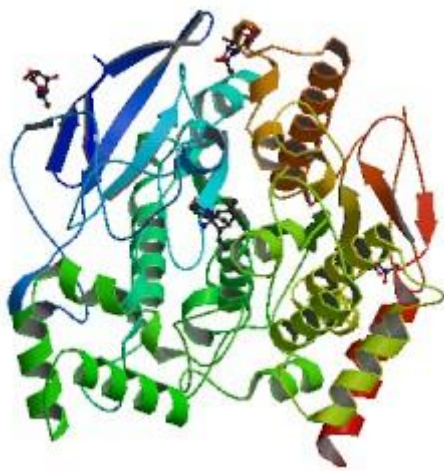


Figura 1 – Struttura acetilcolinesterasi ed acetilcolina
(www.molecularstructure.org)

L'azione molto breve dell'acetilcolina somministrata per via endovenosa deriva dalla sua rapida idrolisi a livello plasmatico. Normalmente, l'attività dell'AChE e della BChE mantiene l'ACh plasmatica a livelli molto bassi e pertanto l'ACh (a differenza della noradrenalina deve essere considerata rigorosamente un neurotrasmettitore e non un ormone).

Nei mammiferi, l'acetilcolinesterasi è un enzima codificato da un singolo gene AChE mentre alcuni invertebrati hanno geni multipli. Nei mammiferi infatti, la diversità dei prodotti trascritti dal gene unico è la conseguenza di uno splicing alternativo e delle diverse associazioni post-traduzionali delle subunità catalitiche e strutturali.

Ci sono tre forme conosciute: T, R e H (Massoulié 2008):

AChET - E' la principale forma di acetilcolinesterasi trovata nel cervello, muscoli e in altri tessuti, come è noto è una specie idrofila, che forma oligomeri legati attraverso ponti disolfuro con collagene o lipidi. Nelle giunzioni neuromuscolari AChE si esprime in forma asimmetrica associandosi con ColQ (collagene). Nel sistema nervoso centrale è associato con PRiMA (Proline Rich Membrane Anchor) formando una struttura simmetrica. In entrambi i casi, il ColQ o PRiMA servono a garantire la presenza dell'enzima a livello della giunzione intercellulare, ColQ per la giunzione neuromuscolare e PRiMA di sinapsi.

AChEH - Questa forma, derivante da uno splicing alternativo, è espressa principalmente nel tessuto eritroide, differisce a livello C-terminale e si associa con le membrane attraverso il fosfoinositide (PI) la cui aggiunta è post-traduzionale ("Entrez Gene: ACHE acetylcholinesterase (Yt blood group)").

AcheR - Il terzo tipo finora è stato trovato solo in *Torpedo* sp e nei topi, anche se se ne ipotizza la presenza anche in altre specie. Si ritiene possa essere coinvolto nei meccanismi di risposta allo stress e ai processi infiammatori (Dori 2007).

1.2 Acetilcolina

L'acetilcolina è un neurotrasmettitore che ha la funzione di trasferire gli impulsi nervosi in molteplici punti del sistema nervoso centrale e periferico (Fig. 1). I neuroni che secernono acetilcolina vengono definiti colinergici; analogo discorso per i suoi recettori, che vengono distinti in recettori nicotinici e muscarinici. La diversa concentrazione e conformazione chimica di questi recettori, e delle relative isoforme nei tessuti, fa sì che i vari farmaci che interferiscono con l'azione dell'acetilcolina, possano produrre effetti circoscritti prevalentemente ad un settore piuttosto che ad un altro. Nonostante questa diversità strutturale, l'acetilcolina è in grado di legarsi ad entrambi i recettori, poiché diversa è la parte di molecola che interagisce con i recettori muscarinici rispetto ai nicotinici. Questo è uno dei motivi per cui l'acetilcolina non viene utilizzata direttamente a fini terapeutici: visto che

agisce su tutti i recettori colinergici dell'organismo (sia muscarinici che nicotinici) la sua azione è troppo diffusa e poco specifica.

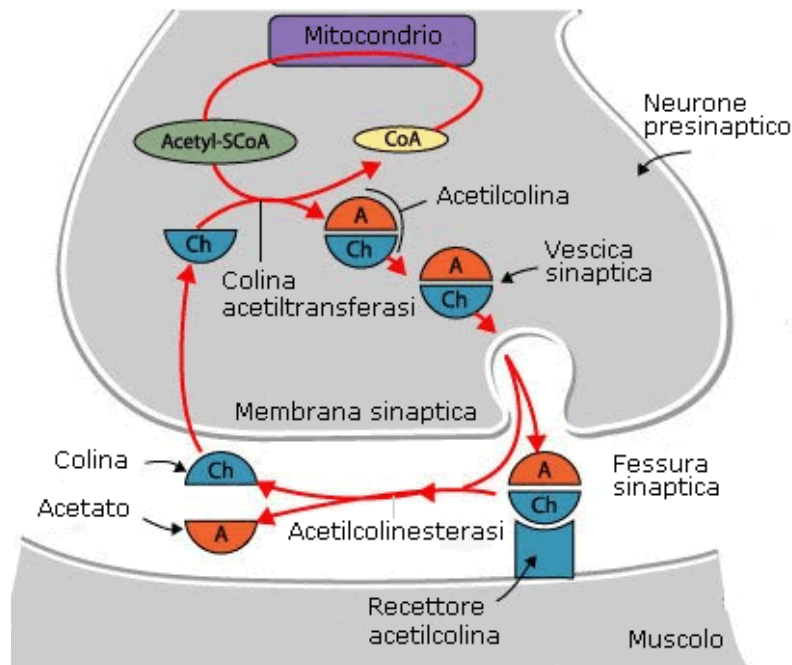


Figura 2 – meccanismo di azione dell'enzima acetilcolinesterasi acetilcolina a livello sinaptico;
<http://brainstormers.files.wordpress.com/2009/08/acetylcholinesterase.jpg>

L'acetilcolina è stata il primo neurotrasmettitore ad essere scoperto, grazie agli studi di Otto Loewi coronati nel 1924. Dal punto di vista chimico, l'acetilcolina è formata dall'unione di una molecola di colina con una di acetil-coenzima A (acetil-CoA); la prima è una piccola molecola concentrata nelle membrane fosfolipidiche, mentre l'Acetil-CoA rappresenta l'intermedio metabolico tra glicolisi e ciclo di Krebs. La sintesi di acetilcolina a partire da queste due sostanze avviene lungo il terminale assonale; subito dopo essere stata sintetizzata, viene quindi immagazzinata in vescicole, che al sopraggiungere di un impulso nervoso si legano alla membrana presinaptica, fondendosi e liberando per esocitosi il proprio contenuto. A questo punto l'acetilcolina rilasciata nella fessura sinaptica è libera di raggiungere i recettori postsinaptici e di interagire con essi, depolarizzando la cellula e dando il via alla formazione di un potenziale d'azione nella fibra nervosa o nella fibra muscolare che ha stimolato; subito dopo questa interazione, buona parte dell'acetilcolina viene immediatamente degradata

dall'acetilcolinesterasi (ACHE). Si tratta di un enzima collocato in prossimità dei recettori colinergici, dove agisce rompendo il legame tra acetato e colina; quest'ultima sostanza viene prontamente riassorbita dal terminale presinaptico e utilizzata per la sintesi di nuova acetilcolina (grazie all'enzima colina-acetiltransferasi). L'azione di questo enzima è molto importante, poiché consente di interrompere la trasmissione dell'impulso nervoso.

L'acetilcolina è il trasmettitore di tutti i nervi che controllano la muscolatura volontaria; tuttavia, nonostante a tale livello produca un effetto eccitatorio, nell'ambito del sistema parasimpatico espleta azioni prevalentemente inibitorie (la maggior parte dei neuroni simpatici secerne epinefrina, mentre la maggior parte dei neuroni parasimpatici secerne acetilcolina). Questa molecola provoca infatti un rallentamento della frequenza cardiaca, mentre stimola la secrezione delle ghiandole bronchiali, salivari, gastriche e pancreatiche, aumentando la peristalsi intestinale e in genere tutte le funzioni digestive. Oltre che a livello delle placche motrici dei muscoli scheletrici, e delle terminazioni post-gangliari del sistema nervoso parasimpatico, l'acetilcolina si può riscontrare a livello delle sinapsi tra fibre pre-gangliari e neuroni post-gangliari del sistema nervoso simpatico e parasimpatico, e della midollare del surrene, così come in alcune sinapsi del sistema nervoso centrale.

Effetti simili a quelli dell'acetilcolina possono essere prodotti da sostanze capaci di stimolare i recettori colinergici (parasimpaticomimetici) o di bloccare, ossia inibire, l'azione della acetilcolinesterasi (anticolinesterasici)

1.3 Inibitori della colinesterasi

Gli inibitori della colinesterasi inoltre agiscono sia a livello centrale sia a livello periferico e presentano i seguenti effetti:

- Effetti sulle sinapsi colinergiche autonome: tali effetti riflettono essenzialmente l'aumento dell'attività colinergica in corrispondenza delle sinapsi postgangliari parasimpatiche (aumentata secrezione salivare, lacrimale, bronchiale e gastrointestinale; aumentata attività peristaltica; broncocostrizione; bradicardia e ipotensione; miosi; blocco dell'accomodazione nella visione da vicino; caduta della pressione intraoculare).

- Effetti sulla giunzione neuromuscolare: la risposta contrattile di un muscolo stimolato attraverso il proprio nervo motorio viene aumentata dagli anticolinesterasici. Normalmente, l'ACh viene idrolizzata così rapidamente che ogni stimolo dà inizio soltanto a un potenziale d'azione nella fibra muscolare. Quando la colinesterasi viene inibita, un singolo potenziale di placca dura più a lungo e produce una breve serie di potenziali nella fibra muscolare: questo risulta in una tensione maggiore.
- Effetti sul sistema nervoso centrale: i composti terziari, come la fisostigmina, e i composti organofosforici non polari attraversano liberamente la barriera emato-encefalica ed esercitano i loro effetti sul cervello. Il risultato è un'eccitazione iniziale, che può determinare anche convulsioni, seguita da una fase di depressione, che può essere accompagnata da incoscienza e inibizione della respirazione.

Alcuni esempi di farmaci anticolinesterasici che agiscono a livello periferico sono riportati in nella tabella sottostante e si dividono in tre principali gruppi, sulla base della natura della loro interazione col sito attivo, che ne determina la durata d'azione.

Farmaci anticolinesterasici		
Farmaco	Durata d'azione (B=breve; L=lunga; M=media)	Note
Edrofonio	B	Utilizzata nella diagnosi della miastenia grave
Neostigmina	M	Utilizzata per via i.v. per antagonizzare il blocco neuromuscolare competitivo. Somministrata per via orale nel trattamento della miastenia grave
Fisostigmina	M	Utilizzata in gocce oftalmiche per il trattamento del glaucoma
Piridostigmina	M	Somministrata per via orale nel trattamento della miastenia grave
Ecotiopato	L	Utilizzato in gocce oftalmiche nel trattamento del glaucoma
Parathion	L	Utilizzato come insetticida, ma causa frequenti avvelenamenti nell'uomo

Alcuni esempi di farmaci anticolinesterasici che agiscono a livello del Sistema Nervoso Centrale, utilizzati nel trattamento sintomatico del Morbo di Alzheimer (Tacrina, Donepezil, Rivastigmina, Galantamina, Memantina) sono riportati in Figura 3.

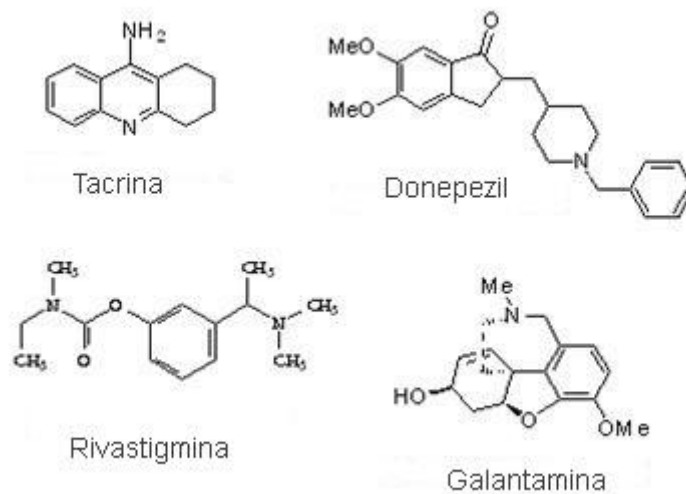


Figura 3 - farmaci anticolinesterasici

1.4 Morbo di Alzheimer

La malattia (o morbo) di Alzheimer (AD) deve questo nome al suo scopritore, il neurologo tedesco Alois Alzheimer, che nel 1906 identificò i sintomi di questa patologia cerebrale: fasci di grovigli neurofibrillari, placche senili (dovute alla precipitazione della proteina β -amiloide), perdita di neuroni e di sinapsi nelle regioni deputate alle funzioni cognitive ed una riduzione dei livelli centrali di neurotrasmettitori quali acetilcolina, noradrenalina e dopamina.

La diminuzione del numero di neurotrasmettitori per l'acetilcolina è la causa principale dei sintomi di questa malattia (Wenk 2006, Terry 2006), che comporta perdita di memoria, progressiva incapacità di imparare nuovi concetti, diminuzione delle capacità percettive, incertezze nei ragionamenti che richiedono giudizio logico. La patologia peggiora nel tempo con l'aumento delle difficoltà nel riconoscere luoghi e persone anche care, perdita di memoria (amnesia) che crea situazioni di pericolo (perdersi per strada, lasciare il gas acceso, ecc.), disturbi del linguaggio (afasia) e disturbi comportamentali (agitazione, aggressività, apatia). In una fase più avanzata compaiono difficoltà nel camminare, rigidità degli arti, incontinenza, spesso mutismo.

La malattia di Alzheimer è la causa più comune di decadimento cognitivo, con rilevanti costi sociali ed economici. Il processo degenerativo che porta ad un progressivo diradamento delle

sinapsi, al loro mancato funzionamento per carenza di neurotrasmettitori (soprattutto acetilcolina) e, infine, ad uno sfoltimento neuronale, la rende progressiva e irreversibile. Per migliorare la funzione mentale dei pazienti sono stati fatti vari tentativi terapeutici.

Attualmente il trattamento del morbo di Alzheimer è solo sintomatico, con farmaci in grado di aumentare la sintesi e il rilascio dell'acetilcolina o attraverso l'inibizione dell'acetilcolinesterasi, l'enzima responsabile della degradazione intrasynaptica dell'acetilcolina, o stimolando i recettori colinergici, con l'effetto di aumentare i livelli cerebrali del neurotrasmettitore acetilcolina, e farmaci capaci di inibire l'aggregazione della β -amiloide (Nippon 2007).

Gli inibitori dell'acetilcolinesterasi (AChE-I) attualmente impiegati (Tacrina, Donepezil, Rivastigmina, Galantamina) aumentano effettivamente, ma reversibilmente, i livelli centrali di acetilcolina (ACh) che compensa i deficit cognitivi e determina un temporaneo miglioramento della qualità della vita del malato (Nordberg 1998, Porcelli *et al.* 1999, Goh *et al.* 2010). Non sono tuttavia in grado di arrestare il , progredire della malattia e la loro efficacia si riduce con il progredire della stessa.

Il profilo di tollerabilità degli inibitori della acetilcolinesterasi inoltre presenta molti aspetti negativi (Inglis 2002). Come nel caso di molti altri farmaci, gli effetti indesiderati hanno una incidenza maggiore ai dosaggi più elevati e sono più accentuati se la posologia viene aumentata rapidamente. I più frequenti, a carico dell'apparato gastrointestinale, sono nausea, vomito, diarrea, dolori addominali, dispepsia e anoressia. Altri effetti indesiderati segnalati sono stati vertigini, cefalea e perdita di peso. La Tacrina è anche epatotossica. Questo è il motivo per il quale alcune ricerche sono dirette all'individuazione di farmaci di origine naturale in grado di inibire l'attività colinesterasica limitando però gli effetti indesiderati.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Saggio enzimatico

L'attività dell'enzima è stata misurata con il metodo di Ellman usando acetiltiocolina come substrato. L'enzima acetilcolinesterasi idrolizza l'acetiltiocolina e produce tiocolina e acetato. La tiocolina riduce il reattivo DTNB e il gruppo -SH della tiocolina dà una reazione colorata reagendo con ditio-bis-benzoato liberato.

Le densità ottiche sono state misurate allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 412 nm ed i campioni, fino al momento della lettura, mantenuti al buio e alla temperatura di 25 °C.

La reazione enzimatica è stata quantificata contro un bianco non contenente il substrato.

Nel saggio è stata utilizzata una miscela di reazione così composta (volume finale pari a 500µl):

tampone fosfato 0.1M (pH 8.0)

contenente DTNB 0.01 M

acetilcolinesterasi 2unità/ml

acetiltiocolina 1-5mM

Il substrato è stato aggiunto al saggio nel momento della lettura allo spettrofotometro (tempo zero).

2.2 Inibizione dell'enzima

Per valutare l'inibizione dell'AChE da parte dell'estratto di *Rubus ulmifolius*, degli spot ottenuti dalla TLC e dei composti presenti nello spot attivo, l'enzima è stato incubato preventivamente con gli inibitori a differenti concentrazioni (riportate nelle tabelle) per 30 minuti a 25°C.

La variazione dell'attività enzimatica è stata poi valutata come sopra.

2.3 Calcolo della percentuale di inibizione.

La percentuale di inibizione è stata calcolata attraverso l' equazione [Kees Rodenburg, 2000]:

$$\%inibizione = 100 \times \left[1 - \left(\frac{v_I}{v_B} \right) \right]$$

dove:

- v_I = velocità di reazione con inibitore;
- v_B = velocità di reazione senza inibitore.

Le percentuali di inibizione per ogni inibitore, in funzione della concentrazione di inibitore sono riportati nella tabelle e nei grafici.

3 RISULTATI E DISCUSSIONI

Come mostrato in Tabella 1 e in Figura 4, l' AChE è stato inibito dall'estratto di *Rubus ulmifolius* in modo concentrazione-dipendente.

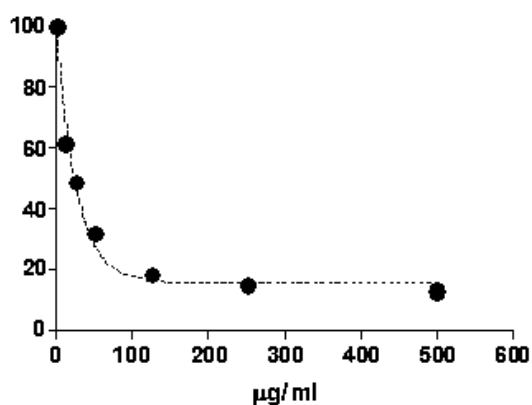


Figura 4 – Attività inibitoria dell'estratto di *Rubus ulmifolius* sull' AChE

Rovo (µg/ml)	% Attività AChE
12,5	60,0
25	47,7
50	31,4
125	18,0
250	14,4
500	12,9

Tabella 1 - % di attività residua dell'AChE in presenza di crescenti concentrazioni di estratto di Rovo

Tra tutti gli spot derivanti dall'estratto, due, lo spot "6" e lo spot o denominato R (il residuo della corsa cromatografica) hanno mostrato il più forte effetto inibitorio (Tabella 2; Fig. 5).

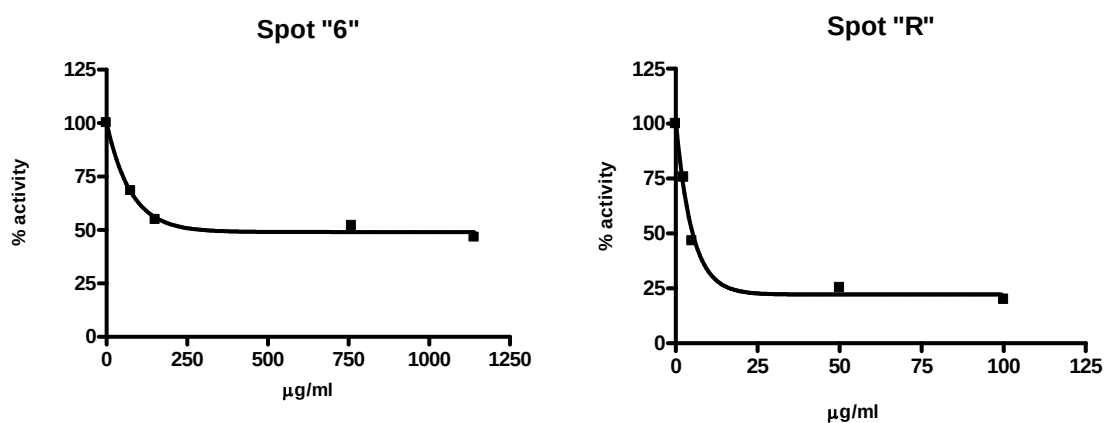


Figura 5 – Attività inibitoria degli spot "6" e "R" sull' AChE

Spot 6 ($\mu\text{g/ml}$)	% Attività AChE	Spot R ($\mu\text{g/ml}$)	% Attività AChE
75	68,3	2.5	75,5
150	54,9	5	46,5
760	52,0	50	25,2
1140	46,5	100	19,9

Tabella 2 - % di attività residua dell' AChE in presenza di concentrazioni crescenti di spot 6 e spot R ottenuti dalla TLC

Analizzando l'attività inibitoria dei composti individuati all'interno dello spot più attivo (quercetina glucuronide e kamferolo glucuronide; Tabella 3), la cui struttura è riportata in Figura 7, si può osservare che il massimo effetto inibitorio sull'attività dell'AChE è stata osservato con il kamferolo glicosilato (Fig. 6). I valori di IC₅₀ ottenuti per l'inibizione della quercetina glucuronide e del kamferolo glucuronide sono 20,3 μM e 11,6 μM rispettivamente (Tabella 4).

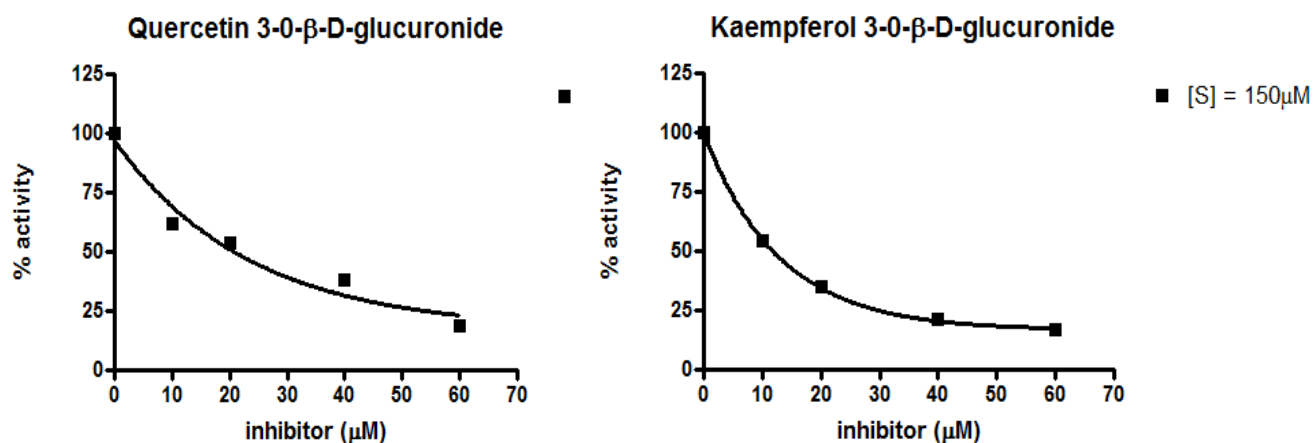


Figura 6 – Attività inibitoria dell'estratto di *Rubus ulmifolius* sull' AChE

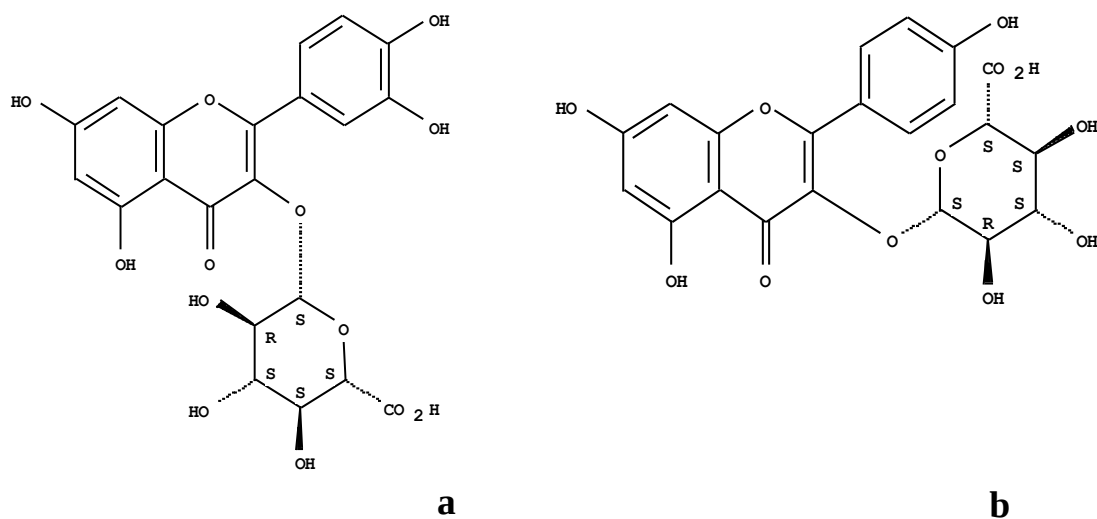


Figura 7 – a) quercetina 3-O-β-D glucuronide, b) kamferolo 3-O-β-D glucuronide

Quercetina glucuronide (μM)	% Attività AchE	Kamferolo glucuronide (μM)	% Attività AchE
10	61,9	10	54,5
20	53,7	20	34,8
40	38,3	40	21,5
60	18,6	60	16,7

Tabella 3 - % di attività residua dell'AchE in presenza dei composti isolati dallo spot R

INIBITORE	IC50
Rovo	15,5 μg/ml
Spot 6	250 μg/ml
Spot R	5,4 μg/ml
Quercetina glucuronide	20,3 μM
Kamferolo glucuronide	11,6 μM

Tabella 4 – IC50 degli inibitori saggiati sull'AchE

Da questi valori percentuali riportati nelle tabelle si può dedurre che, a parità di concentrazione di substrato, la percentuale di inibizione aumenta all'aumentare della concentrazione di inibitore utilizzato.

Gli inibitori dell' AChE di origine vegetale, possono essere importanti per lo sviluppo di nuovi farmaci.

I flavonoidi sono una delle classi di composti ampiamente presenti nelle fonti vegetali e spesso segnalati il per possesso di una grande varietà di attività biologiche utili per la salute umana. Tuttavia, è presente un numero relativamente basso di ricerche che confermano e conducono all'uso dei flavonoidi per la loro attività inibitoria sulla AChE (così come per la BChE), caratteristica che è la principale strategia per il trattamento dell' AD.

D'altra parte, i flavonoidi e le sostanze polifenoliche sono stati riconosciuti per avere una forte attività antiossidante, che è un indirettamente un vantaggio nel trattamento dell' AD (Perry 2001).

Il presente studio inoltre è coerente con alcune ricerche riportate in bibliografia nelle quali sono riportate le attività biologiche e inibitorie degli agliconi corrispondenti dei composti qui individuati (Orhan 2007); i risultati ottenuti però, ed in particolare quelli relativi all' inibizione da parte del kamferolo 3-O- β -D glucuronide, indicano che la presenza dello zucchero può rappresentare un elemento rilevante .

I dati qui riportati forniscono prove a dimostrazione dell'azione del rovo e di alcune molecole in esso contenute nell'inibire l'attività della AChE ma il meccanismo di azione ed il tipo di inibizione rimangono ancora poco chiari.

CAPITOLO III

1 INTRODUZIONE

I composti organostagno (OT) o alchilstagno sono composti xenobiotici introdotti nell'ambiente attraverso le attività umane soprattutto a causa del loro uso come agenti antivegetativi e anticrittogamici (Fent 2004, Fent 1996, Gadd 2000, Hoch 2001).

Si tratta di composti organici legati covalentemente ad un atomo di stagno tra i quali il dicloruro di dimetilstagno (DMT), il cloruro di trimetilstagno (TMT) e il bromuro di trietilstagno (TET) sono stati tra i composti organometallici più utilizzati nel settore agricolo e delle vernici.

Sebbene nel 2000 ne sia stato proibito l'utilizzo, l'impatto ambientale è ancora persistente, con ripercussioni sia nel mondo vegetale che animale (Fent 1996). Nell'ambiente, i composti alchilici polisostituiti come il TMT e il TET sono progressivamente dealchilati in specie meno sostituite e quindi meno tossiche. La speciazione di questi composti avviene attraverso meccanismi fisici e biologici, come adsorbimento/deadsorbimento, radiazioni UV, scissione chimica da acidi forti o da agenti elettrofili e degradazione biotica.

Nonostante l'energia di dissociazione relativamente elevata ($\sim 190\text{-}220 \text{ kJ / mol}$), la degradazione ambientale (speciazione) e la metabolizzazione dei composti OT da parte di organismi procarioti ed eucarioti sono molto comuni. Per esempio, il legame covalente Sn-C può essere scisso da attacchi chimici (elettrofili o nucleofili), radiazioni UV, e dealchilazione da parte di batteri (Buck-Koehntop *et al.* 2006).

È interessante notare che sia nei batteri e che nei mammiferi (uomo compreso) gli OT sono progressivamente dealchilati (Arakawa *et al.* 1981). Arakawa *et al.* (1981) hanno dimostrato che i composti tetra-organostagno vengono dealchilati progressivamente (Arakawa *et al.* 1981, Karpiak *et al.* 2001, Karpiak *et al.* 1999). Mentre diversi articoli descrivono i processi di speciazione di alcuni OT dovuti ad agenti fisici e chimici (Fent 2004, Gadd 2000, Hoch 2001, Diez *et al.* 2006, Gallert *et al.* 2002, Harino *et al.* 2007, Horiguchi *et al.* 2006, Mundy *et al.* 2006, Rudel *et al.* 2007, Voulvoulis *et al.* 2006, Wuertz *et al.* 1991, Zhai *et al.* 2008), i dati sull'interazione tra i composti organo-stagno ed i rispettivi bersagli biologici sono piuttosto scarsi. Alcuni studi hanno evidenziato le interazioni dei OT con l'emoglobina, la H^+ -ATPasi e il canale ionico del F-ATP sintasi (Von Ballmoos *et al.* 2004, Golin *et al.* 2003,

Golin *et al.* 2000, Hughes *et al.* 1996) tuttavia, non vi sono notizie sulle cause molecolari della speciazione degli OT *in vivo*.

Un interessante studio è stato condotto da Walsh e collaboratori alla fine degli anni '80 (Begley *et al.* 1986, Walsh *et al.* 1988, Walts *et al.* 1988). Questi autori hanno dimostrato che la liasi organo mercuriale presente nei batteri resistenti ai composti organomercurio è in grado di dealchilare diversi substrati organostagno ed hanno proposto un possibile meccanismo di degradazione enzimatica degli OT nell'ambiente (Walts *et al.* 1988). La reazione di dealchilazione, catalizzata dalla liasi organo mercuriale, coinvolge i tre residui di cisteina presenti nel sito attivo della liasi stessa che sono in grado di convertire i tetrametilstagno e i fluoruri di trimetilstagno nei corrispondenti derivati dimetilstagno con rilascio di metano (Walsh *et al.* 1988). I dialchilderivati si legano covalentemente all'enzima, formando un complesso irreversibile.

Recentemente, in collaborazione con il gruppo di ricerca del prof. Veglia, dell'Università del Minnesota, si è dimostrato che un peptide sintetico (SNN-PEP, I₁LGCWCYLR₉; Fig. 1b) derivato dalla sequenza primaria della stannina (SNN; Fig. 1a), una proteina di membrana mitocondriale, coinvolta nell'attività neurotossica del TMT nei mammiferi (Thompson *et al.* 1996, Figiel *et al.* 2002, Gunasekar *et al.* 2001) e contenente solo due residui vicinali di cisteina (motivo CXC), è in grado di dealchilare diversi composti trialchilstagno nei loro derivati dialchilici (Buck-Koehntop *et al.* 2006, Buck-Koehntop *et al.* 2003, Buck-Koehntop *et al.* 2004, Buck-Koehntop *et al.* 2005).

1.1 Tossicità dei composti organostagno

A differenza dei metalli pesanti e di altri composti organometallici, gli OT presentano un'elevata selettività, danneggiando aree specifiche del cervello (Philbert *et al.* 2000, Ogita *et al.* 2005, Shintani *et al.* 2007). Questa citotossicità specifica li rende potenziali farmaci antitumorali (Shintani 2007, Gielen 1995, Gielen *et al.* 1994, Gielen *et al.* 2000, Costa *et al.* 2009, Costa *et al.* 2006).

Esposizioni accidentali a OT negli esseri umani e test sui ratti hanno evidenziato gravi alterazioni del comportamento e, in alcuni casi, la morte (Boyer 1989, Feldman *et al.* 1993, Kreyberg *et al.* 1992, Hwang *et al.* 2009). Per gli esseri umani e i roditori, una singola esposizione al cloruro di trimetilstagno provoca la distruzione delle cellule nervose situate a livello ippocampale nella fascia dentata, mentre l'intossicazione da cloruro di trietilstagno

causa edema cerebrale, al midollo spinale, e danni al sistema nervoso periferico (Hwang 2009 *et al.* Aschner *et al.* 1992, Milaeva *et al.* 2004).

Anche se alcuni derivati organostagno hanno mostrato avere attività antiproliferativa e vengono considerati come possibili agenti antitumorali (Gielen 1994, Gielen *et al.* 2000, Di Stefano *et al.* 2002, Syng-ai *et al.* 2002), altri sono risultati citotossici, genotossici, mutageni (Florea *et al.* 2005, Dopp *et al.* 2007), e neurotossici.

A causa della loro lipofilità, i composti organostagno sono in grado di interagire con le membrane cellulari; in particolare il loro sito di azione è la membrana mitocondriale (Davidson *et al.* 2004). Nonostante sia noto il sito di interazione, la spiegazione esatta del meccanismo di tossicità rimane poco chiaro (Tobin *et al.* 1999).

La tossicità dei composti organostagno è direttamente correlata con il numero e la lunghezza dei gruppi alchilici legati allo stagno: i composti trialchilici con catene di carbonio corte sono i più tossici (Arakawa *et al.* 1981).

I composti organostagno come DMT, TMT e TET, aventi applicazioni differenti, mostrano anche diverse organo-tossicità.

Il DMT è usato come stabilizzatore nei tubi di cloruro di polivinile (PVC) e può contaminare le acque potabili (Braman e Tompkins 1979, Sadiki e Williams 1996). Studi sui ratti hanno messo in evidenza che il DMT può attraversare sia le pareti del tubo digerente che la placenta, dove si accumula nel sangue fetale e nel cervello (Noland *et al.* 1983). Il DMT sembra essere meno tossico *in vitro* e *in vivo*, se confrontato con gli altri composti organostagno trisostituiti (Mushak *et al.* 1982; Komulainen *et al.* 1987) e la sua ridotta tossicità potrebbe essere correlata alla minore idrofobicità con conseguente incapacità di attraversare velocemente la membrana plasmatica.

Il TMT, un organostagno neurotossico, provoca lesioni al sistema nervoso centrale e l'intossicazione provocata da tale composto è caratterizzata da convulsioni, iperattività e deficit della memoria (Dyer *et al.* 1982, Ruppert *et al.* 1982, Ishida *et al.* 1997). Alcuni studi mostrano che la perdita di neuroni piramidali della regione CA3 nel cervello di ratto si estende alla regione CA1 3 o 4 giorni dopo una singola somministrazione orale del TMT (Bouldin *et al.* 1981, Dyer *et al.* 1982, Chang e Dyer 1983, Robertson *et al.* 1987, Woodruff *et al.* 1988). L'esame istologico del tessuto nervoso dopo l'esposizione ha mostrato la presenza di

vacuoli autofagici nel citoplasma (Brown *et al.* 1984, O'Callaghan 1988, Nolan *et al.* 1990) suggerendo un possibile ruolo dei composti organostagno nel induzione di morte cellulare per autofagia.

Il trietilstagno (TET) ha effetti diversi *in vitro*, e la sua azione tossica nel sistema nervoso centrale dei roditori è stata descritta per la prima volta da Stoner e collaboratori nel 1955 (Stoner e Barnes *et al.* 1955). Il TET inoltre è in grado di interferire con la segnalazione del Ca^{2+} e potenziare il rilascio di norepinefrina nelle cellule PC12 (Viviani *et al.* 1995). Inoltre, nei ratti, inibisce l'adenosina trifosfatasi cardiaca ed il legame con le catecolamine (Cameron *et al.* 1991), interferisce con l'apertura dei canali anionici presenti nella membrana mitocondriale interna (Poteri e Beavis 1991), e con il trasporto del Ca^{2+} associato alla fosforilazione della proteina cAMP-dipendente nel reticolo sarcoplasmatico cardiaco (Kodavanti *al.* 1993). L'aumento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare può modificare la trasduzione del segnale in tali cellule (Brini e Carafoli 2000) portando alla morte cellulare per citotossicità e apoptosi (Duchen 2000). Quindi, l'effetto di trietilstagno sul Ca^{2+} potrebbe essere correlato alla sua attività citotossica.

Alla fine degli anni '90, Billingsley e collaboratori hanno scoperto una piccola proteina di membrana, la stannina (SNN, Fig. 1a), per lo più espressa a livello ippocampale e coinvolta nella tossicità selettiva e nell'apoptosi indotta dai composti organostagno (Toggas *et al.* 1992). Ulteriori analisi hanno rivelato che la SNN è espressa in diversi tessuti inclusi la linfa, i tessuti renale e nervoso (Dejneka *et al.* 1997).

Nelle cellule la stannina è espressa principalmente a livello mitocondriale (Davidson *et al.* 2004) e consiste di un'elica transmembrana, un dominio di collegamento non strutturato, e un dominio citoplasmatico. La regione transmembrana contiene un residuo conservato di cisteina (Cys32) che, in associazione con la Cys34 presente nel dominio non strutturato, costituisce il sito di legame del TMT (Buck-Koehntop *et al.* 2005). Il dominio citoplasmatico forma una spirale che viene parzialmente assorbita nel piano del doppio strato lipidico; esso interagisce con la superficie del doppio strato lipidico, e potrebbe contribuire all'avvio della cascata apoptotica in seguito al legame del composto OT al dominio linker. Alcune ricerche supportano il collegamento tra stannina e tossicità degli OT, ma non forniscono informazioni chiare sulla funzione fisiologica della stannina e sul suo meccanismo di azione nel momento

in cui le cellule entrano in contatto con composti organostagno. L'ipotesi fornita da studi precedenti è che i composti organostagno interagiscano direttamente con la stannina avviando una cascata di eventi che generano il danno cellulare e conseguentemente la morte.

D'altro canto è stato osservato che i composti organostagno (in particolare il trimetilstagno) interagiscono indirettamente con la stannina a livello genetico e ne modificano la trascrizione.

Per comprendere meglio la chimica dei composti organostagno e la loro interazione con i ditioli biologici, Veglia e collaboratori (Buck. *et al.* 2003) hanno sintetizzato un piccolo peptide (SNN-PEP, Fig. 1b), corrispondente agli aminoacidi 29-37 della stannina (ILGCWCYLR) e studiato il meccanismo di legame con differenti composti organostagno (Veglia 2000, Buck *et al.* 2004, Billingsley *et al.* 2006).

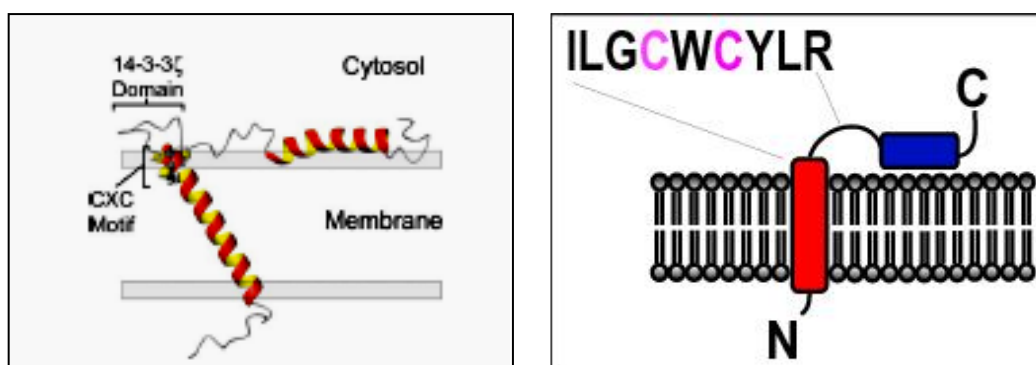


Figura 1 – a) Stannina nella membrana mitocondriale; b) Localizzazione della dell SNN-PEP

L'analisi di spettrometria di massa del peptide (SNN-PEP) in presenza di TMT ha mostrato che SNN-PEP non solo lega il TMT ma è anche in grado di anche dealchilarlo a dimetilstagno (DMT). Infatti, dopo che il gruppo metile è stato rimosso SNN-PEP rimane in associazione con il DMT con rapporto [1:1] (Buck *et al.* 2003).

Parte dell'attività di ricerca del Dottorato è stata dedicata allo studio della cinetica di dealchilazione dei composti OT da parte del peptide SNN-PEP, I¹LGCWCYLR⁹. In particolare si è studiata la cinetica di dealchilazione del tetrametilstagno ((CH₃)₄Sn) o

TetraMT e di due tra i più comuni composti organostagno trisostituiti, il cloruro di trimetilstagno ((CH₃)₃SnCl) o TMT e il cloruro di trietilstagno ((CH₃CH₂)₃SnCl) o TET, da parte del SNN-PEP. Per studiare la cinetica di dealchilazione di tali composti è stato messo a punto un metodo fluorimetrico che sfrutta la fluorescenza intrinseca del residuo di triptofano in posizione 5 del peptide derivato dalla stannina. L'analisi cinetica ha portato ad ipotizzare, per l'interpretazione del processo di dealchilazione, un meccanismo pseudo-enzimatico in accordo con quello ipotizzato da Walsh e collaboratori (Porcelli *et al.* 2009). Si è quindi definito che SNN-PEP dealchila gli OT polisostituiti in specie più tossiche che si legano al peptide.

Questi dati forniscono una nuova spiegazione riguardo l'attività biologica e gli effetti tossici ritardati degli OT polisostituiti.

2 MATERIALI E METODI

TetraMT, TMT e TET sono stati acquistati da Strem sostanze chimiche (Newburyport, MA). Tutti i prodotti chimici sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione.

2.1 *Preparazione del peptide*

SNN-PEP è stato sintetizzato presso l'Università del Minnesota, Minneapolis, MN.

SNN-PEP è stato sciolto in una soluzione acetonitrile/acqua 50:50 e purificato mediante HPLC a fase inversa, utilizzando una colonna Waters Delta Pak 15 C18 (Milford, MA), utilizzando un gradiente lineare di TFA 0,085% (acido trifluoroacetico) in CH₃CN (acetonitrile) e TFA 0,1% in H₂O (v / v). Le frazioni contenenti peptide puro sono state raccolte e il solvente residuo è stato rimosso mediante corrente di azoto gassoso. Il peptide è stato poi sciolto in 2 ml di H₂O bidistillata e liofilizzato. Il peso molecolare e la purezza del peptide sono stati valutati mediante spettrometria di massa a ionizzazione electrospray (ESI-MS).

2.2 *Spettroscopia di fluorescenza*

Le misure di fluorescenza “steady-state” sono state effettuate con uno spettrofluorimetro LS-55 (Perkin Elmer). La lunghezza d'onda di eccitazione è stata impostata per seguire la fluorescenza del triptofano a 295 nm e gli spettri di emissione sono stati registrati da 300 a 450 nm. Eccitando il campione a lunghezza d'onda superiori a 290 nm, l'assorbimento di tirosina è minimo e può essere trascurato. La cinetica di reazione è stata monitorata per 300 s e i valori di emissione registrati ad intervalli di tempo di 1,0 s per il TMT e il TET mentre per il tetraMT la durata dell'analisi è stata pari a 40 min con un intervallo di registrazione del segnale di 60 secondi.

2.3 Determinazione delle affinità di legame

Per gli studi di binding, SNN-PEP (circa 0,2 mM) è stato sciolto in tampone fosfato 20 mM (PBS) a pH 6,5. I composti OT sono stati sciolti in etanolo al 99% e aggiunti alla soluzione contenente il peptide partendo da una concentrazione iniziale di 1.0×10^{-5} M fino ad una concentrazione finale di 2.6×10^{-4} M. Per assicurare il completamento della reazione di dealchilazione e la misura delle costanti di dissociazione, i campioni sono stati incubati per circa 20 minuti a temperatura ambiente. Tutti gli spettri sono stati acquisiti in triplice copia e gli errori di calcolati in base alla media di tre misure. Il contributo alla fluorescenza dei componenti del tampone è stato sottratto dallo spettro del peptide.

2.4 Studio della cinetica di dealchilazione

Per effettuare gli studi cinetici, SNN-PEP (0,2 mM) è stato sciolto in una soluzione contenente 0,5 ml di tampone fosfato 20 mM a pH 6,5 e DTT $4,0 \times 10^{-5}$ M. La cinetica di dealchilazione è stata seguita attraverso il monitoraggio della variazione dell'intensità di fluorescenza alla lunghezza d'onda di emissione a 356 nm con eccitazione a 295 nm. Le reazioni di dealchilazione sono state effettuate utilizzando i composti OT in un intervallo di concentrazione compreso tra 1.0×10^{-6} e 1.1×10^{-5} M. Le costanti di velocità sono state determinate utilizzando il metodo delle velocità iniziali, e le costanti cinetiche sono state calcolate usando il grafico dei doppi reciproci. Le velocità iniziali, per ogni concentrazione di substrato, sono state misurate in triplicato e i valori utilizzati per il calcolo delle medie e per la stima degli errori. La presenza dei complessi peptide-dialchistagno alla fine della reazione è stata valutata mediante ESI-MS.

3 RISULTATI

3.1 Studio della cinetica di dealchilazione mediante spettroscopia di fluorescenza

La cinetica di dealchilazione è stata studiata misurando la fluorescenza intrinseca del Triptofano in posizione 5 del SNN-PEP mediante eccitazione selettiva a $\lambda = 295$ nm, evitando le possibili interferenze dovute alla presenza di tirosina (Lackowicz *et al.* 1999). Con il progredire della dealchilazione si è osservata una diminuzione della fluorescenza del Trp. Tale decadimento della fluorescenza può essere attribuito al trasferimento di carica intramolecolare (Cowgill 1967, Cowgill 1967, Ricci *et al.* 1976, Chang *et al.* 1983, Saito *et al.* 1984) (meccanismo interno), e/o all'interazione tra il gruppo indolico eccitato ed il solvente polare (Shizuka *et al.* 1988 (meccanismo esterno). Nel legare i composti OT, il peptide SNN-PEP subisce un cambiamento conformazionale passando da una conformazione non strutturata ad una struttura β -turn di tipo I. Questi cambiamenti conformazionali sono anche supportati da analisi di dicroismo circolare (Buck-Koehntop *et al.* 2003 Buck-Koehntop *et al.* 2004), e sono responsabili del progressivo decadimento della fluorescenza Trp. Infatti, come si vede dalla Figura 2A in cui è riportata la struttura NMR del peptide legato al DMT l'anello indolico del triptofano viene portato in prossimità dei gruppi alchilici del dialchilstagno (Fig. 2A). Ciò è confermato dalla presenza di due segnali NOE tra i gruppi metilici del composto organo stagno e l'anello indolico del Trp. La Figura 1B mostra la diminuzione dell'intensità degli spettri di fluorescenza del Trp5 all'aumentare della concentrazione di TMT.

La diminuzione della fluorescenza in funzione della concentrazione del composto organo stagno è stata utilizzata per determinare le costanti di dissociazione apparente (Figg. 2C e 2D). OT-SNN-PEP utilizzando la relazione: (Wada *et al.* 2003):

$$\Delta F_{obs} = \Delta F_{max} \frac{[S]}{K_d + [S]}$$

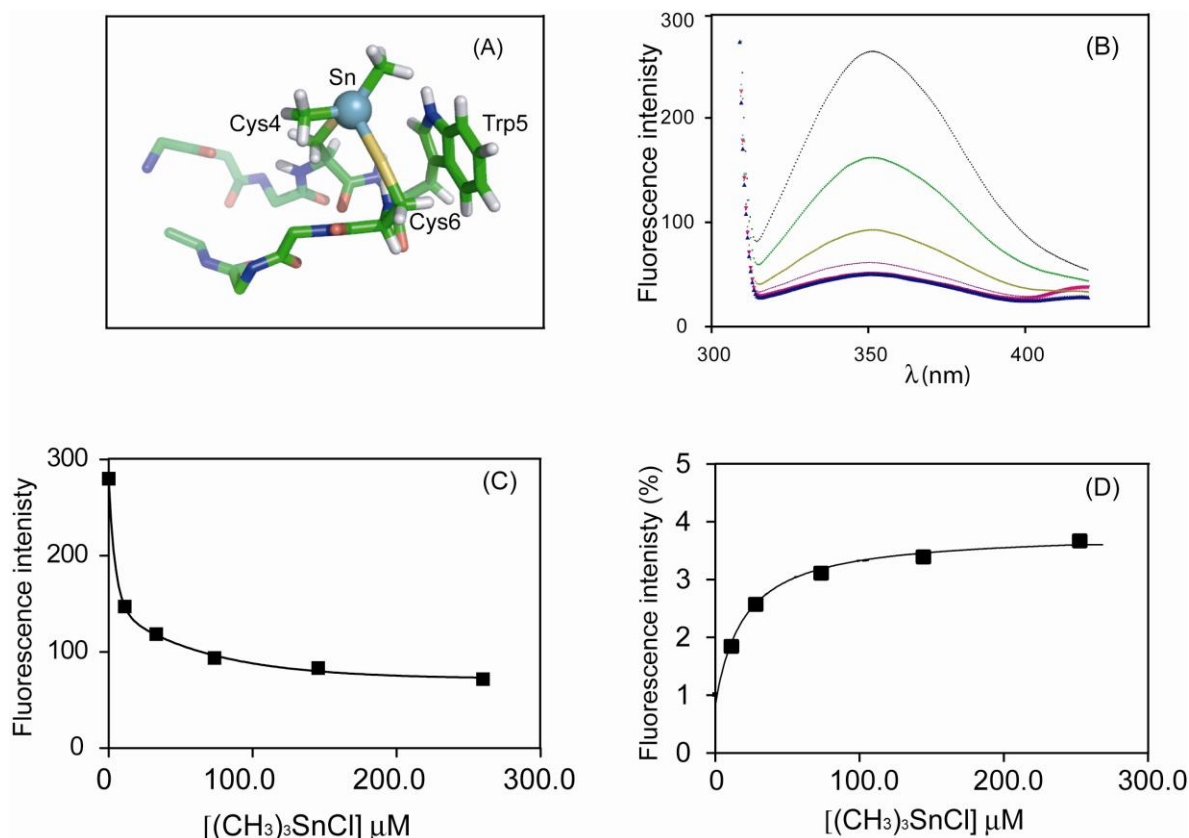


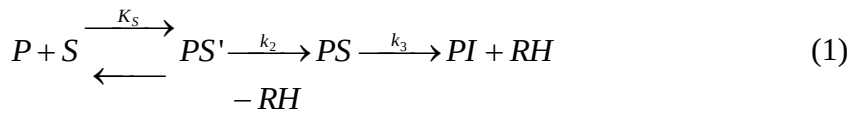
Figura 2 - Struttura NMR del complesso SNN-PEP/DMT. (B) Variazione dello spettro di fluorescenza intrinseca del triptofano conseguente al binding tra SNN-PEP e TMT ($\lambda_{ex} = 295$ nm) (C) curva di binding del TMT ($\lambda_{ex} = 295$ nm, $\lambda_{em} = 352$ nm) ottenuta da tre titolazioni indipendenti (le barre di errore sono più piccole della grandezza dei simboli) (D) variazioni dell'intensità di fluorescenza in funzione delle aggiunte di TMT espresse in percentuale

dove ΔF_{obs} è la variazione di intensità di fluorescenza, ΔF_{max} è la massima variazione di intensità di fluorescenza, $[S]$ è la concentrazione dei composti organostagno, e K_d la costante di dissociazione apparente (Figg. 2C e 2D). Le costanti di dissociazione apparente calcolate per TMT e TET sono, rispettivamente, $K_d = 22 \pm 5 \mu M$ e $K_d = 50 \pm 9 \mu M$. Questi valori sottolineano un'affinità leggermente superiore del SNN-PEP per TMT per rispetto a TET. Poichè che la curva di binding è stata ottenuta dopo il completamento della reazione di dealchilazione, i valori della K_d ottenuti sono in accordo con quelli ottenuti mediante spettroscopia di dicroismo circolare per il dicloruro di dimetilstagno e per il dicloruro di dietilstagno (Buck-Koehtop *et al.* 2003). L'andamento lento della cinetica di dealchilazione del tetraMT non ha permesso la determinazione del valore della costante di dissociazione apparente.

3.2 Modello cinetico

La diminuzione di intensità di fluorescenza nel tempo per il tetrametilstagno e i due organo stagno trisostituiti (TMT e TET) è riportato in Figura 3.

Per interpretare la cinetica di dealchilazione Buck-Koehtop e collaboratori (2004) hanno ipotizzato un meccanismo di reazione (1), utilizzando un modello cinetico che prevede uno stadio di pre-equilibrio e la formazione di uno stato di transizione, che evolve nella formazione del complesso SNN-PEP/dialchilstagno con liberazione di metano:



P rappresenta il peptide libero, S è il composto tetra-alchilstagno e PS' è il complesso SNN-PEP/tetra-alchilstagno, PS è il complesso SNN-PEP/trialchilstagno e PI è il complesso SNN-PEP/dialchilstagno. Se P, S e PS' sono in rapido equilibrio, definito dalla costante di dissociazione, K_S , la velocità della reazione, in queste condizioni, può essere espressa come:

$$v = d[PI] / dt = k_3 [PS] \quad (2)$$

La soluzione dell'equazione (2) è data da:

$$v = \frac{\left(\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \right) ([P_o] - [PI]) [S]}{\left(\frac{k_3}{k_2 + k_3} \right) K_S + [S]} = \frac{k_{cat} ([P_o] - [PI]) [S]}{K + [S]} \quad (3)$$

Dove $k_{cat} = \left(\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \right)$ e $K = \left(\frac{k_3}{k_2 + k_3} \right) K_S$ sono, rispettivamente, la costante

catalitica e la pseudo costante di Michaelis. Per il TMT e il TET la k_{cat} coincide con k_3 e K è uguale alla costante di Michaelis. La velocità massima (V_{max}) è uguale a

$k_3 \times ([P_o] - [PI])$ per il TMT e il TET e a $k_{cat} \times ([P_o] - [PI])$ per il TetraMT.

I dati sono stati ottenuti utilizzando l'equazione (3) ed i parametri cinetici sono stati ottenuti grafico con il metodo dei doppi reciproci ($1/v_o$ vs $1/[S]$) (Fig. 3). I valori dei parametri cinetici

ottenuti sono riportati nella Tabella 1. La stima di k_3 / K è stata ottenuta dalla costante di tempo del primo ordine seguendo la curva di reazione secondo il metodo di Wahl (Wahl 1994).

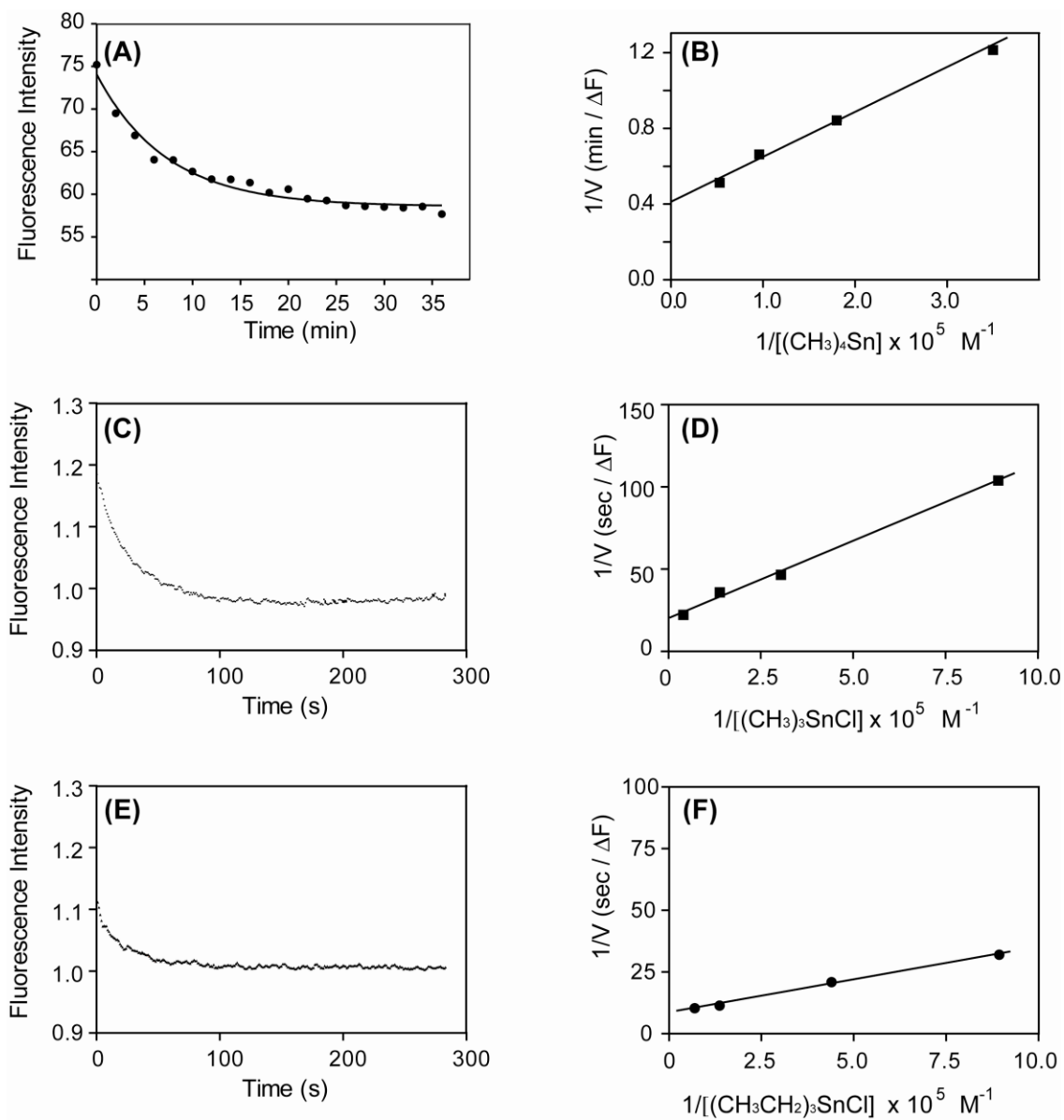


Figura 3 - Intensità di fluorescenza in seguito all'aggiunta di TetraMT(A), TMT (C), TET (D) e grafici dei doppi reciproci della velocità iniziale vs concentrazioni di Te-traMT (B), TMT (D) e TET (F). Le barre di errore sono più piccole dei punti.

Per il TetraMT (Fig. 2), la cinetica di reazione è risultata essere piuttosto lenta con una $V_{\max} = 2,4 \pm 0,6 \text{ I min}^{-1}$ (0.039 I/s) (dove I è l'intensità di fluorescenza in unità arbitrarie), una pseudo costante di Michaelis $K = 5.5 \pm 0.5 \mu\text{M}$, una $k_{\text{cat}} = 0.003 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$ ($6,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) e il rapporto (k_{cat}/K) = $0.00001 \pm 0,00001 \text{ (s}^{-1}/\mu\text{M}^{-1})$. Per il TMT, i risultati ottenuti sono stati i seguenti: $V_{\max} = 0,05 \pm 0,01 \text{ I s}^{-1}$, $K = 4,7 \pm 0,4 \mu\text{M}$, mentre per il TET $V_{\max} = 0.12 \pm 0.01 \text{ I s}^{-1}$, $K = 88,0 \pm 0,9 \mu\text{M}$. I valori delle (k_3) per gli step di dealchilazione sono stati, rispettivamente, $0,14 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$ e $0.11 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$ per TMT e TET. Il valore delle k_3 per entrambi i composti alchilstagno sono risultati molto simili indicando che, una volta che il peptide lega il composto trialchilico, la dealchilazione del metile e dell' etile avviene all'incirca alla stessa velocità. L'efficienza catalitica delle reazioni espressa come rapporto k_3/K è risultata $0,034 \pm 0,005 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ e $0,0013 \pm 0,001 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ per TMT e TET, mostrando quindi una preferenza del peptide per il TMT come conseguenza della maggiore affinità, misurata mediante K, tra questo composto organostagno e il peptide. La minore efficienza catalitica (k_3/K) per il TetraMT rispetto sia al TMT che al TET è probabilmente dovuta alla presenza di due passaggi di demetilazione invece di uno.

Tabella 2 - Parametri cinetici della dealchilazione del TetraMT, TMT e TET da parte del SNN-PEP.

	$K \text{ (mM)}$	$k_{\text{cat}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{\text{cat}}/K \text{ (s}^{-1}\text{mM}^{-1}\text{)}$
(CH₃)₄Sn	5.5 ± 0.5	0.00006 ± 0.00001	0.00001 ± 0.00001
(CH₃)₃Sn	4.7 ± 0.4	0.16 ± 0.04	0.036 ± 0.005
(CH₃CH₂)₃Sn	88.0 ± 4.0	0.12 ± 0.04	0.0013 ± 0.0001

4 DISCUSSIONE

Nell'ambiente, i composti organometallici polisostituiti, come i composti organomercurio, organopiombo e organostagno, sono soggetti a processi di degradazione o speciazione ad opera sia di fenomeni chimici che fisici (Fent 2004, Fent 1996). In particolare, è stato dimostrato che la rottura dei legami Hg-C, Pb-C, e Sn-C può essere catalizzata da agenti fisici o chimici. Tuttavia, la natura di tali eventi biochimici non è ancora del tutto chiarita. Walsh e collaboratori hanno ipotizzato che questi composti organometallici potrebbero subire un tipo di degradazione enzimatica (dealchilazione) analoga a quella del metilmercurio ed operata dalla liasi organomercuriale batterica (Merb) (Begley *et al.* 1986, Walsh *et al.* 1988). Il meccanismo di degradazione degli organostagno da parte di Merb coinvolge i tre residui di cisteina localizzati nel sito di legame dell'enzima che effettuano una scissione proteolitica di tipo S_E2 del legame Sn-C. Si ipotizza che enzimi simili a Merb potrebbero essere presenti anche in altri organismi microbici resistenti, e con elevata specificità per i composti organo stagno ma, ad oggi, non è stata individuata alcuna liasi specifica per i composti organo stagno.

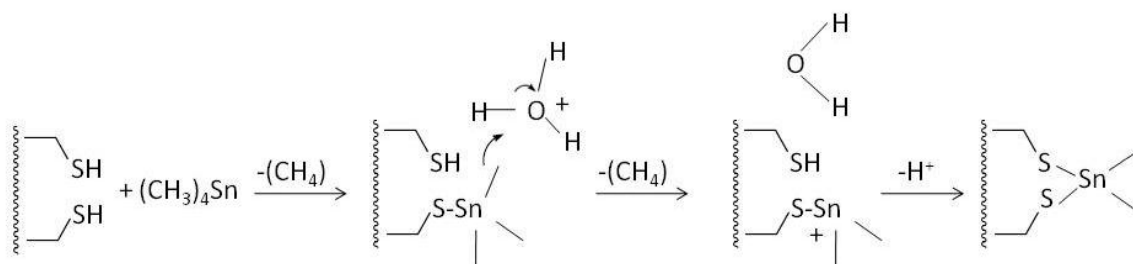
Inoltre, nonostante la dealchilazione degli OT sia stata rilevata nei mammiferi, compreso l'uomo (Arakawa *et al.* 1981), i meccanismi biochimici responsabili della loro tossicità non sono stati ancora completamente chiariti. A rendere più complessa la comprensione di tali processi è il fatto che differenti OT chimicamente simili (TMT e TET) hanno effetti tossicologici e pathways di biodegradazione notevolmente diversi (Mundy *et al.* 2006, Gunasekar *et al.* 2001, Dopp *et al.* 2007, Nakatsu *et al.* 2007, Dong *et al.* 2006, Ohhira *et al.* 2006, Cristofol *et al.* 2004, Seibert *et al.* 2004, Costa *et al.* 2001, Stridh *et al.* 2001, Stridh *et al.* 1999, Stridh *et al.* 1999).

Un'altra caratteristica atipica degli OT è la tossicità ritardata nel tempo (Arakawa *et al.* 1981). Questo ritardo è stato messo in correlazione sia con l'attivazione di vie apoptotiche che con la degradazione degli OT da forme con maggiori sostituzioni alchiliche a composti meno sostituiti in grado di svolgere la loro azione tossica. Infatti, a differenza di altri composti organometallici, gli OT innescano la morte cellulare per apoptosi piuttosto che per necrosi (Billingsley *et al.* 2006).

Alla fine degli anni '90, Billingsley e collaboratori hanno individuato una piccola proteina di membrana, la stannina, (SNN, da stannum latino, che significa stagno), coinvolta

selettivamente nella tossicità e nell'apoptosi indotta dai composti organostagno (Toggas *et al.* 1992). La stannina è espressa prevalentemente nell'ippocampo e contiene due cisteine vicinali (Cys-32 e Cys-34) che potrebbero costituire il sito di legame per il TMT (Toggas *et al.* 1992). Il peptide utilizzato in questo studio (SNN-PEP), corrispondente ai residui 29-37 della sequenza aminoacidica della SNN e contenente il motivo CXC (Buck-Koehtop *et al.* 2003, Buck-Koehtop *et al.* 2004) si lega preferenzialmente al TMT e al TET, mostrando una minore affinità per i composti organo stagno con catene alchiliche più lunghe.

In questo studio, analogamente al lavoro condotto da Walsh e collaboratori (Begley *et al.* 1986, Walsh *et al.* 1988), è stato verificato che le cisteine vicinali sono sufficienti per effettuare la reazione di dealchilazione ed il meccanismo di reazione può essere interpretato con una cinetica pseudo-enzimatica che termina con un complesso finale costituito dalla specie di alchilata legata covalentemente al SNN-PEP. Questo modello è in accordo con studi teorici precedenti effettuati sul peptide legato ad un composto dialchilstagno, suggerendo la possibile formazione di uno stato di transizione con proteolisi idrolitica di un legame Sn-C dopo l'aggiunta di uno o due gruppi tiolici (schema 1) (Buck-Koehtop *et al.* 2003, Buck-Koehtop *et al.* 2004).



Schema 1

Tali previsioni teoriche sono in accordo con gli studi cinetici effettuati, indicando che questo piccolo peptide lineare è in grado di dealchilare i composti OT polisostituiti attraverso il meccanismo pseudo enzimatico descritto. I dati cinetici mostrano una marcata differenza in termini di efficienza dealchilazione tra composti tetra e triorganostagno. Per il TMT e TET le costanti cinetiche k_3 sono molto simili, suggerendo che il gruppo alchilico non pregiudica il processo di dealchilazione, mentre le costanti K , riguardanti l'affinità di legame tra il peptide e gli OT sono notevolmente diverse. La fase di eliminazione (con produzione di metano o etano) procede all'incirca alla stessa velocità sia per il TMT che per il TET. E' quindi

plausibile che il legame del substrato rappresenti lo step determinante la velocità della reazione. Nel caso del TMT e del TET, il composto dialchilato forma un complesso irreversibile con il peptide. Il TetraMT invece è dealchilato progressivamente (in due step) dal SNN-PEP con una cinetica notevolmente più lenta. Questi dati sono in accordo con le conclusioni da Arawata e collaboratori, secondo i quali la ritardata tossicità degli OT polisostituiti è correlata con la progressiva degradazione di questi composti in analoghi meno sostituiti ma più attivo.

Questi risultati inoltre supportano l'ipotesi originaria di Arakawa secondo cui il TetraMT e il TMT essendo idrofobici, attraversano le membrane cellulari, interagiscono con i tioli vicinali, e sono poi dealchilati prima di formare un complesso covalente con SNN (o altri ditioli biologici) (Arakawa *et al.* 1981). La tossicità ritardata è quindi spiegata sulla base del processo di dealchilazione che deve avvenire prima della formazione del complesso SNN-dimetilstagno. La selettività verso il TMT è spiegata in termini di affinità di legame, piuttosto che intermini di fase di eliminazione (dealchilazione), che procede alla stessa velocità sia per il TMT che per il TET. Poiché il TMT provoca danni nel sistema nervoso centrale e il TET è invece specifico per il sistema nervoso periferico, è possibile ipotizzare che altre proteine contenenti ditioli possano legarsi al TET nel sistema nervoso periferico in modo più specifico.

In sintesi, questi risultati, nel loro complesso potrebbero spiegare il ritardo negli effetti tossici degli OT nei mammiferi ed il ruolo importante dei ditioli nelle vie di degradazione di questi composti xenobiotici.

.

CAPITOLO IV

1 INTRODUZIONE

Nel corso del presente Dottorato di ricerca è stata studiata l'attività biologica di diversi composti organostagno sulle linee cellulari HeLa (adenocarcinoma della cervice umana) ed NB2a (neuroblastoma di topo) sulle quali sono stati condotti saggi MTT e analisi morfologiche (microscopia ottica). I composti organostagno usati nei trattamenti sono stati i seguenti: cloruro di trifenilstagno (TPT), tetrametilstagno (4MT) ed in particolare dicloruro di dimetilstagno (DMT), cloruro di trimetilstagno (TMT), bromuro di trietilstagno (TET), alle concentrazioni comprese tra 1 e 100 μM .

Inoltre, per meglio comprendere la regolazione della stannina, proteina ancora poco studiata, e indagare sulla sua possibile sovraespressione in seguito al trattamento con concentrazioni crescenti di tre composti organostagno DMT, TMT e TET, sono state condotte osservazioni mediante immunofluorescenza usando come modello le suddette linee cellulari: HeLa e NB2a. E' stato anche valutato l'effetto del DMT, TMT e TET sulla struttura dei microtubuli citoscheletrici, a livello intracellulare, e sono state condotte indagini preliminari sull'espressione della proteina p53 allo scopo di individuare il tipo di morte cellulare indotta dai composti somministrati.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Composti OT

Le sostanze in esame, dicloruro di timetilstagno (DMT), cloruro di trimetilstagno (TMT) bromuro trietilstagno (TET), cloruro di trifenilstagno (TPT) e tetrametilstagno (4MT) sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich. DMT, TMT, TET, TPT e 4MT sono stati sciolti inizialmente in etanolo 100% per dare una soluzione 100 mM. Le soluzioni ottenute sono state poi diluite in DMEM per raggiungere concentrazioni finali di utilizzo. Le concentrazioni di DMT utilizzato nel trattamento le cellule sono state 1 μ M-1mM, le concentrazioni degli altri composti OT sono state 1 μ M-100 μ M .

2.2 Culture cellulari

Le cellule utilizzate appartengono alle linee cellulari HeLa (adenocarcinoma della cervice uterina umana) ed NB2a (neuroblastoma di topo). Entrambi i tipi cellulari sono costituiti da cellule che crescono adese in terreno di coltura Dulbecco's Modification of Minimum Essential Medium (DMEM), complementato con siero fetale bovino (FCS) al 10% , 100 UI / ml di penicillina e streptomicina e glutammina 2 mM; tali cellule crescono in incubatore a 37°C, iatmosfera contenente il 5% di CO₂ e sono coltivate in fiasche da 75 cm₂ contenenti 10 ml di medium, la cui sostituzione deve essere effettuata tre volte a settimana.

2.3 Saggio MTT

La citotossicità dei composti organostagno è stata valutata mediante test convenzionale di vitalità cellulare MTT. 50.000 cellule/ml sono state seminate in micropiastre da 96 pozzetti (100 μ l/pozzetto) e poi incubate a 37°C in atmosfera contenente anidride carbonica all 5%. Dopo 20 ore, il medium di coltura è stato rimosso e sostituito con un DMEM fresco contenente i composti da somministrare alle concentrazioni adeguate. Il saggio MTT è stato effettuato dopo 20 ore dal trattamento; 10 μ l di MTT [3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromuro (MTT), soluzione (5 g/L)] è stata aggiunta ad ogni pozzetto per

4 ore a 37 ° C. Successivamente i cristalli di formazano sono stati solubilizzati con 100 µl di DMSO. L'inibizione della crescita cellulare è stata rilevata misurando l'assorbanza di ciascun pozzetto a 595 nm utilizzando un lettore di micropiastra Sunrise TECAN.

2.4 Immunofluorescenza

Per effettuare gli studi di immunofluorescenza, sono state seminate 50.000 cellule/ml/pozzetto sui vetrini coprioggetto poste in piastre da 24 pozzetti. Dopo 20 ore il medium è stato rimosso, sostituito con terreno di coltura fresco contenente DMT, TET e TMT a diverse concentrazioni e lasciato ad incubare a 37 ° C per 20 ore. La procedura di preparazione delle cellule per l'immunofluorescenza è stata la seguente.

Le cellule sono state lavate tre volte con soluzione salina tampone (PBS), fissate con metanolo (Sigma-Aldrich; a -20 ° C) per 5 minuti, lavate tre volte con PBS e quindi permeabilizzate con acetone (Sigma-Aldrich; a -20 ° C) per 5 min.

Successivamente le cellule sono state incubate per 30 min con una soluzione all'1% di BSA in PBS per bloccare i siti di legame non specifici degli anticorpi; le cellule sono state poi incubate con un anticorpo primario adeguatamente diluito in BSA/PBS per 1 ora a temperatura ambiente (RT), lavate una volta con PBS e incubate con un anticorpo secondario per 45 min a RT.

Inoltre è stato visualizzato il DNA mediante la marcatura con DAPI (4,6-diammino-2-phenylindole, dihydrachloride - Molecular Probes, USA). La colorazione fluorescente è stata osservata utilizzando un microscopio a fluorescenza convenzionale Zeiss (ingrandimento 40X e 100X).

Le procedure di lavaggio e di incubazione sono state effettuate con grande cura e il numero dei passaggi ridotto al minimo necessario al fine di evitare il distacco delle cellule. Tutte le cellule non fissate alla superficie dei vetrini infatti, e in particolare quelle già gravemente danneggiate a causa di citotossicità dell'estratto, vengono perse durante le fasi di preparazione dei vetrini per l'analisi microscopica.

Per la marcatura della stannina sono stati utilizzati i seguenti anticorpi:
- Anticorpo primario policlonale di capra anti-stannina (Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Stannin (C-12): sc-47.429, diluizione 1: 100

- Anticorpo secondario di coniglio anticapra Alexa Fluor ® 594 - IgG (H + L) (Invitrogen) diluizione 1: 500

Per la marcatura della tubulina sono stati utilizzati i seguenti anticorpi:

- Anticorpo primario monoclonale anti-tubulina di topo (Amersham, Inghilterra) diluizione 1:1000 - Anticorpo secondario di capra anti-topo Alexafluor 488 IgG (H + L) (Molecular Probes, USA) diluizione 1:200

Per la marcatura della proteina p53 sono stati utilizzati i seguenti anticorpi:

- Anticorpo primario policlonale anti-p53 di coniglio [Santa Cruz Biotechnology, Inc. (FL-393): sc-6243] diluizione 1:250
- Anticorpo secondario di topo anti-coniglio Alexafluor 594 IgG (H + L) (Molecular Probes, USA) diluizione 1:500

I suddetti anticorpi sono stati incubati sia mediante la procedura di singola che di doppia immunofluorescenza in cui marcatori diversi sono stati incubati insieme, in una miscela.

2.5 Microscopia ottica

La morfologia delle cellule è stata studiata e fotografata con un microscopio Nikon (Elipse TS100); ingrandimento di 40X. Le immagini fotografiche sono state catturate utilizzando il software Studio9.

3 RISULTATI

3.1 Vitalità cellulare

Per valutare l'effetto dei composti OT sulle cellule tumorali umane Hela, la vitalità cellulare è stata analizzata mediante saggio MTT.

I composti OT sono stati testati a concentrazioni che vanno da 1 a 100 micromoli/ L e l'attività antiproliferativa dopo 20 ore di trattamento è presentata nelle Figure 1 e 2.

3.1.1 TPT e 4MT

Il trattamento con 4MT non ha alterato significativamente il tasso di crescita delle cellule Hela (Fig. 1). L' esposizione infatti delle cellule al 4MT alle concentrazioni 1, 10 e 100 μ M per 20 ore ha portato nelle cellule un' inibizione del 10,47%, del 11,48% e del 35,31% rispettivamente.

Il TPT è risultato più efficace e citotossico sulle cellule Hela rispetto agli altri composti OT esaminati con valori di IC₅₀ pari a 0,35 μ M. Rispetto alle cellule di controllo, il trattamento con TPT inibisce la proliferazione delle cellule in modo direttamente proporzionale alla dose somministrata.

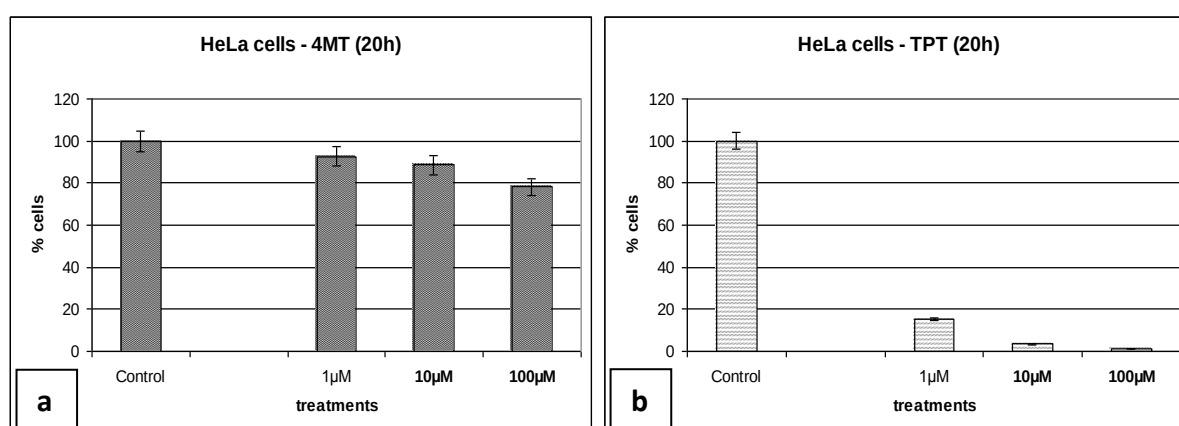


Figura 1 - saggio MTT di cellule Hela trattate per 20 ore con 4MT (a), TPT (b) ; (cellule di controllo C).

3.1.2 TET, TMT e DMT

Il TET inibisce la proliferazione cellulare in modo significativo seguendo un andamento dose-dipendente. In seguito al trattamento con concentrazioni pari a 1 μM , 10 μM e 100 μM il numero delle cellule vive è risultato corrispondere al $84 \pm 5,6\%$, $14 \pm 5,6\%$, e $4 \pm 5,2\%$, rispettivamente, rispetto al controllo (Fig. 2a).

I grafici riportati in figura 2 evidenziano che il TET è un composto più citotossico rispetto al 4MT, TMT e DMT nelle stesse condizioni. Infatti TET induce una diminuzione della vitalità cellulare con valori di $\text{IC}_{50} = 3,47 \mu\text{M}$ in 20 ore di incubazione, mentre TMT e DMT risultano meno citotossici e bloccano debolmente la proliferazione delle cellule HeLa; come mostrato nelle figure 2b e 2c i valori di IC_{50} sono superiori a $180\mu\text{M}$.

L'effetto antiproliferativo del DMT è riportato in Figura 2c: in seguito al trattamento per 20 ore con concentrazioni 1 μM , 10 μM e 100 μM il numero delle cellule vitali è risultato pari al 75,5%, 71,6% e 61,3%, rispettivamente, rispetto al controllo.

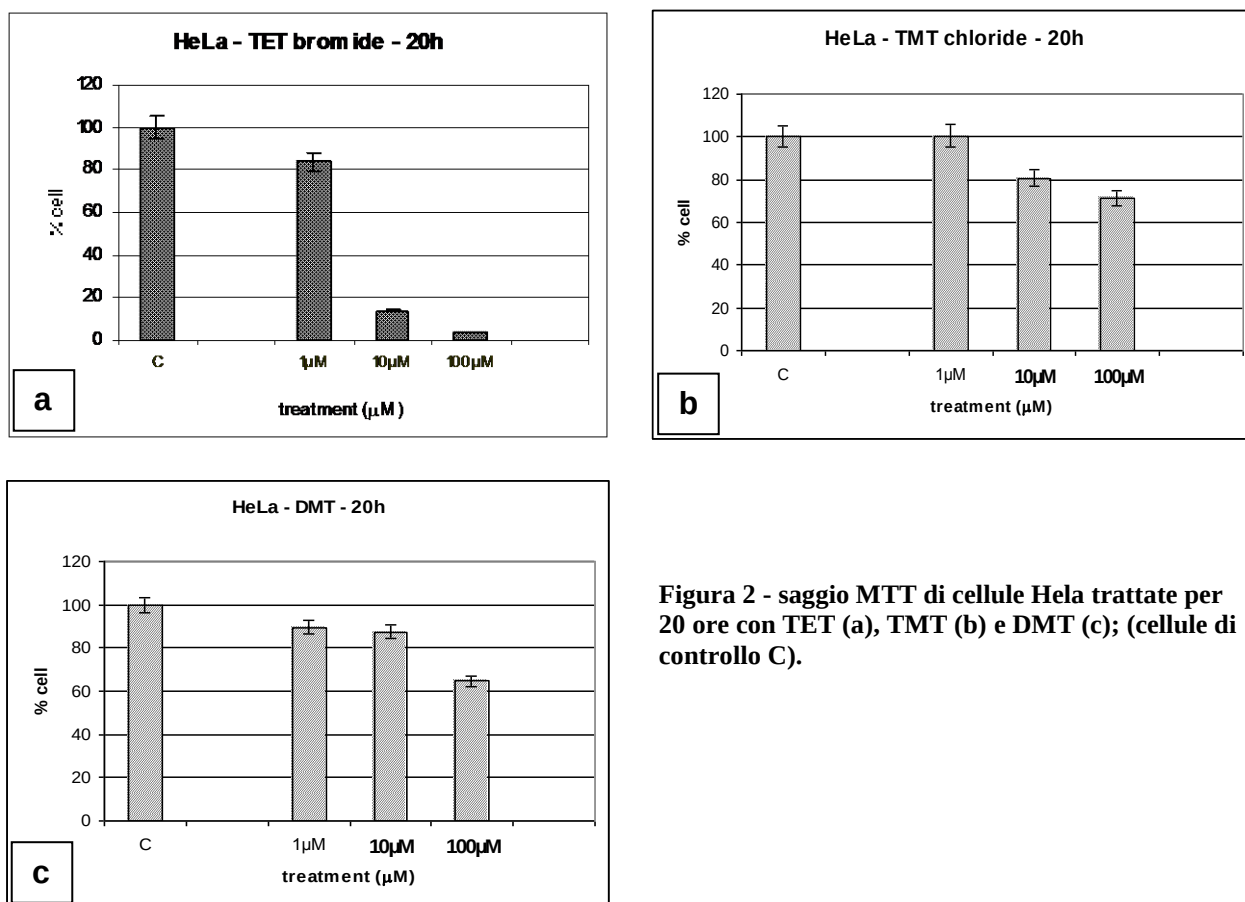


Figura 2 - saggio MTT di cellule Hela trattate per 20 ore con TET (a), TMT (b) e DMT (c); (cellule di controllo C).

3.2 Microscopia ottica

Immagini rappresentative delle cellule HeLa trattate e non trattate sono presentate nelle Figure 3, 4, 5 e 6 .

Come mostrato nelle immagini (a) le cellule di controllo sono saldamente ancorate al substrato con orientamenti casuali.

La somministrazione di 4MT 10 μM , non modifica la morfologia delle cellule Hela (Fig. 3c). Alla concentrazione 100 μM le cellule subiscono alcuni cambiamenti morfologici e appaiono parzialmente staccate dalla superficie (Fig. 3d).

L'incubazione in presenza di TPT per 20 ore ha causato un marcato cambiamento della morfologia cellulare già a partire dal dosaggio più basso; la forma delle cellule è infatti completamente cambiata rispetto alle cellule di controllo: le cellule trattate sono staccate dalla superficie e appaiono rotondeggianti (Fig. 4).

Dopo il trattamento con TET 1 μM le cellule conservano parzialmente la loro forma caratteristica mostrando solo alcune alterazioni morfologiche (Fig. 5b), ma già a partire dal trattamento con TET 10 μM le cellule perdono la loro adesione dal substrato e conseguentemente la loro vitalità (Fig. 5c, d).

Le cellule trattate con TMT mostrano modificazioni significative, quali retrazione, distacco e arrotondamento solo dopo il trattamento con il dosaggio più alto (100 μM) per 20 ore (Fig. 6d).

L'effetto generale del DMT sulle cellule è dimostrato in Figura 7.

Fino alla concentrazione 1 μM , il DMT non ha alcuna influenza rilevabile a livello morfologico (Fig. 7b). Alla concentrazione 10 μM , molte cellule appaiono danneggiate, mostrando perdita di connessioni intercellulari e cambiamento di morfologia, anche se alcune sembrano essere ancora intatte (Fig. 7c). La somministrazione pari a 100 μM provoca il distacco di tutte le cellule (Fig. 7d).

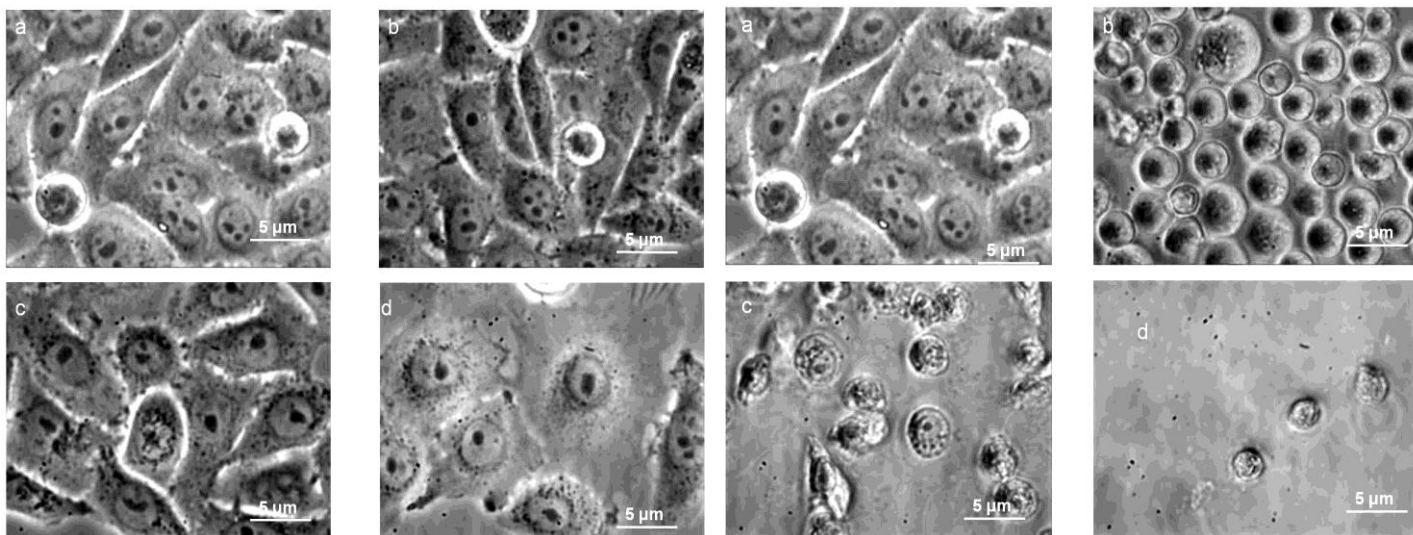


Figura 3 - trattamenti con 4MT a) controllo; b) 1 μ M; c) 10 μ M; d) 100 μ M.

Figura 4 - trattamenti con TPT a) controllo; b) 1 μ M; c) 10 μ M; d) 100 μ M.

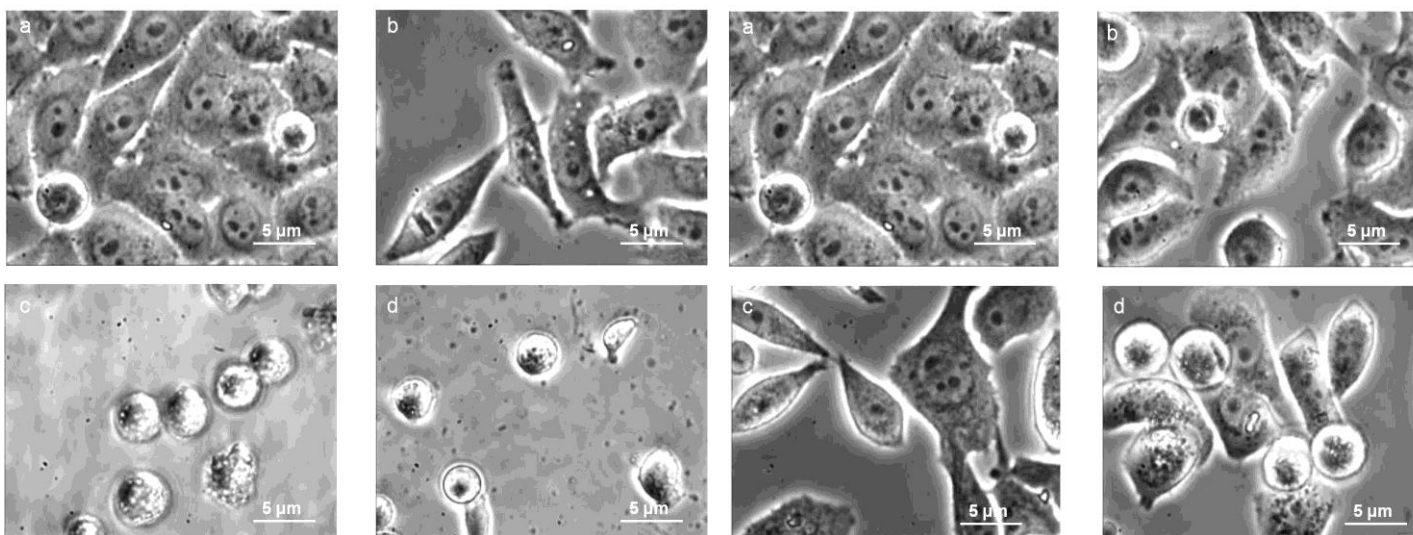


Figura 5 - trattamenti con TET a) controllo; b) 1 μ M; c) 10 μ M; d) 100 μ M.

Figura 6 - trattamenti con TMT a) controllo; b) 1 μ M; c) 10 μ M; d) 100 μ M.

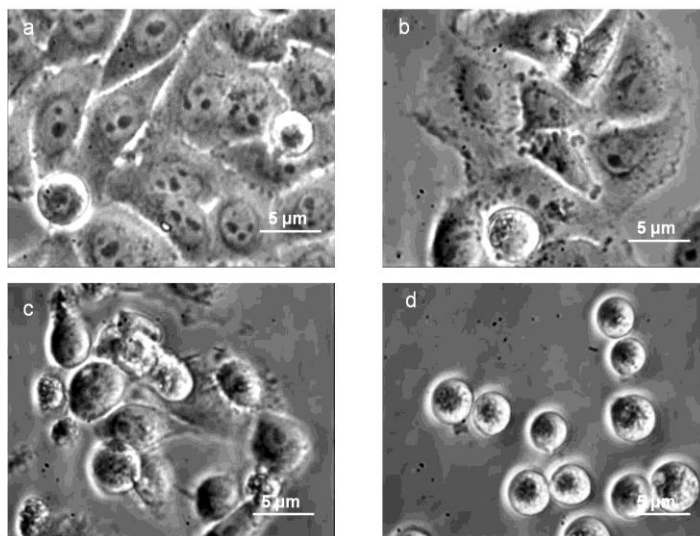


Figura 7 - trattamenti con DMT a) controllo; b) 1 μ M; c) 10 μ M; d) 100 μ M.

3.3 Immunofluorescenza

Nella analisi effettuate mediante microscopia a fluorescenza, l'attenzione è stata rivolta verso gli effetti indotti dai composti DMT, TMT e TET allo scopo di correlare i risultati (in particolare quelli riguardanti l'espressione della stannina) a quelli ottenuti negli studi di binding SNN-PEP e di dealchilazione.

L'osservazione delle cellule mediante immunofluorescenza ha permesso di visualizzare il potenziale tossico del DMT, TMT e TET, sui microtubuli del citoscheletro. Immagini rappresentative sono riportate nelle Figure 8 e 9.

Nelle immagini di controllo si possono osservare le cellule HeLa durante interfase: i microtubuli formano una fitta rete di microtubuli intatti che si irradiano dalla zona perinucleare verso la periferia delle cellule lungo tutto il corpo cellulare.

Dopo il trattamento TET 1 μ M per 20 ore, le cellule conservano la loro caratteristica forma e non mostrano alterazioni morfologiche a livello microtubulare (dati non riportati). Il trattamento di 20h con TET 10 μ M, pur non causando una disorganizzazione significativa del citoscheletro, induce nelle cellule esposte una particolare aggregazione dei microtubuli nella zona perinucleare a livello dell'area corrispondente al centro organizzatore microtubulare (MOC), mentre la distruzione totale del citoscheletro si osserva nelle cellule trattate con TET 100 μ M. (Dati non riportati).

L'organizzazione dei microtubuli subisce leggere modificazioni in seguito al trattamento con la dose più bassa di TMT mentre il trattamento con TMT alla concentrazione 100 μ M induce la formazione di piccoli fasci paralleli e compatti di microtubuli e, inoltre, in alcune zone del citoplasma, i microtubuli appaiono accorciati e/o distrutti.

La combinazione dei segnali fluorescenti relativi al DAPI + α -tubulina consente di visualizzare la posizione di nucleo nella cellula.

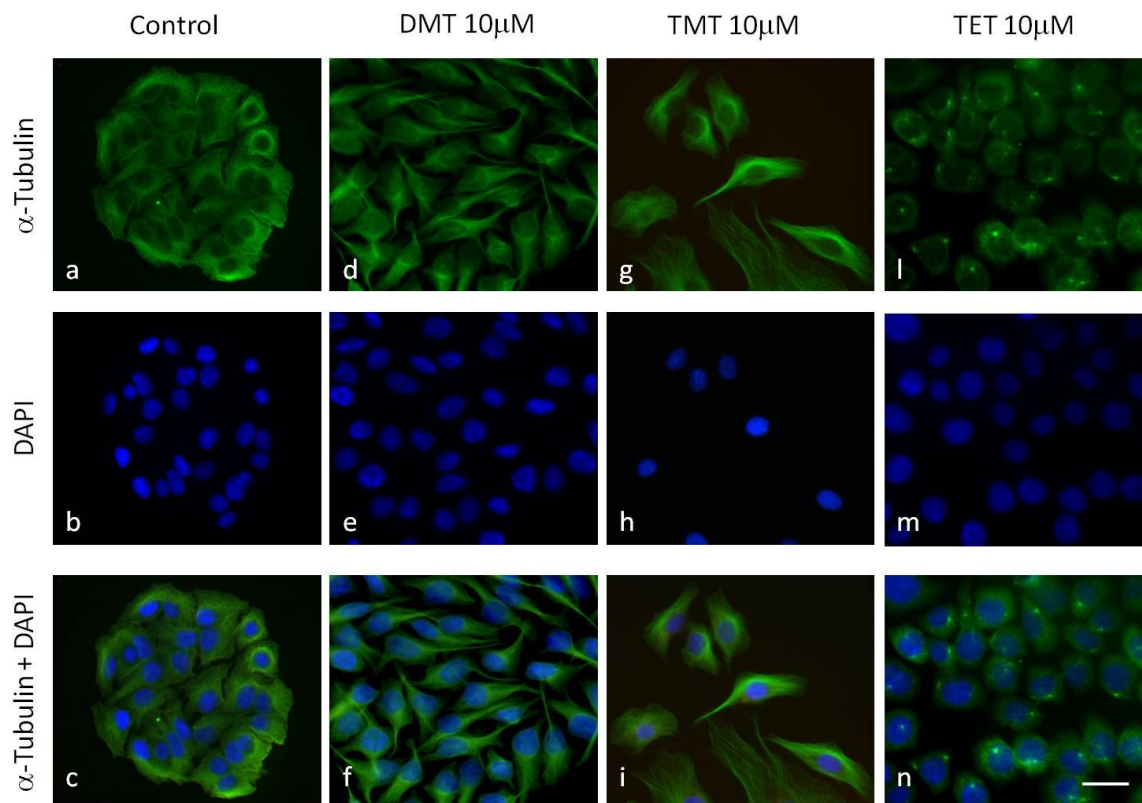


Figura 8 - Distribuzione dei microtubuli in cellule HeLa dopo 20 ore dal trattamento con i composti OT alla stessa concentrazione (10 μ M). Le cellule sono state marcate con anticorpo anti- α tubulina (verde) e DAPI (blu); nel controllo (a) le cellule HeLa mostrano una normale distribuzione di microtubuli citoscheletrici. Dopo 20 ore di trattamento i microtubuli perdono il caratteristico assetto e si nota un'addensamento dell'apparato micro tubulare (barra 10 μ m).

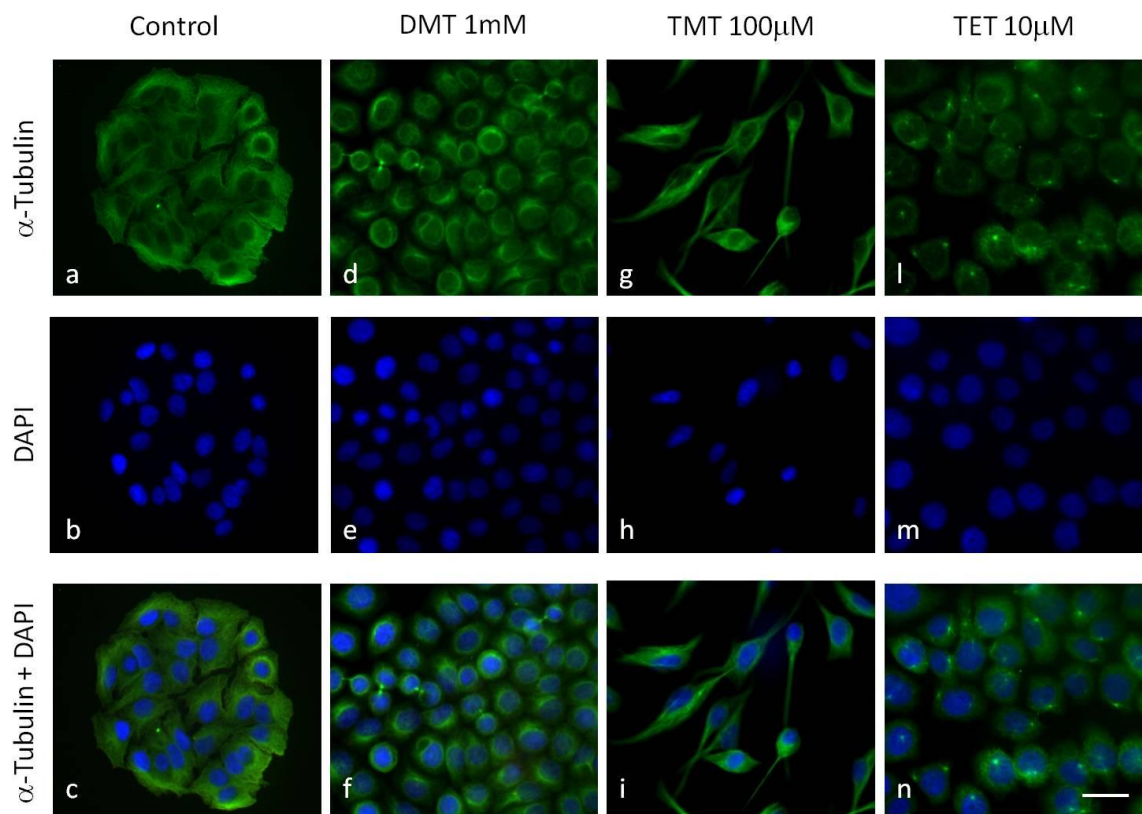


Figura 9 - Distribuzione dei microtubuli in cellule HeLa dopo 2 ore dal trattamento con i composti OT somministrati alle concentrazioni tossiche. Le cellule sono state marcate con anticorpo anti- α tubulina (verde) e DAPI (blu); nel controllo (a) le cellule HeLa mostrano e distribuzione di microtubuli citoscheletrici. Dopo 20 ore di trattamento i microtubuli perdono il caratteristico assetto e si nota un'addensamento dell'apparato micro tubulare (barra 10 μ m).

Test di immunofluorescenza sono stati inoltre condotti sulle cellule HeLa per verificare l'eventuale correlazione tra il trattamento con composti organostagno e l'espressione della stannina e per individuare la localizzazione subcellulare della stannina nelle cellule trattate (Figg. 10 e 11)

In generale, nel controllo (non trattato), le cellule mostrano una marcatura citoplasmatica molto basse e diffusa, mentre nelle cellule trattate si osserva un aumento di espressione della proteina stannina che appare localizzata principalmente a livello mitocondriale nella zona citoplasmatica adiacente a nucleo.

Un significativo segnale relativo alla stannina è stato osservato nelle cellule trattate con TET a partire da una concentrazione iniziale pari a 1 μ M, ad indicare il forte incremento della sintesi di SNN in seguito all'incubazione anche con le dosi più basse di TET. Al contrario, l'espressione della stannina aumenta solo debolmente nelle cellule HeLa trattate con bassa dosi di DMT.

E' stato osservato che TET, TMT e DMT inducono in generale un aumento dell'espressione SNN, ma a concentrazioni diverse. La Figura 11 mostra che le concentrazioni pari a 10 μ M di TET, 100 μ M di TMT e 1mM di DMT conducono allo stesso segnale fluorescente, e quindi un'equivalente espressione della stannina (Fig. 10).

Un significativo incremento del segnale emesso dalla proteina p53 si può osservare nelle cellule trattate con i composti OT rispetto al controllo (Fig. 12). In particolare il trattamento con TMT 100 μ M (Fig. 12g) induce una overespressione della proteina p53 avvalorando l'ipotesi della morte cellulare di tipo apoptotico.

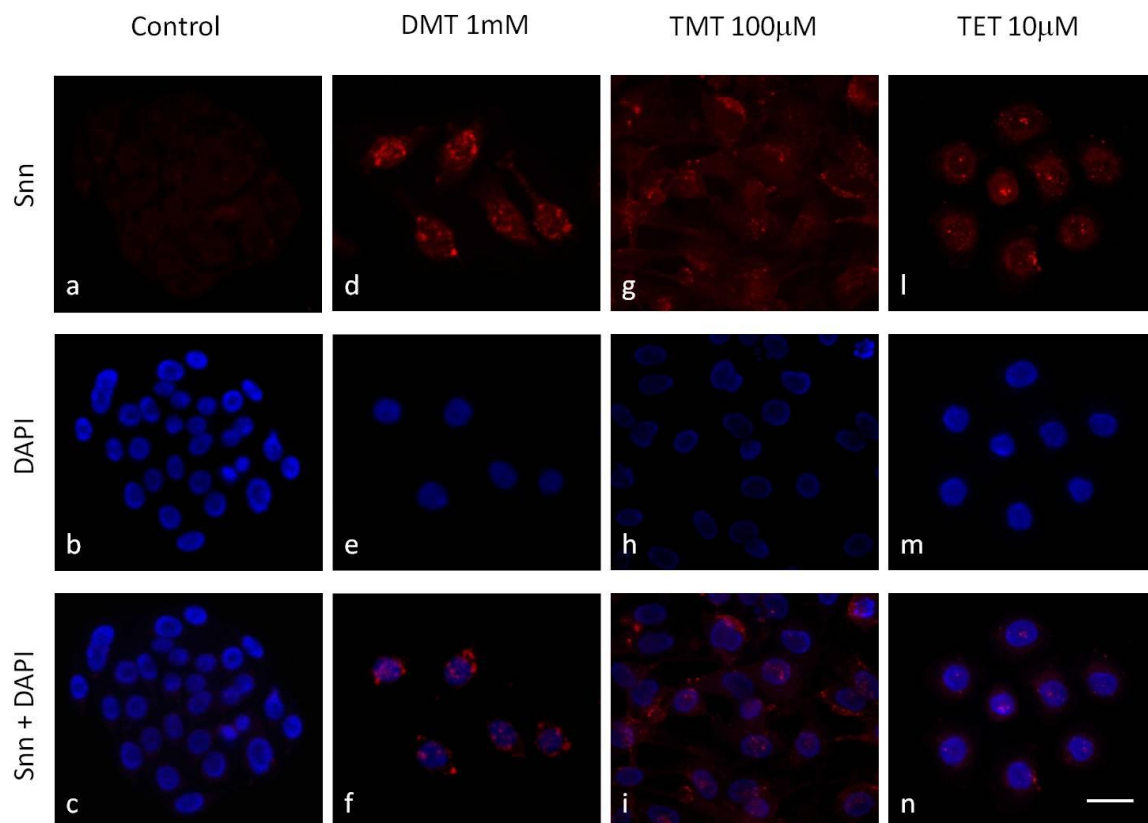


Figura 10 - Localizzazione ed intensità della stannina (rosso) e DAPI (nucleo, blu) dopo 20 ore dal trattamento con i composti OT alle diverse concentrazioni necessarie per ottenere un segnale equivalente nei differenti trattamenti; DMT 1mM, TMT 100μM, TET 10μM; (barra 15μm).

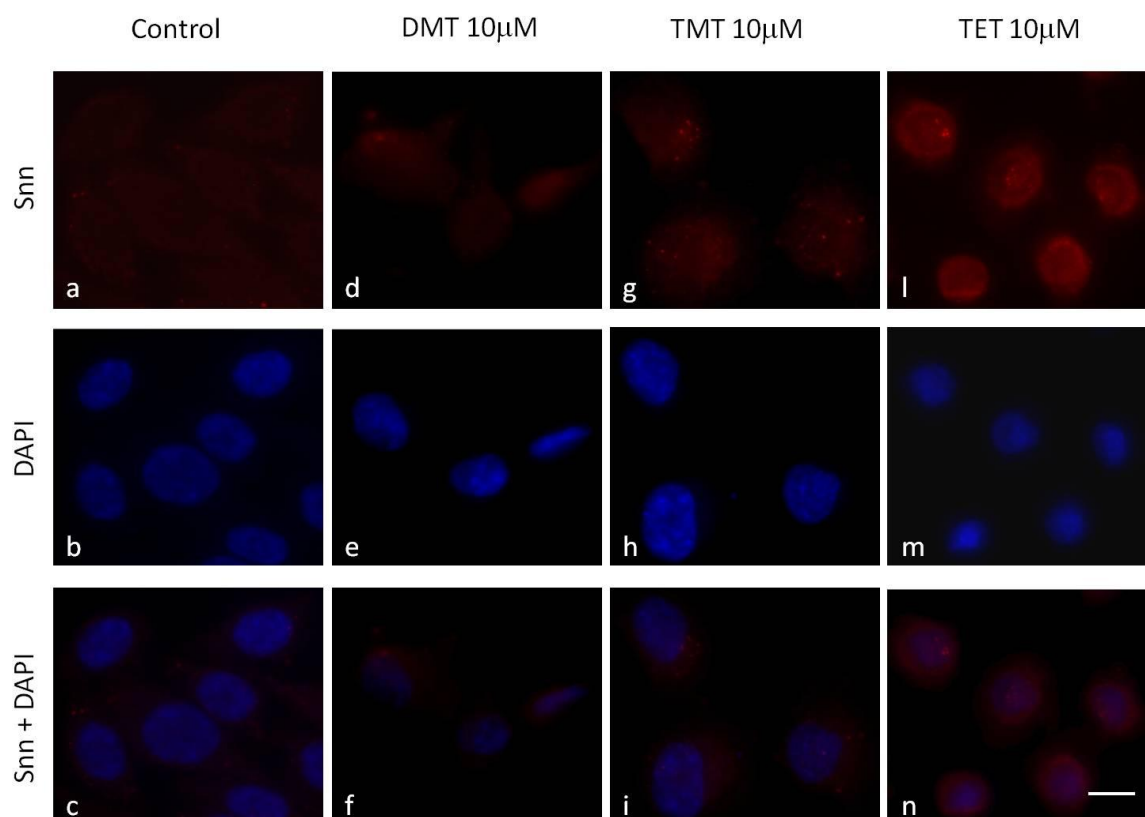


Figura 11 - Localizzazione ed espressione della stannina (rosso) e DAPI (nucleo, blu) dopo 20 ore di trattamento con i composti OT alla stessa concentrazione (10 μM); (barra 5 μm).

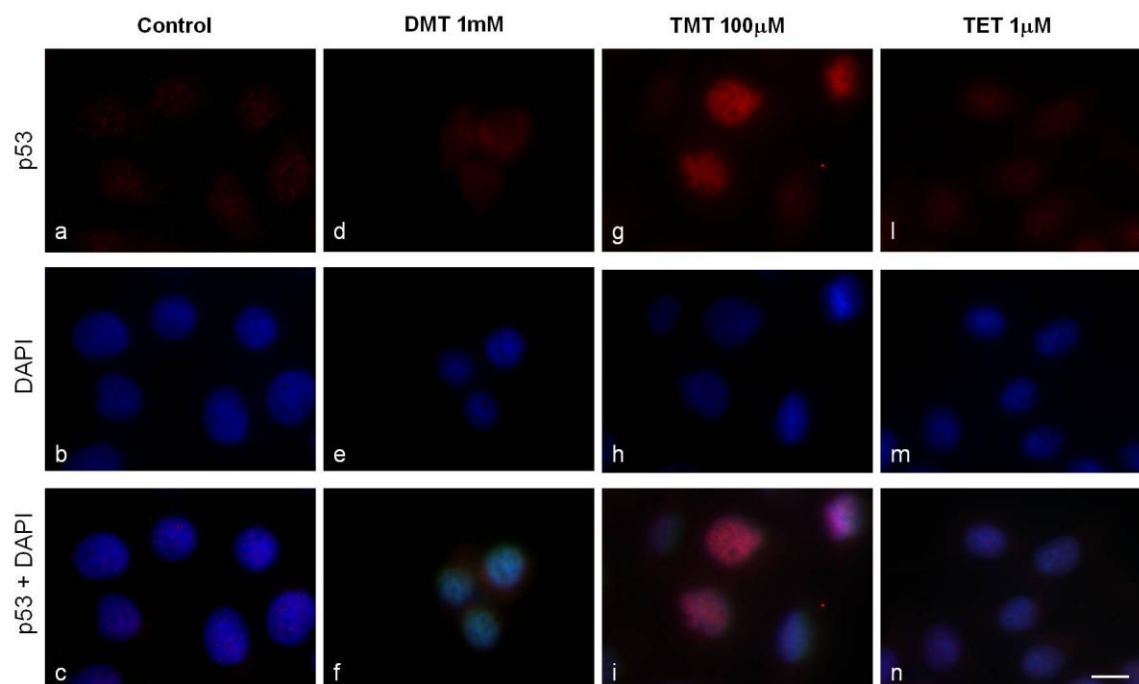


Figura 12 -Espressione della p53 (rosso) e DAPI (nucleo, blu) dopo 20 ore di trattamento con i composti OT (barra 5 μ m).

3.4 Vacuolizzazione

L'osservazione morfologica delle cellule trattate per 10 ore con DMT (100 μ M) sia mediante microscopia ottica che a fluorescenza, ha mostrato l'induzione di vacuolizzazione citoplasmatica. Le cellule di controllo non hanno sviluppato vacuoli percettibili, mentre le cellule trattate mostrano un aumento della vacuolizzazione citoplasmatica visibile come "buchi" sia in cellule osservate mediante saggio di immunofluorescenza (Figg. 12a, b, c, d) che nelle cellule osservate al microscopio ottico (Fig. 12e, frecce) ; l'incremento del numero e delle dimensioni dei vacuoli è tempo-ipendente (dati non riportati).

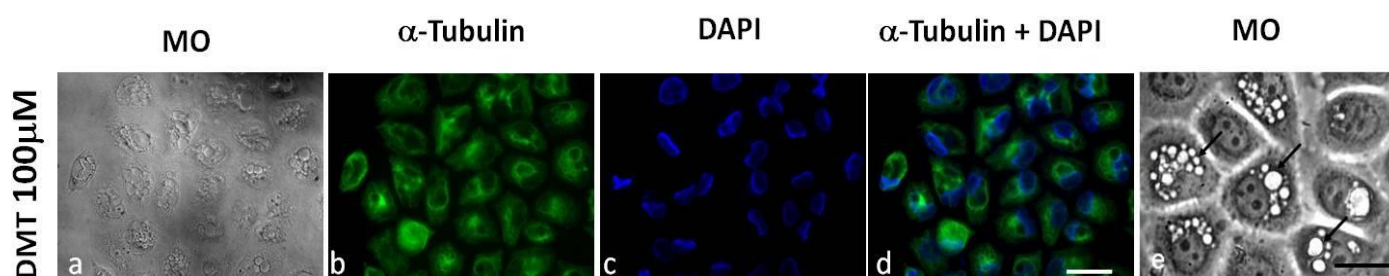


Figura 12 - Effetto del trattamento di 10 ore con DMT 100 μ M ; sono visibili i vacuoli citoplasmatici (frecce); (barra bianca per le figg. a,b,c,d, 10 μ m, barra fig e, 5 μ m).

3.5 NB2a

I risultati, seppur preliminari, effettuati sulla linea cellulare NB2a, sia in termini di mortalità cellulare, che di effetti osservati al microscopio ottico e a fluorescenza, confermano quelli precedentemente ottenuti nel trattamento delle cellule HeLa.

I grafici in Figura 13 riportano i risultati dei saggi MTT effettuati dopo il trattamento con i tre composti OT (TET, TMT e DMT) sulla linea cellulare utilizzata, di natura neuronale; gli effetti antiproliferativi sono comparabili a quelli osservati nelle cellule HeLa.

Rappresentative immagini al microscopio ottico di cellule di controllo e cellule trattate sono riportate in Figura 14.

Per quanto riguarda l'espressione della stannina, come di può osservare dalle immagini delle cellule marcate con l'anticorpo specifico, in questa linea cellulare l'aumento della sintesi di tale proteina è indotta in seguito a somministrazioni inferiori di tutti i composti analizzati (Fig. 15).

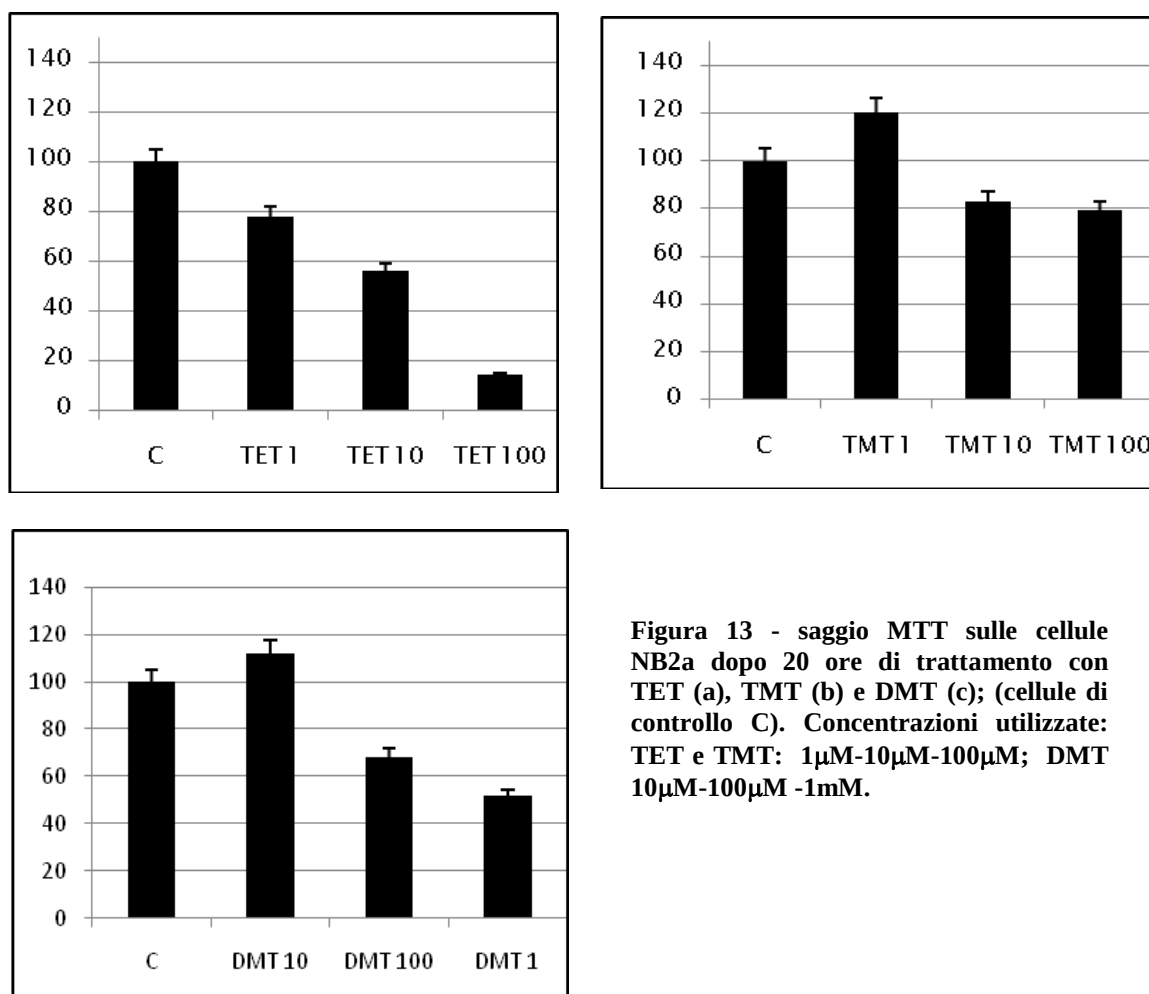


Figura 13 - saggio MTT sulle cellule NB2a dopo 20 ore di trattamento con TET (a), TMT (b) e DMT (c); (cellule di controllo C). Concentrazioni utilizzate: TET e TMT: 1 μ M-10 μ M-100 μ M; DMT 10 μ M-100 μ M -1mM.

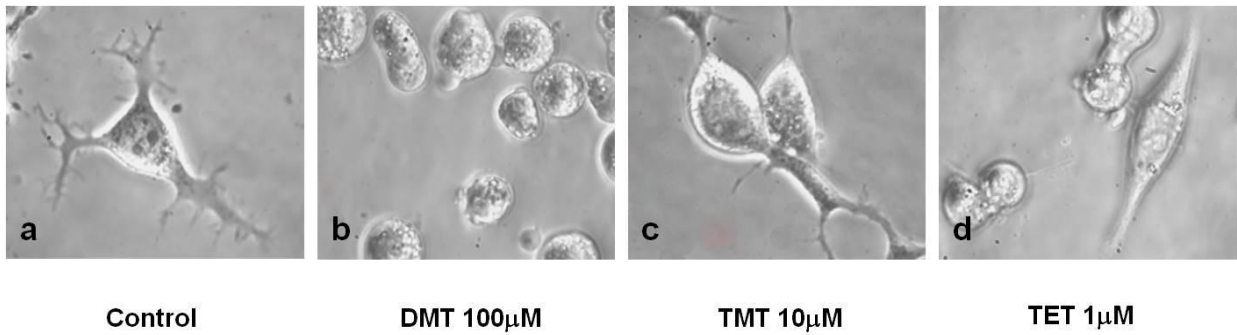


Figura 14 - Cellule NB2a osservate al microscopio ottico (40x); trattamenti con concentrazioni significative di DMT, TMT e TET

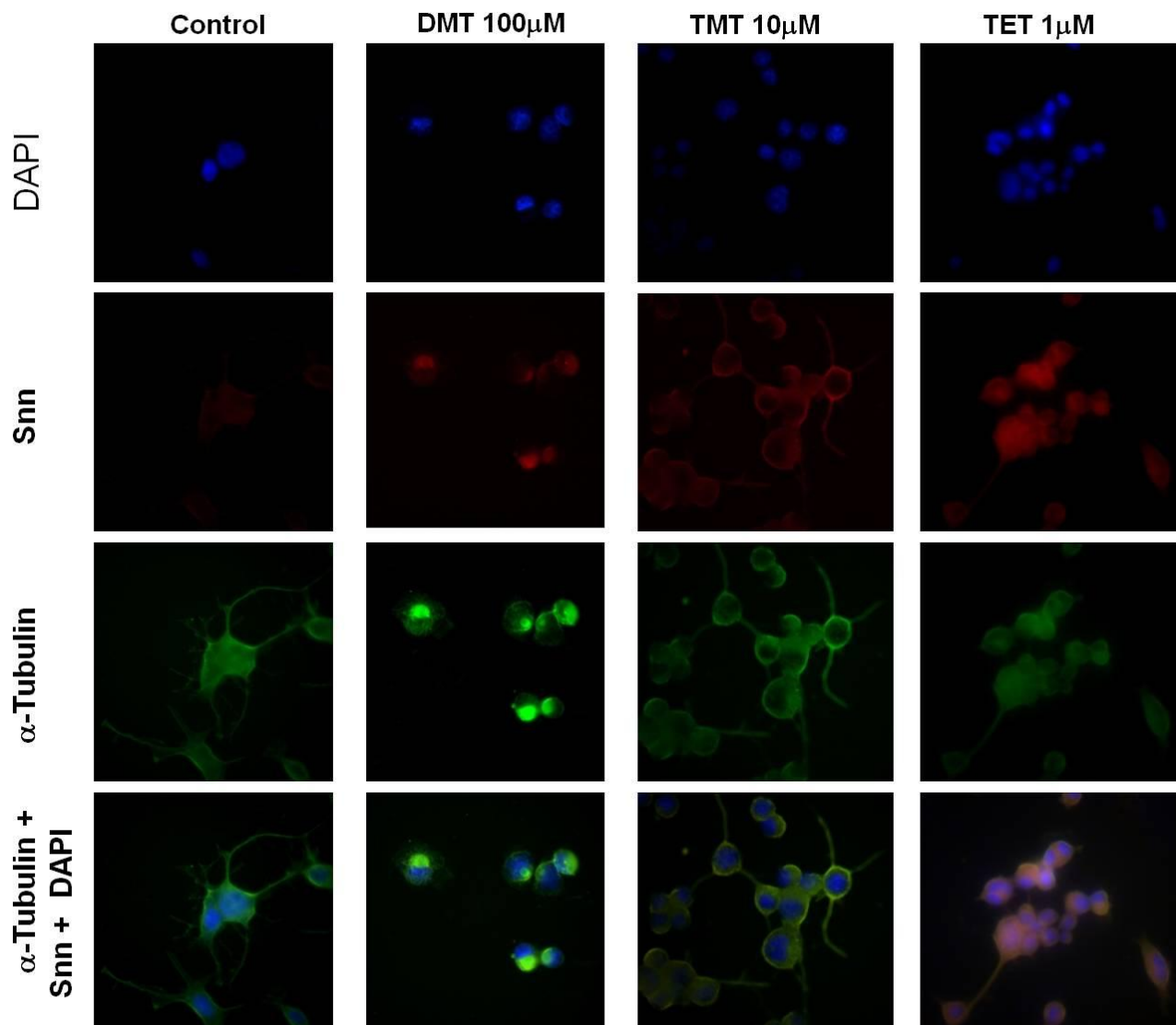


Figura 15 - Co-localizzazione ed intensità della stannina (rosso), dell'α-tubulina (verde) e DAPI (nucleo, blu) dopo 20 ore dal trattamento delle cellule NB2a con DMT 100µM, TMT 10µM, TET 1µM

4 DISCUSSIONE

I composti organostagno sono noti come potenti agenti neurotossici ed i loro potenziali meccanismi di neurotossicità sono di particolare interesse.

Il DMT, il TMT e il TET sono stati tra i composti organometallici più utilizzati. È interessante notare che la loro dealchilazione è stata osservata nel cervello dei mammiferi e del fegato (Arakawa *et al.* 1981). Come i composti tetralchilstagno, i composti trialchilstagno mostrano una azione tossica ritardata, probabilmente dovuta al processo di trasformazione progressiva (dealchilazione) rispettivamente a tri- e di-alchilderivati.

Dejneka e collaboratori nel 1988 (Dejneka *et al.* 1997, Dejneka *et al.* 1998) hanno isolato un cDNA di 2.9kb che codifica per una piccola proteina di membrana (88-aa) chiamata stannina (SNN), che innesca l'apoptosi nelle cellule ed interagisce con il TMT.

In questo Dottorato di Ricerca sono state studiate, mediante immunofluorescenza, le cellule appartenenti alle linee cellulari HeLa (adenocarcinoma della cervice umana) e NB2a (neuroblastoma di topo) in presenza di composti OT. E' stata infatti dimostrata la sovraespressione della SNN in seguito al trattamento con DMT, TET e TMT ed è stato valutato l'effetto sulla proliferazione cellulare ed è stata osservata la loro capacità di interagire con i microtubuli, a livello intracellulare.

Per ciascun composto testato si è osservato che il livello di espressione della SNN era direttamente e significativamente associato con la concentrazione di esposizione. Una delle possibili spiegazioni è che tali molecole agiscano a livello del gene della stannina modificandone il tasso di trascrizione. L'analisi del cDNA che codifica per la SNN ha rivelato la presenza di due siti di legame per i fattori di trascrizione associati ai geni che rispondono all'esposizione ai composti xenobiotici e ai metalli pesanti. Inoltre, una regione simile a quella presente nei mammiferi, a livello promotore del gene coinvolto nella induzione dell'espressione proteica in risposta ai metalli pesanti, è stato trovato nel cDNA codificante la SNN e potrebbe quindi costituire un sito di legame per il TMT (Dejneka *et al.* 1998).

Nel presente studio i risultati mostrano chiaramente che l'espressione della stannina è maggiormente aumentata in seguito al trattamento con TET piuttosto che con TMT e DMT; essi infatti inducono lo stesso effetto, in termini di intensità della fluorescenza, solo a concentrazioni più alte (100 μ M per il trattamento TMT e 1 μ M per DMT). Ciò potrebbe indicare che l'interazione della SNN con il TET (o TMT) e la dealchilazione del TMT a DMT

attiva la sovraespressione della SNN velocizzando il processo disintossicante e migliorando l'eventuale induzione di apoptosi.

I risultati ottenuti mostrano, inoltre, che i composti OT possono indurre un cambiamento nella struttura microtubulare e provocare una modificazione nello stato di aggregazione dell' α -tubulina, suggerendo così un possibile ruolo dei microtubuli nelle interazioni tra cellule e OT.

I microtubuli (MT) sono polimeri complessi di α - e β -tubulina che si assemblano in modo da formare un protofilamento polare (Bailly *et al.* 1992). I protofilamenti a loro volta si aggregano fino a costituire le pareti dei microtubuli che, associati a specifiche proteine, svolgono alcune funzioni fondamentali nelle cellule. La divisione cellulare, ad esempio, dipende dai cambiamenti nella disposizione e organizzazione dei microtubuli. Oltre all'importanza nella mitosi, la dinamica dei microtubuli ha un ruolo importante nel processo apoptotico. La citotossicità di alcuni composti (es. taxani) è attribuita alla loro capacità di stabilizzare i microtubuli stessi e migliorare la loro polimerizzazione (Schiff, *et al.* 1979, Schiff e Horwitz 1980, Schiff e Horwitz 1981). E' quindi possibile che l'alterazione delle normali funzioni e dimensioni microtubulari possa rappresentare un fattore scatenante l'apoptosi.

E' stato ipotizzato perciò che la tossicità dei composti OT ed il danno cellulare ad essi associato possa essere correlato ad alterazioni della dinamica microtubulare e alla depolimerizzazione della tubulina stessa.

Alcune ricerche basate su osservazioni istologiche del tessuto nervoso in seguito alla somministrazione di TMT, hanno mostrato l'accumulo di corpi densi e di vacuoli autofagici nel citoplasma e vacuolizzazione dell'apparato di Golgi e del reticolo endoplasmatico nelle cellule neuronali (Brown *et al.* 1979, O'Callaghan 1988, Nolan *et al.* 1990).

Le osservazioni effettuate per verificare i cambiamenti morfologici intracellulari dopo la somministrazione dei composti OT, hanno evidenziato la caratteristica formazione di vacuoli all'interno delle cellule HeLa trattate con DMT per 10 ore, il che potrebbe indicare che uno dei possibili meccanismi di morte cellulare indotta da tali composti sia quello di tipo autofagico.

L'autofagia e la vacuolizzazione sono processi ATP-dipendenti, complessi, universali, altamente conservati e che si verificano in tutte le cellule eucariotiche. L'autofagia comporta la riorganizzazione delle membrane subcellulari allo scopo di incorporare porzioni di citoplasma e organelli da sottoporre all'azione di degradazione da parte di organelli, come i lisosomi, dove il materiale sequestrato è degradato e riciclato; recenti ricerche hanno dimostrato che questo processo è deregolato nei tumori (Gozuacik e Kimchi 2004, Jaattela 2004). L'autofagia costitutiva è stata osservata sia in condizioni fisiologiche che in alcune condizioni patologiche. Questo processo è coinvolto nel controllo del meccanismo programmato di morte cellulare di tipo II (non-apoptotico) (Shintani e Klionsky 2004), facendo ipotizzare che l'autofagia possa avere un ruolo nel controllo della crescita cellulare, e quindi anche nel tumore (Klionsky e EMR 2000, Klionsky 2007). Diversi studi dimostrano l'interazione tra l'autofagia e apoptosi e la possibilità che l'attività lisosomiale possa attivare l'apoptosi. Ad esempio, Kroemer e colleghi hanno dimostrato che i lisosomi possono attivare le vie apoptotiche (Boya et al 2003, Ferri e Kroemer, 2001). Alcuni ricercatori hanno osservato che il danno al compartimento lisosomiale può attivare l'apoptosi, indirettamente, attraverso la via mitocondriale; altri hanno riconosciuto il processo autofagico come un diretto precursore e persino iniziatore di apoptosi (Uchiyama 2001).

In conclusione da questo studio è possibile ipotizzare che la tossicità dei composti organostagno a livello cellulare è dovuta all'attivazione di diversi meccanismi, tra cui l'interazione Snn/OT, il coinvolgimento dell'apparato micro tubulare, l'innescò di pathways apoptotici e autofagici. Ulteriori ricerche saranno necessarie per determinare come i composti organostagno interagiscono con quelle proteine regolatrici specifiche che conducono alla morte della cellula.

BIBLIOGRAFIA

- Agullo G, Gamet-Payrastre L, Manenti S, Viala C, Remesy C, Chap H, Payrastre B. (1997). *Biochem Pharmacol.*, 53:1649-1657.
- Alarcon de la Lastra C, Martin MJ, Motilva V. (1994). *Pharmacology (SWITZERLAND)* 48:56-62.
- Aligiannis N, Mitaku S, Mitrocotsa D, Leclerc S. (2001). *Planta Med.* 67: 468-470.
- Anton R. Alan R. (1988). Liss, Inc.
- Arakawa Y, Wada O, Yu TH, Iwai H (1981) *J Chromatogr* 216:209-217.
- Arakawa Y, Wada O, Yu TH. (1981). *Toxicol Appl Pharmacol.* 60:1-7.
- Aschner M, Aschner JL (1992) *Neurosci Biobehav Rev* 16:427-435.
- Aschner M, Gannon M, Kimelberg HK (1992) *Brain Res* 582:181-185.
- Bailly E, Bordes N, Bornens M, Klotz C. (1992). *Cell Motil Cytoskeleton.* 23:122-32.
- Begley TP, Walts AE, Walsh CT (1986) *Biochemistry* 25:7192-7200.
- Billingsley ML, Yun J, Reese BE, Davidson CE, Buck-Koehntop BA, Veglia G (2006) *J Cell Biochem* 98:243-250.
- Block G, Patterson B, Subar A. (1992). *Nutr. Cancer* 18: 1-29.
- Bouldin TW, Goines ND, Bagnell RC, Krigman MR (1981). *Am J Pathol.* 104:237-49.
- Boya P, Andreau K, Poncet D, Zamzami N, Perfettini JL, Metivier D, Ojcius DM, Jäättelä M, Kroemer G. J (2003). *Exp Med.* 197:1323-34.
- Boya P, Gonzalez-Polo RA, Poncet D, Andreau K, Vieira HL, Roumier T, Perfettini JL, Kroemer G. (2003). *Oncogene.* 22:3927-36.
- Boyer IJ (1989) *Toxicology* 55:253-298.
- Braman RS, Tompkins MA. (1979). *Anal Chem.* 51:12-9.
- Brini M, Carafoli E. (2000). *Cell Mol Life Sci.* 57:354-70. Review.
- Brown AW, Aldridge WN, Street BW, Verschoyle RD. (1979). *Am J Pathol.* 97:59-82.
- Brown AW, Cavanagh JB, Verschoyle RD, Gysbers MF, Jones HB, Aldridge WN (1984). *Neuropathol Appl Neurobiol.* 10:267-83.
- Bruggusser R, Von Daeniken K, Jundt G, Schaffner W, Tullberg-Reinert H. (2002). *Planta Medica* 68: 445-448.
- Buck B, Mascioni A, Que L Jr, Veglia G (2003). *J Am Chem Soc* 125:13316-7.
- Buck BA, Mascioni A, Cramer CJ, Veglia G. J (2004) *Am Chem Soc.* 126:14400-10.

Buck-Koehntop BA, Mascioni A, Buffy JJ, Veglia G (2005) *J Mol Biol* 354:652-665.

Buck-Koehntop BA, Porcelli F, Lewin JL, Cramer CJ, Veglia G (2006) *J Oganomet Chem* 691:1748-1755.

Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Török L, Pandey S, Sikorska M, Walker R, Hermann RS (1996). *Carcinogenesis*. 17(8):1595-607.

Cameron JA, Kodavanti PR, Pentyala SN, Desai D (1991). *J Appl Toxicol*. 11:403-9.

Chang LW, Dyer RS (1983). *Neurobehav Toxicol Teratol*. 5:443-59.

Chang MC, Petrich JW, McDonald DB, Fleming GR (1983) *J Am Chem Soc* 105:3819-3824.

Chau YP, Lin SY, Chen JH, Tai MH (2003). *Histol Histopathol*. 18:715-26.

Chen Y C, Shen S C, Chow J M, Ko C H, Tseng S W. (2004). *International Journal of Oncology* 25: 661-670.

Chi S, Kitanaka C, Noguchi K, Mochizuki T, Nagashima Y, Shirouzu M, Fujita H, Yoshida M, Chen W, Asai A, Himeno M, Yokoyama S, Kuchino Y (1999). *Oncogene*. 18:2281-90.

Constantinou A, Mehta R, Runyan C, Rao K, Vaughan A, Moon R. (1995). *J. Natl. Prod*. 58: 217-225.

Costa LG, Guizzetti M, Lu H, Bordini F, Vitalone A, Tita B, Palmery M, Valeri P, Silvestrini B (2001) *Toxicology* 160:19-26.

Costa MA, Gulino L, Pellerito L, Fiore T, Pellerito C, Barbieri G (2009) *Oncol Rep* 21:593-599.

Costa MA, Pellerito L, Izzo V, Fiore T, Pellerito C, Melis M, Musmeci MT, Barbieri G (2006) *Cancer Lett* 238:284-294.

Cowgill RW (1967) *Biochim Biophys Acta* 133:6-18.

Cowgill RW (1967) *Biochim Biophys Acta* 140:552-554.

Cristofol RM, Gasso S, Vilchez D, Pertusa M, Rodriguez-Farre E, Sanfeliu C (2004) *Toxicol Lett* 152:35-46.

Davidson CE, Reese BE, Billingsley ML, Yun JK (2005). *Brain Res Mol Brain Res*. 138:256-63.

Davidson CE, Reese BE, Billingsley ML, Yun JK (2004). *Mol Pharmacol*. 66:855-63.

Dejneka NS, Patanow CM, Polavarapu R, Toggas SM, Krady JK, Billingsley ML (1997). *Neurochem Int*. 31:801-15.

Dejneka NS, Polavarapu R, Deng X, Martin-DeLeon PA, Billingsley ML (1998). *Mamm Genome*. 9:556-64.

Desai A, Mitchison TJ (1997). *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:83-117. Review.

DG, Gray RH, de la Iglesia FA (1987). *Toxicol Pathol.* 15:7-17.

Diaz LS, Olave F. (1982). *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* 22: 111-19.

Diez S, Jover E, Albaiges J, Bayona JM (2006) *Environ Int* 32:858-865.

Dong W, Muramoto W, Nagai Y, Takehana K, Stegeman JJ, Teraoka H, Hiraga T (2006) *J Vet Med Sci* 68:573-579.

Dopp E, Hartmann LM, von Recklinghausen U, Florea AM, Rabieh S, Shokouhi B, Hirner AV, Obe G, Rettenmeier AW (2007). *Toxicology.* 232:226-34. Epub 2007 Jan 24.

Dopp E, Hartmann LM, von Recklinghausen U, Florea AM, Rabieh S, Shokouhi B, Hirner AV, Obe G, Rettenmeier AW (2007) *Toxicology* 232:226-234.

Dori A, Ifergane G, Saar-Levy T, Bersudsky M, Mor I, Soreq H, Wirguin I (2007). *Life Sci* 80 : 2369–74.

Duchen MR (2000). *J Physiol.* 529 Pt 1:57-68. Review.

Dyer RS, Walsh TJ, Wonderlin WF, Bercegeay M (1982). *Neurobehav Toxicol Teratol.* 4:127-33.

Feldman RG, White RF, Eriator, II (1993) *Arch Neurol* 50:1320-1324.

Fent K (1996). *Crit Rev Toxicol.* 26:1-117. Review.

Fent K. (2004) *Toxicology* 205:223-240.

Ferri KF, Kroemer G (2001). *Nat Cell Biol.* 3:E255-63. Review.

Figiel I, Fiedorowicz A (2002) *Neurotoxicology* 23:77-86.

Flamini G, Catalano S, Caponi C, Panizzi L, Morelli I. (2001). *Phytochemistry* 59: 873-876.

Florea AM, Dopp E, Büsselberg D (2005). *Cell Calcium.* 37:251-8.

Gadd G.M. (2000) *Sci Total Environ* 258:119-127.

Gallert C, Winter J (2002) *Water Res* 36:3130-3140

Gamet-Payrastre L, Manenti S, Gratacap M P, Tulliez J, Chap H, Payrastre B. (1999). *J. Pharmacol.* 32: 279-286.

Gielen M (1994) *Met Based Drugs* 1:213-219.

Gielen M (1995) *Met Based Drugs* 2:99-103.

Gielen M, Biesemans M, de Vos D, Willem R (2000). *J Inorg Biochem.* 79:139-45. Review.

Goh CW, Aw CC, Lee JH, Chen C, Browne ER (2010). *Drug Metab Dispos.*

Golin J, Ambudkar SV, Gottesman MM, Habib AD, Szczepanski J, Ziccardi W, May L (2003) *J Biol Chem* 278:5963-5969.

Golin J, Barkatt A, Cronin S, Eng G, May L (2000) *Antimicrob Agents Chemother* 44:134-138.

Gozuacik D, Kimchi A (2004). *Oncogene*. 23:2891-906. Review.

Gunasekar P, Li L, Prabhakaran K, Eybl V, Borowitz JL, Isom GE (2001) *Toxicol Sci* 64:83-89.

Hagiwara M, Inoue S, Tanaka T, Nunoki K, Ito M, Hidaka H. (1988). *Biochem Pharmacol*. 37: 2987-2992.

Harino H, Yamamoto Y, Eguchi S, Kawai S, Kurokawa Y, Arai T, Ohji M, Okamura H, Miyazaki N (2007) *Arch Environ Contam Toxicol* 52:179-188.

Hicks D, John D, Makova NZ, Henderson Z, Nalivaeva NN, Turner AJ. (2011). *J Neurochem*. 10.1111/j.1471-4159.2010.07032

Hoch M. (2001) *Appl Geochem* 16:119-127.

Holzgrabe U, Kapková P, Alptüzün V, Scheiber J, Kugelmann E (2007). *Expert Opin Ther Targets*. 11:161-79. Review.

Horiguchi T, Kojima M, Hamada F, Kajikawa A, Shiraishi H, Morita M, Shimizu M (2006) *Environ Health Perspect* 114 Suppl 1:13-19.

Hosokawa N, Hosokawa Y, Sakai T, Yoshida M, Marui N, Nishino H, Kawai K, Aoike A. (1990). *Int. J. Cancer* 45: 1119-1124.

Hughes G, Harrison MA, Kim YI, Griffiths DE, Finbow ME, Findlay JB (1996) *Biochem J* 317 :425-431.

Hung H. (2003). *Journal of Cellular Physiology* 198: 197-208.

Hwang CH (2009) *Neurol Sci* 2: 153-158.

Inglis, F (2002). *International journal of clinical practice*. Supplement 127: 45–63.

Ishida N, Akaike M, Tsutsumi S, Kanai H, Masui A, Sadamatsu M, Kuroda Y, Watanabe Y, McEwen BS, Kato N (1997) . *Neuroscience*. 81:1183-91.

Jäättelä M (2004). *Oncogene*. 23:2746-56. Review.

Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S (2004). *Cell Death Differ*. 11:448-57.

Karpiak VC, Bridges RJ, Eyer CL (2001) *J Toxicol Environ Health A* 63:273-287.

Karpiak VC, Eyer CL (c) *Cell Biol Toxicol* 15:261-268.

Khanani E M, Vasilenko Y K, Bandyukova V.(1997). “Humans and Medicines” 8: 136.

Klionsky DJ (2007). *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:931-7. Review.

Klionsky DJ, Emr SD (2000). *Science*. 290:1717-21. Review.

Kobuchi H, Roy S, Sen C K, Nguyen H G, Packer L. (1999). *Am J. Physiology*. 277: C403-C411.

Kodavanti PR, Mundy WR, Tilson HA, Harry GJ (1993). *Fundam Appl Toxicol*.21:308-16.

Komulainen H, Bondy SC (1987). *Toxicol Appl Pharmacol*. 88:77-86.

Kong A N, Yu R, Chen C, Mandlekar S, Primiano T. (2000).*Arch. Pharm. Res*. 23: 1-16.

Kreyberg S, Torvik A, Bjorneboe A, Wiik-Larsen W, Jacobsen D (1992) *Clin Neuropathol* 11:256-259.

Kuo M L, Lin J K, Huang T S, Yang N C. (1994). *Cancer Lett*. 87: 91-97.

Lackowicz JR (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy* 2nd ed. Plenum Publisher, NY.

Larocca L M, Piantelli M, Leone G, Sica S, Teofili L, Panici P B, Scambia G, Mancuso S, Capelli A, Ranelletti F O. (1990). *J. Haematol*. 75: 489-495.

Larocca LM, TeofiliL, Leone G. (1991). *J Haematol* 79:562-566.

Lee S C, Kuan C Y, Yang C C, Yang S D. (1998). *Anticancer research* 18: 1117-1121.

Lemus I, García R, Delvillar E, Knop G. (1999). *Phytoterapy Research* 13: 91-94.

Lieutaghi P. (1976). *Il libro delle erbe*. Rizzoli Editore.

Magee BA, Potezny N, Rofo AM, Conyers RA (1979). *Aust J Exp Biol Med Sci*. 57:529-39.

Markaverich B M, Roberts R R, Alejandro M A, Johnson G A, Middleditch B S, Clark J H. (1990). *Journal Steroid Biochem*. 30: 71-78.

Massoulié J, Perrier N, Noureddine H, Liang D, Bon S (2008). *Chem Biol Interact* 175: 30–44.

McCutcheon A R, Ellis S M, Ancock R E W, Towers G H N. (1994). *Journal of Ethnopharmacology* 44: 157-169.

Milaeva E, Petrosyan V, Berberova N, Pimenov Y, Pellerito L (2004) *Bioinorg Chem Appl*:69-91.

Mundy WR, Freudenrich TM (2006) *Neurotoxicology* 27:71-81.

Mushak P, Krigman MR, Mailman RB (1982). *Neurobehav Toxicol Teratol*. 4:209-15.

Nakatsu Y, Kotake Y, Ohta S (2007) *Toxicol Sci* 97:438-447.

Nolan CC, Brown AW, Cavanagh JB (1990). *Acta Neuropathol*. 81:204-12.

Noland EA, McCauley PT, Bull RJ (1983). *J Toxicol Environ Health*. 12:89-98.

Nordberg A, Svensson AL. (1998) *Drug Saf.* 19(6):465-80. Review. Erratum in: *Drug Saf* 1999 Feb;20:146.

O'Callaghan JP (1988). *Neurotoxicol Teratol.* 10:445-52.

Ogita K, Nishiyama N, Sugiyama C, Higuchi K, Yoneyama M, Yoneda Y (2005) *J Neurosci Res* 82:609-621.

Ohhira S, Enomoto M, Matsui H (2006) *Toxicology* 228:171-177.

Opipari AW Jr, Tan L, Boitano AE, Sorenson DR, Aurora A, Liu JR (2004). *Cancer Res.* 64:696-703.

Orhan I, Kartal M, Tosun F, Sener B (2007) *Z Naturforsch C.* 62:829-32.

Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahonill M, Sphicas E, Domingo D, Yahalom J (2001). *Cancer Res.* 61:439-44.

Panizzi L, Caponi C, Catalano S, Cioni PL, Morelli I. (2001). *Journal of Ethnopharmacology* 79: 165-168.

Perry NS, Houghton PJ, Sampson J, Theobald AE, Hart S, Lis-Balchin M, Hoult JR, Evans P, Jenner P, Milligan S, Perry EK. (2001). *J Pharm Pharmacol.* 53:1347-56.

Philbert M.A., Billingsley ML, Reuhl KR (2000) *Toxicol Pathol* 28:43-53.

Pignatti S. (1982). *Flora d'Italia; Edagricole.*

Porcelli F, Delfini M, Del Giudice MR (1999). *Bioorg. Chem.* 27: 197-205.

Porcelli F, Triggiani D, Buck-Koehntop BA, Masterson LR, Veglia G (2009). *J Biol Inorg Chem.* 14:1219-25.

Powers MF, Beavis AD (1991). *J Biol Chem.* 266:17250-6.

Ranelletti F O, Rucci R, Larocca L M. (1992). *Int. J. Cancer* 50: 486-492.

Ricci RW, Nesta JM (1976) *J Phys Chem* 80:974-980.

Rice-Evans C A, Miller N J, Paganga G. (1996). *Free Radic. Biol. Med.* 20: 933-956.

Rice-Evans C. (2001) . *Curr. Med. Chem.* 8: 797-807.

Rice-Evans C.(1995). *Biochem. Soc. Symp.* 61: 103-116.

Rodak J, Grygiewski R J. (1996). *Pol. J. Pharmacol.* 48: 555-564.

Roth A, Schaffner W, Hertel C. (1999). *Journal of neuroscience research* 57: 399-404.

Rudel H, Muller J, Steinhanses J, Schroter-Kermani C (2007) *Chemosphere* 66:1884-1894.

Ruppert PH, Walsh TJ, Reiter LW, Dyer RS (1982). *Neurobehav Toxicol Teratol.* 4:135-9.

Sadiki A, Williams DT (1996). *Chemosphere.* 32:1983-92.

Saito I, Sugiyama H, Yamamoto A, Muramatsu S, Matsuura T (1984) *J Am Chem Soc* 106:4286-4287.

Scambia G, Ranelletti F O, Benedetti P P, Piantelli M, Rumi C, Battaglia F, Larocca L M, Capelli A, Mancuso S. (1990). *Int. J. Cancer*, 46: 1112-1116.

Scambia G, Ranelletti FO, Benedetti Panici P. (1990). *Anticancer Drugs (ENGLAND)*, 1:45-48.

Schiff PB, Fant J, Horwitz SB (1979). *Nature*. 277:665-7.

Schiff PB, Horwitz SB (1980). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77:1561-5.

Schiff PB, Horwitz SB (1981). *Biochemistry*. 20:3247-52.

Seibert H, Morchel S, Gulden M (2004) *Cell Biol Toxicol* 20:273-283.

Shao Z M, Wu J, Shen Z Z, Barsky S H. (1998). *Cancer Research* 58: 4851-4857.

Shintani N, Ogita K, Hashimoto H, Baba A (2007) *Yakugaku Zasshi* 127:451-461.

Shintani T, Klionsky DJ (2004). *Science*. 306:990-5. Review.

Shizuka H, Serizawa M, Shimo T, Saito I, Matsuura T (1988) *J Am Chem Soc* 110:1930-1934.

Stoner HB, Barnes JM, Duff JI (1955). *Br J Pharmacol Chemother*. 10:16-25.

Stridh H, Cotgreave I, Muller M, Orrenius S, Gigliotti D (2001) *Chem Res Toxicol* 14:791-798.

Stridh H, Gigliotti D, Orrenius S, Cotgreave I (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 266:460-465.

Stridh H, Orrenius S, Hampton MB (1999) *Toxicol Appl Pharmacol* 156:141-146.

Syng-ai C, Basu Baul TS, Chatterjee A (2002). *Mutat Res*. 513:49-59.

Takanashi H, Aiso S, Hirano I, Matsushima T, Sugimura T. *Journal of Food Safety* 5: 55-60.

Terry AV Jr. (2006). In: Levin ED, Buccafusco JJ, editors. *Animal Models of Cognitive Impairment*. Boca Raton (FL): CRC Press. Chapter 2.

Thompson TA, Lewis JM, Dejneka NS, Severs WB, Polavarapu R, Billingsley ML (1996). *J Pharmacol Exp Ther*. 276:1201-16.

Thompson TA, Lewis JM, Dejneka NS, Severs WB, Polavarapu R, Billingsley ML (1996) *J Pharmacol Exp Ther* 276:1201-1216.

Toggas SM, Krady JK, Billingsley ML (1992) *Mol Pharmacol* 42:44-56.

Tzowara-Karayanni S M, Philianos S M. (1981). *Quarterly Journal of Crude Drug Research*.

Tzowara-Karayanni S M, Philianos S M. (1982). *Microchemical Journal* 27: 155-161.

Uchiyama Y (2001). *Arch Histol Cytol.* 64:233-46. Review.

Viviani B, Rossi AD, Chow SC, Nicotera P (1995). *Neurotoxicology.* 16:19-25.

Von Ballmoos C, Brunner J, Dimroth P (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11239-11244

Voulvoulis N, Lester JN (2006) *Sci Total Environ* 371:373-382.

Wada A, Mie M, Aizawa M, Lahoud P, Cass AE, Kobatake E (2003) *J Am Chem Soc* 125:16228-6234.

Walle T. (2004). *Free radical biology and medicine* Vol. 36, 7: 829-837.

Walsh CT, Distefano MD, Moore MJ, Shewchuk LM, Verdine GL (1988) *FASEB J* 2:124-130.

Walts AE, Walsh CT (1988) *J Am Chem Soc* 110:1950-1953

Wenk GL (2006). *J. Clin. Psychiatry.* 67: 3-7.

Wey Y Q, Zhao X, Kariya Y, Fukata H, Teshigawara K, Uchida A. (1994) *Cancer Reserarch* 54: 4952-4957.

White JS, Tobin JM, Cooney JJ (1999). *J Microbiol.* 45(7):541-54. Review.

Williams R J, Spencer J P E, Rice-Evans C. (2004). *Free radical biology and medicine* Vol. 36, 7: 838-849.

Woodruff ML, Baisden RH, Whittington DL, Shelton NL, Wray S (1988). *Exp Neurol.* 102:130-43.

Wuertz S, Miller CE, Pfister RM, Cooney JJ (1991) *Appl Environ Microbiol* 57:2783-2789.

Xanthopoulou MN, Hadjidakou SK, Hadjiliadis N, Schürmann M, Jurkschat K, Michaelides A, Skoulika S, Bakas T, Binolis J, Karkabounas S, Charalabopoulos K (2003). *J Inorg Biochem.* 96:425-34.

Yamanishi Y, Ueno M, Ogura H. (2007). *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 130:489-93. Review.

Yoshida M, Yamamoto M, Nikaido T. (1992). *Cancer Res.* 52: 6676-6681.

Zhai G, Liu J, He B, Zhang J, Zhou Q, Jiang G (2008) *Chemosphere* 72:389-399.

Zhang L. (2006). In: Levin ED, Buccafusco JJ, editors. *Animal Models of Cognitive Impairment.* Boca Raton (FL): CRC Press. Chapter 11.

Zhou J R, Mukherjee E T, Tanaka T, Blackburn G L, Clinton S K. (1998). *Cancer Reserarch* 58: 5231-5238.

Zimma D, Powalka B. (1990). *Annales Academiae Medicae.*

