ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902070087A1

Publication Date

20140119

Applicant

VITALAB S.R.L.

Title

COMPOSIZIONI COSMETICHE A BASE DI ESTRATTI IDROSOLUBILI DERIVATI DA CELLULE DI DOLICHOS IN COLTURA LIQUIDA.

Front page automatically generated by WIPO

Titolo: “Composizioni cosmetiche a base di estratti idrosolubili derivati da cellule di *Dolichos* in coltura liquida”

La presente invenzione si riferisce all’uso in campo cosmetico di estratti derivati da cellule staminali vegetali in coltura del genere *Dolichos*, al metodo per la produzione di detti estratti e alle relative composizioni comprendenti detti estratti per l’uso in dermocosmesi, ed in particolare per combattere l’invecchiamento cutaneo dovuto ai raggi UV.

L'invecchiamento cutaneo può essere sia intrinseco o cronologico che estrinseco, provocato cioè da fattori esterni. L'invecchiamento cutaneo intrinseco è un processo genetico, tempo dipendente, che coinvolge l'intero organismo ed anche la pelle. L'invecchiamento estrinseco è provocato da fattori esterni come il fumo, l'inquinamento o i raggi ultravioletti, questo ultimo tra tutti i fattori è sicuramente quello più importante, perché contribuisce fortemente al danneggiamento della pelle.

A seconda della loro lunghezza d’onda (λ) le radiazioni ultraviolette (UV) possono essere suddivise in due grandi categorie:

- UVB – lunghezza d’onda compresa fra 290 e 320 nanometri – radiazioni estremamente energetiche, ma non molto penetranti, sono assorbite dallo strato più superficiale della pelle, l'epidermide. Sono dannose per la pelle al punto da essere

responsabili del 65% dei tumori cutanei.

- UVA – lunghezza d'onda compresa fra 320 e 400 nanometri – radiazioni meno potenti delle precedenti ma molto penetranti, sono in grado di raggiungere il derma, ovvero il tessuto connettivale sottostante l'epidermide. Favoriscono l'insorgenza di varie forme di cancro alla pelle. Il 4,9% dell'energia solare è costituita dai raggi UVA.

Le radiazioni UV agiscono sulla pelle provocando una serie di danni che nel loro insieme portano ad un precoce invecchiamento cutaneo, o nei casi più estremi, all'insorgenza di tumori (Yaar *et al.* 2007).

Nello specifico, le potenti radiazioni UVB causano danni significativi al DNA e scatenano una reazione infiammatoria nella pelle, comunemente chiamata eritema solare. Sull'altro fronte, le radiazioni UVA causano una serie di modifiche della struttura della pelle, danneggiando il derma, ed inducono danni indiretti attraverso la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). I ROS sono molecole in grado di agire, a loro volta, sui diversi componenti cellulari, ovvero proteine, acidi nucleici, membrane, danneggiandoli e compromettendo le funzioni biologiche della cellula.

Uno degli effetti più dannosi delle radiazioni UV coinvolge l'attività detossificante del proteasoma, un complesso multienzimatico preposto nella cellula alla degradazione ed all'eliminazione di proteine

danneggiate o non correttamente assemblate. La via proteolitica proteasomiale inizia nel citosol, dove le proteine da degradare vengono riconosciute e “ubiquitinilate”, si assiste cioè all’aggiunta di piccoli peptidi chiamati “ubiquitina”. In seguito a questa modifica le proteine bersaglio vengono riconosciute dalle subunità α del proteasoma ed idrolizzate in una serie di peptidi di 6-10 amminoacidi di lunghezza, contemporaneamente vengono liberate le molecole di ubiquitina. I prodotti della degradazione sono disponibili per essere riutilizzati nella sintesi di nuove proteine. L'attività del proteasoma risulta ridotta in seguito ad esposizione ai raggi UV e ciò è dovuto ad una diretta ossidazione dei suoi componenti, una ridotta espressione delle sue subunità ed alla presenza di inibitori specifici derivanti dall'ossidazione dei lipidi di membrana (Bulteau et al. 2002).

Anche il metabolismo cellulare subisce danni diretti in seguito ad esposizione a raggi UV. I mitocondri sono organelli, presenti in tutte le cellule eucariotiche, la cui funzione principale è quella di compiere le trasformazioni energetiche indispensabili per le funzioni cellulari: attraverso la respirazione producono energia sotto forma di ATP, in un processo che comporta il consumo di ossigeno.

I mitocondri sono strutture molto delicate che in presenza di particolari stress, fisici o chimici, perdono la propria funzionalità ed in casi di stress

prolungato vengono inattivati. I raggi ultravioletti sono in grado di danneggiare il DNA mitocondriale, con conseguente perdita di funzione e riduzione nella produzione di molecole di ATP. Il DNA mitocondriale (mtDNA) è un DNA circolare a doppio filamento di circa 16500 basi di lunghezza, che codifica per alcuni dei componenti della catena di trasporto degli elettroni, componenti importanti nella parte finale del processo di respirazione. E' stato riportato che una delezione di circa 5000 basi è spesso ritrovata nelle cellule della pelle sottoposta a raggi UV ed è circa 10 volte più frequente in pelli esposte al sole che in pelli protette; la delezione riguarda sempre la stessa porzione di DNA mitocondriale definita per questo "common deletion" o delezione comune (Pavicic *et al.* 2009). Un ruolo molto importante nei mitocondri è svolto da SIRT-3, proteina della famiglia delle sirtuine, coinvolta nella regolazione del metabolismo cellulare: la sua sovra-espressione in cellule in coltura porta ad un aumento della respirazione con conseguente aumento di sintesi di molecole di ATP e riduzione della quantità di ROS (Hallows *et al.* 2006).

Un altro degli effetti dannosi delle radiazioni UV coinvolge il derma, tessuto connettivale sottostante l'epidermide, composto da una popolazione cellulare di fibroblasti dispersa in una matrice intercellulare. I fibroblasti sono preposti alla sintesi delle fibre di collagene ed elastina: le prime hanno funzione di sostegno e resistenza, le seconde assicurano elasticità

alla cute. In seguito a radiazione UV si assiste ad un aumento della degradazione delle fibre di collagene e di elastina, la pelle perde tono ed elasticità e si osserva la formazione delle rughe.

Le metalloproteinasi (MMPs, matrix metalloproteinases) costituiscono una famiglia di endo-peptidasi calcio-dipendenti, responsabili della digestione delle proteine della matrice extracellulare, come collagene, gelatina e stromielina. Tra le MMPs, le più importanti sono le MMP-1 e -3 che vengono definite collagenasi in quanto entrambe sono capaci di degradare diversi tipi di collagene. Le radiazioni UV favoriscono la sovrapproduzione delle MMPs, con conseguente aumento della degradazione del collagene (Fisher et al. 2002). Oltre a causare l'aumento delle MMPs, le radiazioni provocano danni alle fibre di elastina: in seguito all'esposizione agli UV si assiste ad un accumulo anormale di fibre di elastina degradate ad opera di enzimi specifici, le elastasi (Imokawa, 2009).

Un altro potente effetto delle radiazioni è quello di scatenare una reazione infiammatoria della pelle. L'infiammazione è un meccanismo di difesa del nostro organismo da attacchi da stimoli esterni di diversa natura, termici, fisici, chimici e biologici, quali ad esempio batteri virus o anche radiazione UV. La reazione infiammatoria coinvolge una serie di eventi che portano un aumento della permeabilità vascolare con conseguente richiamo delle cellule del sistema immunitario da parte di fattori chemiotattici. Il

reclutamento di queste cellule, in particolare dei granulociti neutrofili, porta alla degradazione del tessuto interessato dal processo infiammatorio attraverso la produzione, da parte di queste cellule, di elastasi e collagenasi (Rijken et al. 2011). La pelle perde elasticità e resistenza, si assiste ad un indebolimento generale ed ad un suo precoce invecchiamento. Bloccare l'infiammazione significa bloccare gli effetti della risposta infiammatoria provocata dagli UV ed il danneggiamento del tessuto. Potenti mediatori dell'infiammazione sono l'ossido nitrico (NO) e le prostaglandine, molecole che vengono secrete dai macrofagi, cellule del sistema immunitario. I macrofagi attivati esprimono l'enzima responsabile delle sintesi dell'ossido nitrico, "inducible Nitric Oxide Synthase" (iNOS): una sovraespressione di iNOS porta ad un alto livello di NO ed all'attivazione di una potente reazione infiammatoria nei tessuti (Korhonenet al 2005). Anche le prostaglandine giocano un ruolo importante nella risposta infiammatoria, l'enzima limitante nella loro sintesi è la ciclossigenasi, in particolare COX-2 è quella attivata in seguito a stimoli esterni (Smith *et al.* 2000).

Ad oggi esistono in commercio solo prodotti cosmetici che agiscono da filtro solare nella protezione dall'attacco dei raggi ultravioletti. I filtri solari sono sostanze costituite da molecole che riescono a riflettere ma anche ad assorbire le radiazioni, per poi rilasciarle sotto forma di calore:

quindi se da un lato il filtro solare evita che la pelle assorba troppi UV, dall'altro può determinare un danno alle cellule degli strati più profondi a causa dei raggi infrarossi prodotti. Inoltre, i filtri solari possono essere instabili, irritanti, e non completamente efficaci per ogni tipo di radiazione UV e, cosa più importante, non riparano i danni che le radiazioni UV causano alle cellule della pelle e alle loro strutture subcellulari.

Sulla base di quanto esposto appare evidente l'esigenza di disporre di nuove composizioni cosmetiche da impiegarsi vantaggiosamente per il trattamento e la prevenzione dell'invecchiamento cutaneo indotto dai raggi ultravioletti, a base di principi attivi in grado di garantire una più completa ed efficace protezione della pelle agendo in sinergia su diversi meccanismi di protezione e riparo delle cellule dalle radiazioni.

Le piante del genere *Dolichos*, appartenente alla famiglia delle leguminose, comprendono centinaia di specie (*lablab*, *biflorus*, *pruriens*, etc..) sia tropicali che subtropicali, che hanno un eccellente valore nutrizionale in termini di proteine, calorie, vitamine e minerali e che sono considerate preziose fonti alimentari delle diete. Esse contengono inoltre importanti molecole ad azione antiossidante e curativa, come acidi fenolici e derivati, e tannini (Garimella et al., 2003), quindi gli estratti sono sfruttabili per diverse applicazioni biotecnologiche, come quella cosmetica.

Allo scopo di sviluppare un prodotto cosmetico contenente un estratto derivato da piante di *Dolichos*, preferibilmente da *Dolichos biflorus*, da utilizzare per applicazioni cosmetiche per contrastare i danni da fotoinvecchiamento, ovvero l'invecchiamento cutaneo causato dall'esposizione ai raggi UV, indicato come "photoaging", abbiamo allestito colture cellulari liquide a partire da piccoli pezzi di foglie. Dopo aver ottenuto le cellule indifferenziate in forma di "callo" da tessuti fogliari, sono state sviluppate colture di cellule dense, le quali sono state processate al fine di ottenere estratti idrosolubili, secondo la procedura descritta in seguito.

I vantaggi legati all'utilizzo di estratti derivati da cellule in coltura, invece che da seme o da pianta, sono molteplici: i) gli estratti ottenuti dalle cellule sono sempre privi di sostanze contaminanti tossiche (come pesticidi e fertilizzanti) e non presentano nessun potenziale rischio di agenti patogeni ambientali, in quanto crescono in condizioni controllate di laboratorio; ii) le caratteristiche degli estratti ottenuti sono standardizzate, e non dipendono dalle stagioni, condizioni ambientali e ritmi circadiani come nelle piante, questo garantisce sempre le stesse caratteristiche di qualità del prodotto ottenuto; iii) le cellule in coltura sono totipotenti e nello stesso tempo estremamente versatili perché possono essere manipolate con facilità ed indotte a produrre una maggiore quantità di sostanze desiderate,

semplicemente cambiando le condizioni di crescita o aggiungendo sostanze naturali con azione stimolante; iv) gli estratti ottenuti dalle cellule sono privi di sostanze allergizzanti o irritanti (come le lectine presenti, ad esempio, proprio nei semi di numerose leguminose) e non presentano nessun potenziale rischio di reazione allergica negli individui. Tutte queste caratteristiche rendono le cellule staminali vegetali in coltura una preziosa fonte di molecole e possono essere utilizzate come biofabbriche di principi attivi per combattere l'invecchiamento cutaneo.

Gli autori della presente invenzione hanno ora messo a punto un metodo di estrazione da cellule di *Dolichos* in coltura liquida, e così individuato un estratto capace di agire sui diversi meccanismi molecolari. Le composizioni cosmetiche a base di questo estratto hanno mostrato un effetto di protezione sul DNA, sia nucleare che mitocondriale, sull'attività dei mitocondri, sulla capacità detossificante del proteasoma e sulla protezione della matrice extracellulare. L'estratto si è inoltre mostrato attivo nel bloccare una risposta infiammatoria nelle cellule della pelle.

Forma pertanto oggetto della presente invenzione un metodo per l'estrazione di una miscela di sostanze idrosolubile da cellule di *Dolichos* in coltura liquida, comprendente le seguenti fasi a)-g):

a) de-differenziamento su substrato solido delle cellule del tessuto vegetale di *Dolichos*,

preferibilmente prelevato da foglie in calli;

b) prelievo dei calli e allestimento delle colture liquide;

c) crescita di cellule vegetali di *Dolichos* in coltura liquida;

d) separazione delle cellule vegetali dal mezzo di crescita;

e) omogeneizzazione delle cellule vegetali in solvente idrofilo;

f) centrifugazione dell'omogenato per isolare l'estratto idrosolubile, rappresentato dal sopranatante;

g) raccolta della frazione idrosolubile e liofilizzazione per ottenere una polvere fine ed omogenea.

Ai sensi della presente invenzione con cellule di *Dolichos* si intendono cellule totipotenti derivate dal de-differenziamento e proliferazione di cellule prelevate da diversi tessuti della pianta (preferibilmente da cellule della foglia).

Preferibilmente, le cellule del tessuto vegetale di cui al punto a) derivano da *Dolichos biflorus*.

Secondo una forma preferita di realizzazione di tale metodo di estrazione, l'omogeneizzazione della fase e) avviene in un mortaio con soluzioni acquose (tamponi salini, soluzioni alcoliche, soluzioni contenenti acidi o basi) e sabbia di silice per facilitare la rottura delle cellule.

Preferibilmente, le fasi a) – g) sono realizzate secondo le seguenti modalità e condizioni:

a) Induzione dei calli da tessuti fogliari: foglie intere vengono prelevate da piante del genere *Dolichos* e sterilizzate in etanolo 70% (15 minuti) e 1% ipoclorito di sodio (15 minuti). Le foglie, dopo essere state lavate per 3 volte in acqua per rimuovere l'alcol e l'ipoclorito, vengono tagliate in porzioni di circa 0,5 cm^2 ciascuno con una lama sterile. Tutti i frammenti di foglia vengono posti su un mezzo solido B5 Gamborg medium contenente: plant agar 7,5 g/L, mio-inositolo 500 mg/L, saccarosio 30 g/L, 2,4D 1 mg/L, kinetina 0,1 mg/L, adenina 1 mg/L, pH 5,7. Dopo circa 5 settimane di incubazione a 20°C al buio, si ottengono i calli per de-differenziamento e proliferazione delle cellule della foglia. I calli vengono escissi e trasferiti su mezzo di coltura fresco ogni 3-4 settimane.

b) Prelievo dei calli ed allestimento delle colture liquide: Quando i calli hanno raggiunto un diametro di circa 1 cm (peso di circa 50 mg), essi vengono prelevati e dispersi in beute contenenti 50 ml di mezzo di coltura AB1 liquido (stessa composizione del mezzo solido ma senza agar). Le beute vengono poste al buio su uno shaker con agitazione orbitale di 100 rpm. Dopo circa 10 giorni, i calli si sono disgregati, a formare singole cellule o aggregati di cellule più piccoli, e le cellule sono proliferate in modo da formare una coltura densa.

c) Crescita delle cellule di *Dolichos* in coltura liquida: la crescita delle cellule ottenute da espianti di tessuto vegetale può essere condotta inoculando 100 ml di una coltura densa di cellule in 1 L di mezzo di coltura AB1.

d) Separazione delle cellule: può essere effettuata mediante centrifugazione a 2000 g o sedimentazione delle cellule per rimuovere il loro mezzo di coltura. Le cellule vengono poi lavate in acqua distillata e congelate a -80 °C.

e) Omogenizzazione delle cellule: una volta scongelate le cellule vengono omogenizzate preferibilmente in tampone acquoso PBS 1X (NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, NaH_2PO_4 12 mM, KH_2PO_4 1,76 mM, pH 7,4), in rapporto di 2:1 volume/peso, in presenza di sabbia di silice. In alternativa al PBS possono essere utilizzati altri tamponi salini (es. carbonati, citrati), soluzioni alcoliche (es. etanolo sciolto in acqua in concentrazioni da 1 a 99%), soluzioni acide o basiche (es. acido acetico o idrossido di sodio a concentrazioni da 0.1 a 0.01%), o soluzioni di glicerina in acqua (1-90%). L'omogenizzazione può essere effettuata in un contenitore idoneo quale un mortaio di ceramica e con un pestello anch'esso di ceramica, precedentemente raffreddati. Per volumi maggiori si possono utilizzare recipienti più grandi, anche metallici, dove le cellule possono essere omogeneizzate con lame metalliche, utilizzando sia omogeneizzatori da laboratorio o industriali, che

presse.

f) Ottenimento dell'estratto idrosolubile: una volta ottenuto un lisato cellulare omogeneo tramite omogeneizzazione, il campione di cellule viene centrifugato, ad esempio a 8.500 rpm per circa 15 minuti a 4°C, per precipitare le componenti insolubili. Il sopranatante ottenuto dalla centrifugazione viene prelevato: esso costituisce l'estratto idrosolubile.

g) raccolta dell'estratto e liofilizzazione: l'estratto ottenuto nella fase f) viene portato a secco in un liofilizzatore o una camera di essiccazione o spray-dryer per eliminare il solvente. La polvere ottenuta viene sciolta in acqua (2 ml ogni grammo di polvere) e la soluzione ulteriormente diluita in un solvente di tipo alcolico, preferibilmente in glicerolo, in modo da ottenere soluzioni idro-alcoliche contenenti da 12 mg a 0,1 mg, preferibilmente da 5 mg a 0,4 mg e ancora più preferibilmente 0,4 mg di estratto ogni ml di solvente (ovvero soluzioni al 12%-0,1%, preferibilmente al 5% - 0,4% e ancora più preferibilmente allo 0,4%). Queste soluzioni rappresentano la materia prima che può essere ulteriormente diluita per la fabbricazione dei prodotti cosmetici pronti per le applicazioni.

Sono pertanto oggetto della presente invenzione le soluzioni idro-alcoliche contenenti l'estratto idrosolubile ottenuto secondo il processo dell'invenzione, preferibilmente ad una concentrazione compresa tra il 12% - 0,1%, più preferibilmente

compresa tra il 5% - 0,4% ed ancora più preferibilmente alla concentrazione 0,4%.

Particolarmente preferite sono le soluzioni idroalcoliche dove il solvente è glicerolo.

Formano altresì oggetto dell'invenzione composizioni cosmetiche comprendenti l'estratto idrosolubile ottenibile mediante il metodo precedentemente descritto, o le soluzioni idro-alcoliche di detto estratto, dove detto estratto o le sue soluzioni idroalcoliche sono contenuti nelle composizioni cosmetiche dell'invenzione in concentrazioni variabili da 0,0001% a 10%, preferibilmente da 0,001% a 8% e ancora più preferibilmente alla concentrazione dello 0,002%, dove dette percentuali sono espresse in peso rispetto al peso totale della composizione, insieme a veicoli, eccipienti e/o adiuvanti cosmeticamente accettabili.

Tali composizioni possono essere sotto forma di creme, gel, lozioni cosmetiche per l'applicazione cutanea, emulsioni A/O e O/A, latti, nonché rossetti, fondotinta e ombretti. I veicoli che possono essere impiegati nelle composizioni dell'invenzione sono scelti tra lipidi, ovvero esteri glicerici (o trigliceridi) in forma di oli e burri (come ad esempio trigliceride caprico/caprilico o burro di caritè), esteri non glicerici, quali esteri tra acidi grassi e alcol grassi, i sali degli acidi grassi quali gli stearati, glicoli (esempio glicole polietilenico, propilenico o butilenico), alcoli grassi (alcol cetilico), liposomi

multilamellari, polisaccaridi (fibre di acacia, ciclodestrine o gomma xantana) oppure silicati. Possono essere utilizzati anche idrocarburi paraffinici, quali ad esempio olio minerale (paraffina liquida), vaselina filante o petrolato, paraffine solide come la cera microcristallina, la ceresina o l'ozocherite, e/o idrocarburi terpenici, quali ad esempio squalene, squalano o pristano.

Infine, l'invenzione si riferisce all'uso in campo cosmetico dell'estratto idro-solubile e delle composizioni cosmetiche a base di detto estratto, in particolare per la prevenzione e/o il trattamento dei danni causati alla pelle dai raggi ultravioletti oppure per la prevenzione e/o il trattamento del fotoinvecchiamento della pelle.

Infine, l'invenzione si riferisce ad un metodo di trattamento cosmetico per la prevenzione e/o il trattamento dell'invecchiamento cutaneo comprendente l'applicazione sulla cute in necessità di trattamento di una quantità cosmeticamente efficace di una composizione come sopra descritta.

La presente invenzione verrà ora descritta a titolo illustrativo, ma non limitativo, secondo sue forme preferite di realizzazione con particolare riferimento alle figure dei disegni allegati, in cui:

- **la figura 1** mostra l'effetto sulla attività del proteasoma esercitato da tre diverse concentrazioni dell'estratto idrosolubile di *Dolichos* (0,0004%;

0,002%; 0,01%) su cheratinociti irradiati con 10 mJ UVA e 70 mJ UVB. Sull'asse delle Y del grafico è riportata l'attività proteolitica espressa in percentuale rispetto ad un controllo non irradiato (stabilito arbitrariamente come 100%). L'attività è stata calcolata utilizzando un substrato fluorescente, un peptide coniugato con l'aminometil-cumarina, che viene idrolizzato dalla subunità beta5 del proteasoma. I valori sono stati calcolati a partire da misure di fluorescenza emessa e misurata a 465 nm.

- **la figura 2** mostra l'analisi relativa dei danni al DNA prodotti da radiazioni UVB e acqua ossigenata (H_2O_2) e l'azione protettiva esercitata dall'estratto idrosolubile ottenuto dalle cellule di *Dolichos*. L'analisi è stata condotta con la tecnica del "saggio Comet" che permette di visualizzare e quantificare la frammentazione dei nuclei delle cellule in base alla lunghezza della scia prodotta. I grafici riportano sull'asse delle Y le lunghezze medie delle scie dei campioni di cellule controllo (non trattate), di cellule stressate con UVB 20 mJ o con 175 μM di H_2O_2, e cellule stressate e trattate con tre diverse concentrazioni dell'estratto idrosolubile di *Dolichos*. Come controllo positivo nell'esperimento in figura 2A è stato usato il trolox (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico), un analogo solubile della vitamina E, noto per la sua capacità di proteggere dai danni delle radiazioni UV.

la figura 3 mostra l'analisi relativa dei danni al DNA

mitocondriale prodotti da radiazioni UVB e l'azione protettiva esercitata dall'estratto idrosolubile ottenuto dalle cellule di *Dolichos*. Sull'asse delle Y del grafico è riportato il rapporto tra il DNA mitocondriale danneggiato su quello totale, in cellule di controllo non irradiate, in cellule irradiate con UVB 1,5 mJ ed in cellule irradiate e trattate con l'estratto idrosolubile di *Dolichos* alla concentrazione 0,01%. Come controllo positivo sono stati usati la vitamina E ed il Coenzima Q10, noti per la loro capacità di proteggere i mitocondri dai danni indotti da agenti stressanti.

- **la figura 4** mostra il saggio effettuato per valutare la quantità di ATP prodotta dalle cellule. Il saggio è stato effettuato su cellule di controllo non stressate, su cellule stressate con UVB 40 mJ e su campioni trattati con diverse concentrazione dell'estratto idrosolubile di *Dolichos* sia in assenza che in presenza di radiazioni UVB. Come controllo positivo è stato usato il trolox (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico), un analogo solubile della vitamina E, noto per la sua capacità di proteggere dai danni delle radiazioni UV. Sull'asse delle Y è riportata la quantità di ATP misurata nei diversi campioni.

- **la figura 5** mostra l'analisi del consumo di ossigeno in cellule di controllo ed in cellule trattate con tre diverse concentrazioni dell'estratto di *Dolichos* (0,002%; 0,01%; 0,1%). Nel grafico sono riportati,

sull'asse delle Y, i valori di fluorescenza correlati al consumo di ossigeno, misurati nelle cellule ogni 30 minuti per 150 minuti. Come controllo positivo è stato usato il glucosio, noto per la sua capacità di attivare il metabolismo cellulare e quindi il consumo di ossigeno.

- **la figura 6** mostra l'analisi dell'espressione del gene SIRT3 dopo 20 ore dal trattamento con due concentrazioni di estratto di *Dolichos* (0,02%; 0,05%) e del Coenzima Q10 (usato come controllo positivo) rispetto ad un campione di controllo non trattato. I livelli di espressione dei campioni di cellule trattate sono stati espressi in percentuali rispetto al controllo di cellule non trattate, stabilito arbitrariamente come 100%;

- **la figura 7** mostra l'analisi dell'espressione dei geni delle metalloproteinasi (MMP-1, MMP-3), misurata mediante RT-PCR, in seguito a radiazioni UVA su fibroblasti in coltura. Le cellule sono state pretrattate con due diverse concentrazioni dell'estratto di *Dolichos* (0,002%; 0,01%), stressate con UVA 10 J/cm2 e poi incubate nuovamente con gli estratti per 6 ore prima dell'analisi di espressione. I livelli di espressione dei campioni di cellule trattate sono stati espressi in percentuali rispetto al controllo di cellule non trattate e non irradiate, stabilito arbitrariamente come 100%;

- **la figura 8** mostra l'effetto di tre diverse concentrazioni di *Dolichos* (0,025%; 0,05%; 0,1%)

sull'attività dell'elastasi. Il saggio è stato effettuato in vitro, mediante l'utilizzo di un substrato fluorimetrico; sull'asse delle Y è riportata l'attività dell'enzima espressa come milliunità (mU).

- **la figura 9** mostra il risultato dell'analisi quantitativa dell'ossido nitrico (NO) in macrofagi trattati con due diverse concentrazioni di estratto idrosolubile di *Dolichos* (0,002%; 0,01%) in seguito a stimolazione (trattamento con un lipopolisaccaride di derivazione batterica, LPS), utilizzando un saggio colorimetrico. Come controllo positivo è stato usato il composto L-1-tosilamide-2-feniletilclorometilchetone (TPCK), noto per le sue proprietà anti-infiammatorie. Sull'asse delle Y sono riportate le micromoli di NO.
- **la figura 10** mostra l'analisi dell'espressione dei geni iNOS e COX2, misurata mediante RT-PCR, in seguito a stimolazione con LPS su macrofagi in coltura. Le cellule sono state pretrattate con due diverse concentrazioni dell'estratto di *Dolichos* (0,02%; 0,1%), stimolate con LPS 1 μg/ml e poi incubate nuovamente con gli estratti per ulteriori 4 ore prima dell'analisi di espressione. I livelli di espressione dei campioni di cellule trattate sono stati espressi in percentuale rispetto al controllo non trattato ma stimolato con LPS, stabilito arbitrariamente come 100%. Come controllo positivo è stato usato il TPCK.

A titolo esemplificativo, ma non limitativo della presente invenzione, si riportano di seguito alcuni

esempi relativi alla preparazione dell'estratto idrosolubile ottenuto da cellule di *Dolichos*, ed alla loro attività biologica in campo cosmetico.

ESEMPIO 1: ***Preparazione dell'estratto idrosolubile ottenuto da cellule di Dolichos e valutazione della capacità dell'estratto di proteggere e riparare dai danni causati da radiazioni UV.***

MATERIALI E METODI

Estrazione della miscela idrosolubile dalle cellule di Dolichos:

100 g di cellule di *Dolichos biflorus* in coltura liquida sono state sedimentate per centrifugazione e lavate in acqua distillata.

Tutto il sopranatante è stato eliminato per aspirazione ed il pellet di cellule è stato congelato a -80°C fino al suo utilizzo. Le cellule una volta scongelate sono state omogeneizzate in un mortaio con 200 ml di tampone PBS contenente sabbia di silice, che favorisce la rottura delle cellule. L'omogeneizzato è stato centrifugato a 8.500 rpm per 15 min a 4°C e il sopranatante, costituente l'estratto idrosolubile, prelevato e conservato a -80°C. L'estratto è stato successivamente liofilizzato per circa 3 giorni in modo da ottenere una polvere fine. La polvere ottenuta (2 g) è stata sciolta in acqua distillata sterile alla concentrazione del 10%, e poi ulteriormente diluita alla concentrazione richiesta da ogni tipo di saggio

biologico.

L'estratto è stato testato su cellule NIH3T3 (linea di fibroblasti di topo) per stabilirne le dosi di utilizzo e per escludere un'eventuale citotossicità, e su diversi altri tipi cellulari per verificarne il ruolo protettivo e/o di riparo in seguito ai danni prodotti dalle radiazioni UV: su cheratinociti HaCat per l'attività detossificante del proteasoma; su fibroblasti NIH3T3 e cheratinociti HaCat per i saggi sul DNA nucleare e mitocondriale, e per l'attività dei mitocondri; su fibroblasti primari neonatali HDFn per i saggi sulla matrice extracellulare, e infine sui macrofagi Raw 264.7 per la misura della capacità antiinfiammatoria.

Saggio di citotossicità

Questo saggio si basa sull'uso del MTT[3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazoliobromuro]descritto da Mosmann nel 1983 per la prima volta. E' basato sulla capacità dell'enzima deidrogenasi mitocondriale delle cellule vitali di idrolizzare l'anello tetrazolico del MTT (di colore giallo chiaro) e formare cristalli di formazano (di colore blue scuro). Tali cristalli sono impermeabili alle membrane cellulari e si accumulano nel citoplasma delle cellule metabolicamente attive. Il numero di cellule vive e sane è così direttamente proporzionale al livello di formazan prodotto.

Cellule NIH3T3, in numero iniziale di 1,3 x 10^4 per pozzetto, sono state cresciute in piastre da 96 pozzetti in mezzo di coltura DMEM (Lonza),

supplementato con il 10% di Fetal Calf Serum, per circa 20 ore. Dopo il trattamento con le diverse concentrazioni della miscela per 3 ore, le cellule sono state lavate in PBS ed incubate con 100 µl/pozzetto di "tampone di reazione" contenente: 10 mM di Hepes, 1,3 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgSO_4$, 5 mM di glucosio e 0,5 mg/ml di substrato colorimetrico MTT in tampone PBS a pH 7,4. Dopo 3 ore di incubazione a 37°C, 5% CO_2, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di soluzione solubilizzante contenente 10% di TritonX-100, 0,1 N di HCl in isopropanolo assoluto. Dopo 30 minuti, la reazione colorimetrica è stata misurata a 595 nm con il lettore di piastre Victor3 (PerkinElmer).

Saggio ORAC

Il saggio è utilizzato per misurare il potere anti-ossidante totale dei composti mediante una reazione "*in vitro*". Il saggio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) è basato sulla capacità di un composto di inibire l'ossidazione di un fluoroforo, generalmente la fluoresceina, da parte di un potente ossidante, 2,2'-azobis(2-amidinopropano) diidrocloruro (AAPH) (Huang *et al.*, 2002). 25 µl di diluizioni degli estratti in tampone fosfato 75 mM, pH 7,4, sono stati divisi in aliquote in piastre da 96 pozzetti e 150 µl di soluzione di fluoresceina (8,5 nM in tampone fosfato) sono stati aggiunti ad ogni campione. Dopo un incubazione di 15 minuti a 37°C, 25 µl di una soluzione di AAPH (152 mM in tampone fosfato) sono stati aggiunti ad ogni pozzetto e la reazione di ossidazione della

fluoresceina è stata monitorata a 535 nm per 50 minuti mediante un lettore di piastre EnVision (PerkinElmer).

Il potere antiossidante dei campioni è stato calcolato seguendo la procedura descritta da Huang *et al.*, 2002. L'area sotto la curva (Area Under Curve, AUC) di ciascun campione e dello standard Trolox (un derivato della vitamina E che ha un forte potere riducente) è stata calcolata utilizzando uno dei software dello strumento. Dopo aver calcolato la curva che mette in relazione i valori di concentrazione di Trolox con quelli delle AUC corrispondenti, i valori di AUC calcolati per ciascun campione sono stati convertiti in "micromoli di Trolox equivalenti" per litro.

Saggio sull'attività del proteasoma

5 x 10^4 cellule Hacat sono state poste in piastre da 96 pozzetti e mantenute in coltura per 20 ore in mezzo di coltura DMEM (Lonza) supplementato con il 10% Fetal Bovine Serum (FBS). Le cellule sono state irradiate con 70 mJ di UVB seguiti da 10 mJ di UVA e successivamente trattate con le diverse concentrazioni dell'estratto per sei ore. In seguito al trattamento le cellule sono state lavate con PBS ed incubate con un tampone di lisi freddo (10mM Tris-HCl, 0,5mM DDT, 5mM ATP, 0,035% SDS, 5mM MgCl2, pH 7,8) contenente 4 mM Suc-LLVY-AMC (Sigma-Aldrich), un substrato peptidico fluorescente coniugato con l'aminometil-cumarina. Tale substrato viene riconosciuto e tagliato dalla subunità beta5 del proteasoma. La fluorescenza emessa a 465 nm è stata

misurata per un'ora utilizzando il lettore di piastre EnVision (PerkinElmer).

Elettroforesi su cellule singole o "Saggio Comet"

Cellule NIH3T3, in numero iniziale di 1,5 x 10^5 per pozzetto, sono state cresciute in piastre da 6 pozzetti in mezzo di coltura DMEM (Lonza), supplementato con il 10% di Fetal Calf Serum, per 24 ore. Dopo un trattamento "over-night" con gli estratti di *Dolichos* e altri composti di controllo, le cellule sono state irradiate con 20 mJ UVB o stressate con H_2O_2 175uM. Ad un'ora dall'irradiamento e a 3 ore dall'aggiunta della H_2O_2, le cellule sono state staccate dalla piastra usando 1 ml/pozzetto di soluzione Sigma non-enzimatica e trasferite in provette Eppendorf per essere centrifugate a 15.000 rpm per 5 minuti. Le cellule sono state lavate in PBS 1X e risospese in circa 10-20 µl di PBS, a seconda della quantità di cellule recuperate. Alle cellule è stato aggiunto un volume di 80 µl di "Low Melting point Agarose" (LPMA) 0,5% in PBS, equilibrato a 37°C. Le cellule così disperse sono state poste su un vetrino precedentemente ricoperto di un sottile strato di "Normal Melting Agarose" (NMA). Un vetrino copri-oggetto è stato posto sopra la goccia di cellule, facendo attenzione a non romperle, e i vetrini sono stati poi posti in frigo a 4°C fino a quando lo strato di agarosio con le cellule si solidifica completamente (10-15 min). I copri-oggetto sono stati gentilmente rimossi dall'agarosio, e i vetrini posti in una soluzione di lisi fredda (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA,

10 mM Trizma Base pH 8,5, 1% TritonX-100) e lasciati per circa 2 ore a 4°C. Dopo aver rimosso i vetrini dalla soluzione, sono stati immersi in una camera elettroforetica contenente un tampone di corsa (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH>13). Dopo 10 minuti, un alimentatore di corrente collegato alla camera è stato acceso ed il potenziale regolato a 24V. I vetrini, dopo essere stati sottoposti ad elettroforesi per 20 minuti, sono stati trasferiti in tampone di neutralizzazione (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) per almeno 10 min. Dopo aver asciugato i vetrini, le cellule in agarosio sono state trattate con una soluzione di 10 μg/ml di Bromuro di Etidio, allo scopo di evidenziarne i nuclei in fluorescenza, e coperte con vetrini copri-oggetto per essere osservate al microscopio a fluorescenza.

Analisi della delezione sul DNA mitocondriale.

1,5 x 10^5 cellule Hacat sono state poste in piastre da 35mm e mantenute in coltura per 12 ore in un mezzo di coltura DMEM (Lonza), supplementato con il 10% di Fetal Bovine Serum. Dopo un trattamento di due giorni con gli estratti di *Dolichos* e altri composti di controllo, le cellule sono state irradiate con 1,5 mJ UVB. Ad un'ora dall'irradiamento le cellule sono state staccate dalla piastra ed il DNA cellulare è stato estratto dalle cellule utilizzando il QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Per misurare il contenuto di DNA mitocondriale danneggiato in ogni campione è stata eseguita una multiplex PCR, in cui è stato amplificato contemporaneamente il DNA danneggiato ed il DNA

mitocondriale totale. L'amplificazione del prodotto specifico, indicante la presenza della delezione comune, è stata eseguita utilizzando una coppia di oligonucleotidi (A1; A2) che si appaiano in un sito esterno alla regione della delezione. Questa coppia amplifica sia il DNA mitocondriale integro che quello deleto, ma i prodotti generati sono di lunghezza differente, rispettivamente di 5600 sul DNA integro e 632 su quello deleto.

Per l'amplificazione del DNA mitocondriale totale è stata utilizzata una coppia di oligonucleotidi (C1; C2) che amplificano un prodotto di 248 basi.

I prodotti di PCR sono stati separati su gel d'agarosio 1,5%, visualizzati utilizzando lo strumento Geliance (Perkin Elmer) ed analizzati densitometricamente utilizzando il software Genetools. I valori riportati nel grafico rappresentano il rapporto tra l'intensità della banda relativa al DNA mitocondriale danneggiato e quella della banda relativa alla quantità totale di DNA mitocondriale presente nel campione, in modo da avere un valore correlato alla reale quantità di DNA danneggiato e non dipendente dalla quantità di DNA mitocondriale totale presente in quel campione. Le sequenze delle coppie di oligonucleotidi utilizzate sono le seguenti:

A1: 5'gcagtaatattaataattttcatg 3' (SEQ. ID No. 1);

A2: 5'ctagggtagaatccgagtatgttg 3' (SEQ. ID No. 2);

C1: 5'atgcttgtaggacataataa 3' (SEQ. ID No. 3);

C2: 5'agtgggaggggaaaataatg 3' (SEQ. ID No. 4).

Saggio di misurazione dell'ATP.

6×10^3 cellule NIH3T3 sono state poste in piastre da 96 pozzetti e mantenute per 20 ore in mezzo di coltura DMEM (Lonza), supplementato con il 10% di Fetal Calf Serum. Le cellule sono state trattate per 2 ore con diverse concentrazioni dell'estratto di *Dolichos*, e con trolox 200 µM, usato come controllo positivo. Dopo il trattamento, le cellule sono state lavate con PBS ed incubate per 30 minuti in 50 µl di mezzo di coltura a temperatura ambiente. Un eguale volume di CellTiter-Glo (Promega) è stato successivamente aggiunto ai campioni, e miscelato per due minuti per indurre la lisi delle cellule: il CellTiter-Glo è una miscela contenente l'enzima luciferasi che, degradando il suo substrato (la luciferina, anch'essa presente nella miscela di reazione) genera un segnale luminoso. La reazione è dipendente dalla quantità di ATP presente. Il segnale luminoso emesso dai campioni è stato misurato a 595 nm dopo 15 minuti, usando un lettore di piastre Victor 3 (PerkinElmer). Come standard di riferimento sono state usate diluzioni scalari di ATP, da 5000 a 5 pMoli.

Saggio di misurazione del consumo di ossigeno.

2×10^5 cellule NIH3T3 sono state risospese nel mezzo di coltura DMEM + 10% FCS, aliquotate in piastre da 96 pozzetti e trattate con le diverse concentrazioni dell'estratto idrosolubile di *Dolichos* o con il glucosio (usato come controllo positivo) per un'ora. A ciascun campione è stato successivamente aggiunta una soluzione 5 mM di octaetilporfirina di platino (Pt-OEP, Sigma Aldrich) e 100 µl di olio minerale, per inibire gli

scambi di ossigeno con l'ambiente esterno. La presenza dell'ossigeno è capace di mascherare la fluorescenza emessa dalla porfirina: una riduzione del contenuto di ossigeno, durante la respirazione della cellula, porta ad un aumento del valore di fluorescenza. La piastra è stata incubata a 37° C ed il segnale fluorescente è stato misurato ogni 30 minuti per 2 ore e 30 minuti, utilizzando eccitazione ed emissione rispettivamente di 380 nm e 635 nm.

Analisi dell'espressione dei geni SIRT-3, MMP-1, MMP-3, iNOS e COX2 in cellule trattate con gli estratti,

Per l'analisi dell'espressione del gene SIRT-3 sono state utilizzate cellule HaCaT, per i geni MMP-1 e MMP-3 sono state utilizzate cellule HDFn mentre per i geni iNOS e COX2 sono state utilizzate cellule RAW *264.7*.

HDFn, HaCaT o RAW *264.7*, in numero iniziale di 1,5 x 10^5 per pozzetto, sono state cresciute in piastre da 6 pozzetti in mezzo di coltura DMEM (Lonza), supplementato con il 10% di Fetal Bovine Serum per 20 ore.

Le cellule sono state poi incubate con diverse concentrazioni dell'estratto o di altri composti utilizzati come controlli rispettivamente per 20 ore nel caso dell'analisi di SIRT-3 e per due ore nel caso dell'analisi delle MMPs, COX2 e iNOS. Per l'analisi dell'espressione di MMP-1 e MMP-3 le cellule dopo il trattamento sono state irradiate con 10 J/cm^2 e raccolte dopo 6 ore, mentre per l'analisi

dell'espressione di COX2 e iNOS le cellule sono state stimolate con 1 μg/ml di LPS e raccolte dopo 2 ore.

Per l'estrazione dell'RNA dai campioni di cellule è stato utilizzato un kit acquistato dalla Sigma. Dopo i trattamenti indicati, le cellule sono state lavate con PBS, staccate in buffer di lisi e sottoposte alla procedura di estrazione come da protocollo del kit. I campioni di RNA sono stati sottoposti ad un trattamento con DNasi I (Ambion) per eliminare il DNA genomico contaminante. 2 μl di ciascun campione sono stati caricati su gel di agarosio 1% in presenza di "loading dye" denaturante e quantizzati utilizzando come riferimento uno specifico marker per RNA (Fermentas). Per la quantificazione è stato usato il software Gene tools (Perkin Elmer). 300 ng di RNA totale è stato retrotrascritto usando l'enzima Trascrittasi Inversa (Fermentas).

Le reazioni di RT-PCR semiquantitativa sono state condotte utilizzando come standard interni la coppia di primer universali 18S primer/competimer (Ambion). I prodotti di PCR sono stati separati su gel d'agarosio 1,5%, visualizzati utilizzando lo strumento Geliance (Perkin Elmer) ed analizzati densitometricamente utilizzando il software Genetools. I valori riportati nei grafici rappresentano il rapporto tra l'intensità della banda relativa al gene in analisi e quella della banda relativa allo standard di riferimento 18S, in modo da avere un valore correlato alla reale espressione di quel gene e non dipendente dalla

quantità di RNA o di reagenti di PCR presenti in quel campione. Le sequenze delle coppie di oligonucleotidi utilizzate sono le seguenti:

SIRT-3 F: 5'ttggccaaggagctgtac 3' (SEQ. ID No. 5);

SIRT-3 R: 5'tggcaaaaggctccacct 3' (SEQ. ID No. 6);

MMP1-F: 5'tttgggctgaaagtgactgg 3' (SEQ. ID No. 7);

MMP1-R: 5'gggataacctggatccatag 3' (SEQ. ID No. 8);

MMP3-F: 5'ccattggatggagctgcaag 3' (SEQ. ID No. 9);

MMP3-R: 5'aagtgggcatctccattaatcc 3' (SEQ. ID No. 10);

iNOS-F: 5'acaacatcctggaggaagtg 3' (SEQ. ID No. 11);

iNOS-R: 5'tccatgcagacaaccttgg 3' (SEQ. ID No. 12);

Cox2-F: 5'cagcaaatccttgctgttcc 3' (SEQ. ID No. 13);

Cox2-R: 5'gatcatctctacctgagtg 3' (SEQ. ID No. 14).

Saggio dell'attività dell'elastasi

20 µg di estratto proteico totale ottenuto da HDFn, utilizzando un tampone di lisi contenente 100mM Tris-HCl, 0,1% Triton e 100mM NaCl a pH 8,0, sono stati incubati con l'estratto idrosolubile di *Dolichos* (a varie concentrazioni) per 30 minuti a 37°C. In seguito è stato aggiunto il substrato succinil-(Ala)3-p-nitroanilide alla concentrazione 1 mM in un tampone contenente 0,1mM $CaCl_2$. Lo sviluppo del colore è stato misurato a 405 nm ad 1-2 ore di reazione. Quantità scalari di elastasi porcina sono state utilizzate come standard di riferimento.

Saggio sul ossido nitrico

1,5 x 10^5 di cellule *RAW 264.7* sono state poste in piastre da 96 pozzetti e mantenute in coltura per 20 ore in un mezzo di coltura DMEM (Lonza), supplementato

con il 10% di Fetal Bovine Serum. Successivamente le cellule sono state trattate con l'estratto di *Dolichos* e con il TPCK (usato come controllo positivo) per 2 ore e stimolate successivamentee con LPS (2-5 mg/ml) per 18 ore. Alla fine della stimolazione le cellule sono state incubate con il reagente Griess, composto da N-(1-naftil)etilenadiammina e acido sulfanilico. L'assorbanza dei campioni è stata misurata a 548 nm utilizzando un lettore di piastre Victor 3 (PerkinElmer). Quantità scalari di NO sono state usate come standard di riferimento.

RISULTATI

Studio della citotossicità e della capacità antiossidante dell'estratto di Dolichos.

Allo scopo di determinare le concentrazioni dell'estratto di cellule di *Dolichos* da utilizzare per tutti i successivi saggi, sono stati condotti esperimenti per determinare l'intervallo di concentrazioni in cui l'estratto risultasse non dannoso alle cellule in fase di crescita. Sono state quindi saggiate diverse concentrazioni dell'estratto idrosolubile, comprese tra 0,5% e 0,003% (5 mg/ml-30ug/ml) su fibroblasti NIH3T3. I risultati hanno evidenziato che nessuna delle dosi saggiate ha prodotto alcun effetto tossico sulle cellule.

Uno degli effetti delle radiazioni UV è la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS): lo stress ossidativo prodotto dalle radiazioni è in grado di

danneggiare la cellula e di comprometterne la funzionalità.

Allo scopo quindi di valutare il potere antiossidante totale dell'estratto di *Dolichos*, è stato condotto un test *in vitro*, saggio ORAC, che misura il potenziale riducente (quindi antiossidante) di composti o miscele. Il potere antiossidante di un composto o di una miscela dipende, infatti, dalla sua capacità riducente, ossia dalla capacità di ridurre la quantità di radicali liberi contrastando lo stress ossidativo.
Il saggio ORAC ha evidenziato che l'estratto di D*olichos* un buon potere antiossidante *in-vitro*. Il valore del potere antiossidante dell'estratto, espresso come Trolox equivalenti per grammo, è di circa 70 microgrammi di Trolox equivalenti (TE) per grammo. L'estratto quindi ha ottime potenzialità per essere utilizzato come agente protettivo da stress ossidativo sulle cellule della pelle.

Studio dell'effetto dell'estratto di Dolichos sulla attività detossificante cellulare.
Uno degli effetti dello stress ossidativo generato dalle radiazioni UV è, come detto in precedenza, la riduzione dell'attività detossificante del proteasoma.
Sulla base delle proprietà antiossidanti dell'estratto di *Dolichos* è stata valutata la capacità dell'estratto di contrastare la riduzione dell'attività del proteasoma che si osserva in seguito a radiazione UV su cellule dell'epidermide. Cheratinociti HaCaT stressati

con 10 mJ UVA e successivamente con 70 mJ UVB, sono stati trattati con tre diverse concentrazioni (0,0004%, 0,002%, 0,01%) dell'estratto idrosolubile di *Dolichos*, e raccolti dopo sei ore. Per l'analisi dell'attività del proteasoma, le cellule sono state lisate e messe in presenza di un substrato fluorescente riconosciuto dalla subunità beta5 del proteasoma. Come si evince dalla **figura 1**, in seguito all'irradiamento i cheratinociti mostrano una riduzione dell'attività del proteasoma di circa 40% rispetto alle cellule di controllo non irradiate. Il trattamento con l'estratto di *Dolichos* ha prodotto un'attenuazione della riduzione dell'attività esercitata dalle radiazioni a tutte le concentrazioni testate. A concentrazioni di 0,01% l'effetto prodotto dall'estratto è così evidente che l'attività del proteasoma risulta molto simile a quella delle cellule non irradiate di controllo. La capacità dell'estratto di contrastare la riduzione dell'attività del proteasoma si riflette quindi nelle cellule in una riduzione della quantità di proteine danneggiate ed in una maggiore disponibilità di componenti per la sintesi di nuove proteine.

Studio dell'effetto dell'estratto di Dolichos sulla protezione del DNA nucleare e mitocondriale.

Uno degli effetti più evidenti delle radiazioni UVB è quello di danneggiare direttamente il DNA delle cellule compromettendo la vitalità e la funzionalità delle cellule stesse.

Si è, quindi, andati a verificare se il trattamento con l'estratto cellulare di *Dolichos* producesse un effetto di protezione del DNA, sia nucleare che mitocondriale, dai danni provocati dai raggi UVB.

Per valutare i danni al DNA nucleare è stato eseguito un saggio Comet (il cui protocollo è stato descritto nella sezione Materiali e Metodi) che serve per valutare il livello di frammentazione del DNA genomico mediante diretta osservazione delle cellule al microscopio ottico. Per quantizzare questo effetto, la lunghezza di 50 scie dei nuclei cellulari, indice della frammentazione del DNA, è stata misurata ed è stato calcolato un valore medio. Come si può vedere dal grafico in **figura 2A**, la lunghezza media della scia dei nuclei delle cellule irradiate con UVB è maggiore rispetto alle cellule di controllo non irradiate.

Il trattamento con le diverse concentrazioni dell'estratto di *Dolichos* ha prodotto un chiaro effetto protettivo sul DNA dai danni prodotti dalle radiazioni: la lunghezza media della scia dei nuclei cellulari è significativamente inferiore nelle cellule irradiate e trattate con gli estratti rispetto alle cellule solo irradiate, indice di una minore frammentazione del DNA nucleare. La riduzione della lunghezza della scia con il trattamento alla concentrazione più alta (0,1%) è di circa il 45%. Nello stesso esperimento, è stato valutato anche l'effetto protettivo del Trolox, noto per la sua capacità di contrastare gli effetti dannosi delle radiazioni UV. Il trolox ha prodotto una

riduzione della scia pari a circa il 30%, inferiore quindi alla protezione ottenuta con il trattamento con l'estratto di *Dolichos*.

Il DNA delle cellule della pelle risulta danneggiato in seguito alle radiazioni sia per un effetto diretto delle radiazioni UVB, che per un effetto indiretto provocato dalle radiazioni UVA. Queste ultime provocano danni al DNA attraverso la generazione di specie reattive dell'ossigeno. Al fine di valutare l'effetto dell'estratto anche sui danni prodotti al DNA dallo stress ossidativo, il saggio Comet è stato ripetuto utilizzando H_2O_2, composto che genera nella cellula specie reattive dell'ossigeno e quindi stress ossidativo.

Come si può vedere dal grafico in **figura 2B**, la lunghezza media della scia dei nuclei cellulari delle cellule stressate con H_2O_2 è maggiore risposto alle cellule di controllo non stressate, indicando che lo stress ossidativo è in grado di produrre danni considerevoli al DNA. Il trattamento con le diverse concentrazioni dell'estratto idrosolubile di *Dolichos* ha prodotto un chiaro effetto protettivo al DNA anche dai danni prodotti dall'H_2O_2: la lunghezza media della scia dei nuclei cellulari è significativamente inferiore nelle cellule stressate e trattate con gli estratti rispetto alle cellule solo stressate. La riduzione della lunghezza della scia con il trattamento alla concentrazione più alta (0,1%) è del 82 %: il livello di protezione è quindi quasi totale e il DNA

appare non degradato quasi come quello delle cellule di controllo non stressate.

Sulla base dell'attività di protezione dai danni al DNA nucleare esercitata dall'estratto oggetto della presente invenzione, è stato valutato se questo prodotto potesse avere effetto protettivo anche sul DNA mitocondriale. Come detto in precedenza, le radiazioni UV danneggiano il DNA mitocondriale generando una delezione a livello della stessa regione nucleotidica, definita per questo delezione comune, di circa 5000 basi. L'effetto sembra essere indiretto e dovuto alla generazione di specie reattive dell'ossigeno che vanno a danneggiare il DNA mitocondriale. Per valutare il danno al DNA mitocondriale le cellule sono state trattate per due giorni con l'estratto di *Dolichos* o con la vitamina E ed il Coenzima Q10, noti per la loro capacità di proteggere i mitocondri dai danni causati dalle radiazioni ultraviolette.

Dopo i trattamenti, le cellule sono state irradiate con gli UVB, raccolte dopo un'ora e si è proceduto all'estrazione del DNA dalle cellule. La quantità di DNA mitocondriale danneggiato è stata valutata mediante PCR, e rapportata alla quantità totale di DNA mitocondriale presente in ogni campione.

Come si evince dalla **Figura 3**, le radiazioni UVB hanno prodotto nelle cellule un aumento significato della quantità di DNA mitocondriale danneggiato, ma tale effetto è contrastato dal pretrattamento con l'estratto di *Dolichos*: la quantità di DNA danneggiato nelle

cellule irradiate ma trattate in precedenza con l'estratto è pari a circa il 50% rispetto alle cellule non trattate. Tale riduzione risulta addirittura superiore a quella ottenuta con i trattamenti con la vitamina E o con il Coenzima Q. Questi risultati dimostrano che l'estratto di *Dolichos* è capace di proteggere sia il DNA nucleare che mitocondriale dai danni causati dalle radiazioni e di prevenirne gli effetti dannosi.

Studio dell'effetto dell'estratto di Dolicos sulla funzionalità dei mitocondri.

I risultati precedenti suggeriscono che il trattamento con l'estratto di *Dolichos* possono avere un effetto potenziale anche sulla funzione dei mitocondri. I mitocondri sono organuli la cui principale funzione è quella di sintetizzare ATP, molecole altamente energetiche utilizzate per soddisfare i bisogni energetici delle cellule; la produzione di ATP avviene durante la respirazione cellulare, processo che prevede il consumo di ossigeno. Sono stati quindi effettuati due saggi, uno per la quantizzazione delle molecole di ATP prodotte dalle cellule in seguito al trattamento con l'estratto di *Dolichos* e l'altro per misurare la quantità di ossigeno consumata in presenza dello stesso estratto. Il saggio, riportato in **figura 4**, mostra la quantizzazione delle molecole di ATP in fibroblasti trattati con l'estratto idrosolubile di *Dolichos* sia in assenza che in presenza di radiazioni UVB. Nello stesso esperimento, è stato valutato anche l'effetto del

trolox. Come si può osservare in figura, le cellule producono una minore quantità di molecole di ATP in seguito ai danni provocati dalle radiazioni UV. I trattamenti con l'estratto di *Dolichos* producono un chiaro effetto sulla produzione di ATP, sia in assenza che in presenza di stress: per la concentrazione più alta dell'estratto (0,01%) si assiste ad un aumento del 20% di ATP in assenza di stress e di circa il 60% in cellule irradiate: un effetto ancora più evidente del trolox. Per confermare l'effetto sulla respirazione cellulare, siamo andati a verificare se l'estratto di *Dolichos* avesse un effetto anche sul consumo di ossigeno. Per verificare questa ipotesi è stato allestito in fibroblasti un saggio fluorescente che permette di monitorare il consumo di ossigeno come risultato dell'aumento della fluorescenza emessa dalla cellule, grazie all'utilizzo di una molecola la cui fluorescenza è mascherata dall'ossigeno stesso. Il risultato del saggio è riportato in **figura 5:** le cellule trattate con l'estratto di *Dolichos* mostrano nel tempo un maggiore consumo di ossigeno, rispetto alle cellule di controllo, e questo valore risulta anche più alto di quello mostrato dalle cellule trattate con il glucosio. A 150 minuti l'aumento è di circa il 60%.

Infine è stato verificato se l'estratto idrosolubile di *Dolichos* avesse un effetto sull'espressione di SIRT-3, membro della famiglia delle sirtuine, espresso nei mitocondri, è coinvolto nella regolazione del

metabolismo cellulare. Per l'analisi dell'espressione di SIRT-3, le cellule sono state trattate con due diverse concentrazioni dell'estratto (0,02% e 0,05%) e con il coenzima Q10, usato come controllo positivo. Dopo i trattamenti, le cellule sono state raccolte, l'RNA estratto e l'espressione genica analizzata mediante RT-PCR.

Come si evince dalla **Figura 6**, il trattamento con l'estratto di *Dolichos* produce un chiaro effetto sull'espressione di SIRT-3, e tale aumento è superiore rispetto a quello prodotto dal Coenzima Q10. Tutti questi risultati confermano che l'estratto idrosolubile di *Dolichos* è capace di attivare il metabolismo cellulare ed è in grado di contrastare gli effetti negativi prodotti sul metabolismo cellulare dalle radiazioni UV.

Studio dell'effetto dell'estratto di Dolichos sulla protezione della matrice extracellulare.

Un altro degli effetti dannosi delle radiazioni UV è, come detto in precedenza, quello di indurre una modificazione della matrice extracellulare, inducendo la degradazione delle fibre di collagene e di elastina che la costituiscono. Per valutare la capacità dell'estratto di proteggere dai danni causati sulla matrice, sono stati effettuati esperimenti per valutare l'effetto sulle metalloproteinasi (MMP) e sull'elastasi, proteasi che degradano rispettivamente il collagene e l'elastina. Fibroblasti primari sono

stati trattati con due diverse concentrazioni dell'estratto di *Dolichos* per due ore, stressati con UVA 10 J/cm2, allo scopo di stimolare l'espressione delle MMP, e raccolti a 6 ore dall'irradiamento. Come mostrato nella **Figura 7**, l'aumento dell'espressione delle MMP causata dalle radiazioni, è stato significativamente ridotto dal trattamento con l'estratto, a tutte e due le dosi utilizzate e per entrambe le MMPs analizzate. A concentrazione di 0,01%, l'estratto ha prodotto una riduzione del 35% dell'espressione della MMP-1 e del 51% della MMP-3. Tale effetto risulta anche più evidente dell'acido retinoico utilizzato come controllo positivo. L'effetto sull'attività dell'elastasi è stato valutato utilizzando un saggio in vitro: estratti totali di fibroblasti umani sono stati incubati con diverse concentrazioni dell'estratto di *Dolichos* in presenza di un substrato fluorescente dell'elastasi. Come si evince nel grafico della **figura 8**, l'attività dell'enzima risulta diminuita in presenza dell'estratto a tutte le concentrazioni testate: alla concentrazione più alta, pari allo 0,1%, tale diminuzione è pari al 25%. Questi risultati dimostrano che l'estratto idrosolubile di cellule di *Dolichos* ha un effetto protettivo sulla degradazione dei componenti della matrice extracellulare indotta dalle radiazioni UV, perché è in grado di ridurre l'attività sia delle collagenasi che delle elastasi.

Studio dell'effetto dell'estratto di Dolichos sulla attività antinfiammatoria.

Un altro potente effetto dannoso delle radiazioni UV è l'induzione di una reazione infiammatoria sulla pelle. Allo scopo di valutare la capacità dell'estratto di *Dolichos* di contrastare l'infiammazione provocata dalle radiazioni è stato effettuato il saggio Griess per la quantizzazione dell'ossido nitrico.

L'ossido nitrico, come detto in precedenza, è un potente mediatore dell'infiammazione, ed un suo aumento è direttamente correlato all'attivazione della reazione infiammatoria. Macrofagi RAW 267 sono stati pretrattati con due diverse concentrazioni dell'estratto di *Dolichos* per due ore e poi stimolate con LPS 1ug/ml per 18 ore, allo scopo di indurre un aumento dell'ossido nitrico. Come mostrato nella **Figura 9**, l'aumento dell'ossido nitrico, è stato significativamente ridotto dal trattamento con l'estratto, a tutte e due le dosi utilizzate. A concentrazione di 0,1%, l'estratto ha prodotto una riduzione del 50%, effetto che risulta anche più evidente di quello prodotto dal TPCK, un composto utilizzato come controllo positivo, noto per le sue proprietà antinfiammatorie.

Sulla base dell'attività anti-infiammatoria dall'estratto, esercitata attraverso la riduzione dell'ossido nitrico, è stato valutato mediante RT-PCR se l'estratto potesse avere effetto sull'espressione di geni coinvolti nella sintesi dei mediatori dell'infiammazione. A questo scopo, sono stati

selezionati: il gene iNOS, che codifica per l'enzima responsabile delle sintesi dell'ossido nitrico, ed il gene COX-2, codificante per un enzima responsabile della sintesi delle prostaglandine.

Per l'analisi dell'espressione di iNOS e COX2, le cellule sono state trattate con l'estratto o con il TPCK, usato come controllo positivo, per 2 ore, stressate con 1 μg/ml di LPS e raccolte dopo due ore. L'analisi dell'espressione genica, analizzata mediante RT-PCR, è riportata in **fig 10:** il trattamento con l'estratto ha indotto una significativa riduzione dell'espressione di entrambi i geni. Il trattamento con l'estratto di *Dolichos* alla concentrazione di 0,02% ha ridotto l'espressione di iNOS di circa il 50%, e quella di COX2 di circa 80%.

Sulla base di tutti questi risultati appare evidente che l'estratto idrosolubile di *Dolichos* ha un effetto benefico su diversi tipi di cellule della pelle. La sua azione è quella di contrastare in maniera significativa gli effetti dannosi prodotti dai raggi UV, sia a livello di risposta antiinfiammatoria e di protezione della matrice extracellulare del tessuto, che a livello cellulare, grazie ad un aumento della capacità detossificante, di riparo del DNA e di protezione della funzionalità mitocondriale.

BIBLIOGRAFIA

1. Bulteau AL, Moreau M, Nizard C, Friguet B (2002). Impairment of proteasome function upon UVA- and UVB-

irradiation of human keratinocytes. Free Radic Biol 1;32(11):1157-70.

2. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Voorhees JJ (2002). Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. Arch Dermatol, 138(11):1462-70.

3. Garimella TS, Jolly CI and Narayanan S (2001). In vitro studies on antilithiatic activity of seeds of Dolichos biflorus Linn. and rhizomes of Bergenia ligulata wall. Phytother. Res. 15, 351-355.

4. Hallows WC, Lee S, and Denu JM (2006). Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. PNAS, 103: 27.

5. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL (2002).High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. J Agric Food Chem., 50 (16): 4437-44.

6. Imokawa G (2009). Mechanism of UVB-induced wrinkling of the skin: paracrine cytokine linkage between keratinocytes and fibroblasts leading to the stimulation of elastase. J Investig Dermatol Symp Proc., 14 (1):36-43.

7. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E (2005). Nitric oxide production and signaling in inflammation. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 4(4):471-9.

8. Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods; 65(1-2):55-63.

9. Rijken F, Bruijnzeel-Koomen CA (2011). Photoaged skin: the role of neutrophils, preventive measures, and potential pharmacological targets. Clin Pharmacol Ther. 89(1):120-4.

10. Walter H. Pavicic, Silvina M. Richard (2009). Correlation analysis between mtDNA 4977-bp deletion and ageing.Mutation Research 670: 99-102.

11. William L. Smith, David L. DeWitt and R. Michael Garavito(2000). Cycloxigenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. Annu. Rev. Biochemm. 2000. 69:145-82.

12. Yaar M, Gilchrest BA (2007). Photoageing: mechanism, prevention and therapy. Br J Dermatol, 157(5):874-87.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per l'estrazione di una miscela di sostanze idrosolubile da cellule di *Dolichos* in coltura liquida, comprendente le seguenti fasi:

a) de-differenziamento su substrato solido delle cellule del tessuto vegetale di specie di *Dolichos* ed ottenimento dei calli;

b) prelievo dei calli e allestimento delle colture liquide;

c) crescita di cellule vegetali dal callo di *Dolichos* in coltura liquida;

d) separazione delle cellule vegetali di *Dolichos* dal mezzo di crescita;

e) omogenizzazione delle cellule vegetali in soluzioni idrofile, preferibilmente tampone salino PBS;

f) centrifugazione dell'omogenato per isolare l'estratto idrosolubile, rappresentato dal sopranatante;

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, dove le cellule di *Dolichos* sono cellule di *Dolichos biflorus*.

3. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detta fase e) di omogeneizzazione avviene in un mortaio o frullatore meccanico.

4. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, ulteriormente comprendente una fase g) di liofilizzazione dell'estratto idrosolubile.

5. Estratto idrosolubile da cellule di *Dolichos* ottenibile mediante le fasi a)-f) del metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti.

6. Estratto idrosolubile da cellule di *Dolichos* ottenibile mediante le fasi a)-g) del metodo secondo la rivendicazione 4.

7. Soluzioni idro-alcoliche contenenti l'estratto idrosolubile secondo la rivendicazione 6, preferibilmente ad una concentrazione compresa tra 12% - 0,1%, più preferibilmente compresa tra 5% - 0,4% e ancora più preferibilmente ad una concentrazione dello 0,4%.

8. Soluzioni idro-alcoliche secondo la rivendicazione 7, dove il solvente è glicerolo.

9. Composizioni cosmetiche comprendenti l'estratto come definito secondo le rivendicazioni 5 o 6, oppure le sue soluzioni idro-alcoliche ottenute secondo le rivendicazioni 7 o 8, ad una concentrazione compresa tra 0,0001% e 10%, preferibilmente tra 0,001% e 8% e ancora più preferibilmente alla concentrazione dello 0,002%, dove dette concentrazioni sono espresse in peso rispetto al peso totale della composizione, in un veicolo cosmeticamente accettabile e/o insieme ad adiuvanti ed eccipienti accettabili in dermocosmesi.

10. Composizione cosmetica secondo la rivendicazione 9, in forma di creme, gel, lozioni cosmetiche per l'applicazione cutanea, emulsioni A/O e O/A, latti, rossetti, fondotinta o ombretti.

11. Composizione cosmetica secondo ognuna delle rivendicazioni 9-10, in cui detto veicolo cosmeticamente accettabile è scelto tra stearati, trigliceridi, oli, burri, glicoli, polisaccaridi,

liposomi multilamellari, ciclo destrine o silicati.

12. Uso della composizione cosmetica secondo ognuna delle rivendicazioni 9-11 o dell'estratto secondo le rivendicazioni 5-6, come antiossidante.

13. Uso della composizione cosmetica secondo ognuna delle rivendicazioni 9-11 o dell'estratto secondo le rivendicazioni 5-6, per la prevenzione e/o il trattamento dei danni causati alla pelle dai raggi ultravioletti.

14. Uso della composizione cosmetica secondo ognuna delle rivendicazioni 9-11 o dell'estratto secondo le rivendicazioni 5-6, per la prevenzione e/o il trattamento del fotoinvecchiamento della pelle.

15. Metodo di trattamento cosmetico per la e/o il trattamento dell'invecchiamento cutaneo indotto dalle radiazioni UV comprendente l'applicazione sulla cute in necessità di trattamento di una quantità cosmeticamente efficace di una composizione cosmetica come definita secondo ognuna delle rivendicazioni 9-11.

Barzanò & Zanardo Milano S.p.A.

CLAIMS

1. Method for the extraction of a hydrosoluble compound mixture from liquid cell cultures of *Dolichos*, comprising the following steps:

a) de-differentiation of *Dolichos* cells derived from plant tissues on solid substrate and obtainance of the calluses;

b) collection of the calluses and preparation of the liquid cultures;

c) growing of *Dolichos* plant callus cells in liquid medium;

d) isolation of the cells of *Dolichos* from the growth medium;

e) homogenization of the plant cells in hydrophilic solutions, preferably in saline buffer PBS;

f) centrifugation of the homogenate to obtain the hydrosoluble extract represented by supernatant;

2. Method according to claim 1, wherein said *Dolichos* cells are *Dolichos biflorus* cells.

3. Method according to anyone of the preceding claims, wherein said step e) of homogenization occurs in a mortar or mechanic blender.

4. Method according to anyone of the preceding claims, further comprising a step g) of lyophilization of the hydrosoluble extract.

5. Hydrosoluble extract of *Dolichos* cells obtainable by steps a)-f) of the method, according to anyone of the preceding claims.

6. Hydrosoluble extract of *Dolichos* cells obtainable by steps a)-g) of the method according to claim 4.

7. Hydro-alcoholic solutions containing the hydrosoluble extract according to claim 6, preferably at a

concentration between 12% - 0.1%, more preferably between 5% - 0.4% and even more preferably at the concentration of 0.4%.

8. Hydro-alcoholic solutions according to claim 7, wherein the solvent is glycerol.

9. Cosmetic compositions including the extract as defined according to claim 5 or 6, or their hydro-alcoholic solutions obtained according to claim 7 or 8, at a concentration between 0.0001% and 10%, preferably between 0.001% and 8% and even more preferably at the concentration of 0.002%, wherein said concentrations are expressed as weight with respect to the total weight of the composition, in an cosmetically acceptable vehicle and/or together with additives and dermo-cosmetic acceptable excipients.

10. Cosmetic composition according to claim 9, in the form of cream, gel, cosmetic lotion for cutaneous application, emulsions W/O and O/W, milks, lipsticks, foundations or eye-shadows.

11. Cosmetic composition according to anyone of the claims 9-10, wherein said cosmetically acceptable vehicle is selected among stearates, triglycerides, oils, butters, glycols, polysaccharides, multilamellar liposomes, cyclodextrins or silicates.

12. Use of cosmetic composition according to anyone of the claims 9-11 or use of the extract according to the claims 5-6, as anti-oxidant agent.

13. Use of cosmetic composition according to anyone of the claims 9-11 or use of the extract according to the claims 5-6, for the prevention and/or treatment of the damages caused to the skin by UV irradiation.

14. Use of the cosmetic composition according to anyone

of the claims 9-11 or use of the extract according to the claims 5-6, for the prevention and/or treatment of skin photo-ageing.

15. Method of cosmetic treatment for prevention and treatment of skin photo-ageing induced by UV irradiation comprising the application on the skin of a cosmetically effective amount of a cosmetic composition, as defined according to anyone of the claims 9-11.

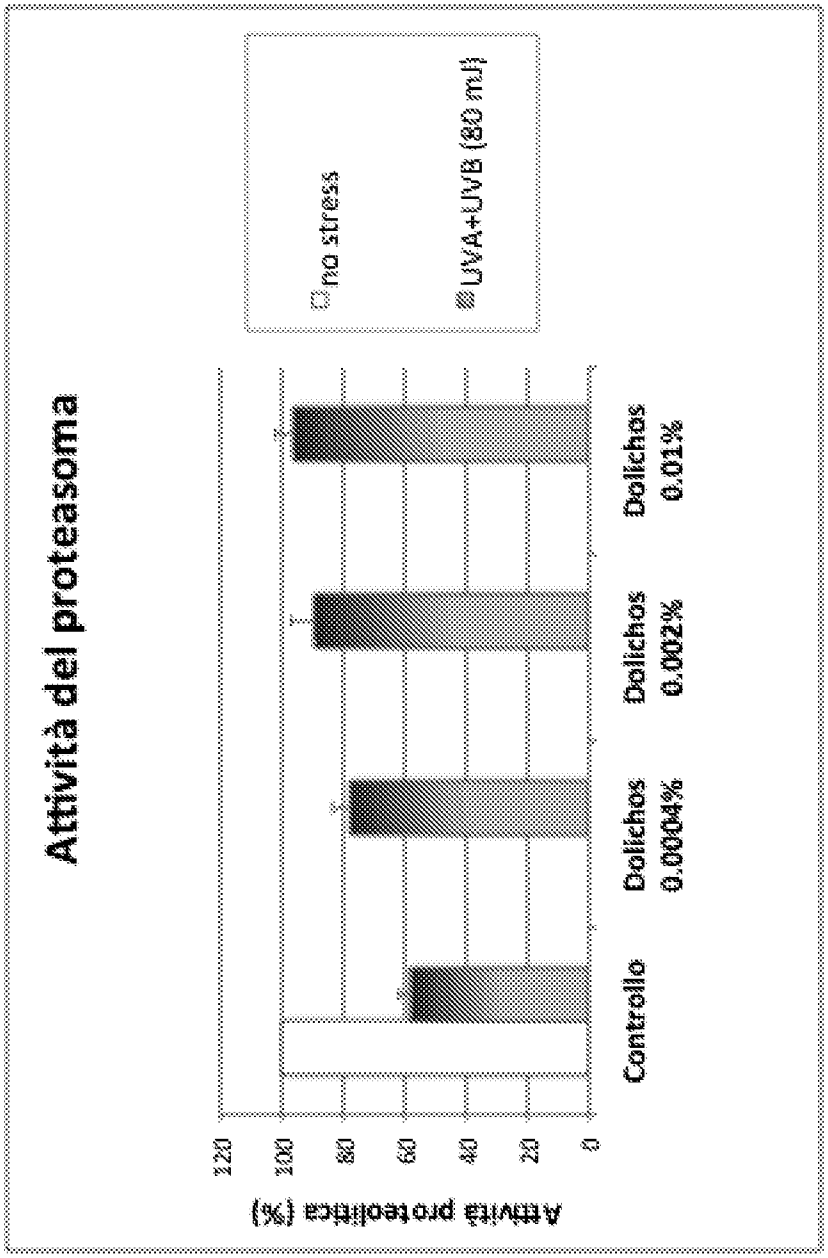
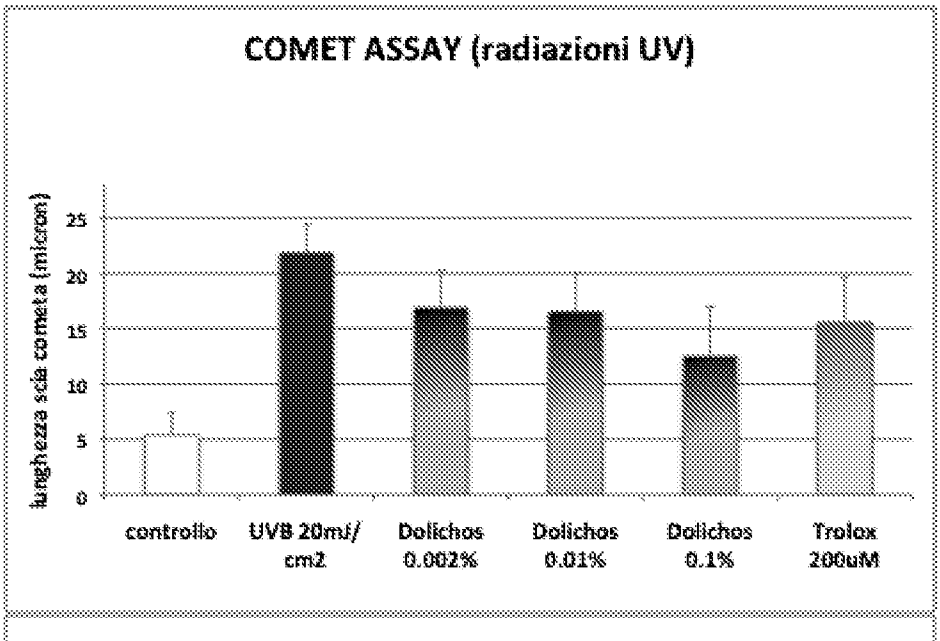

Attività del proteasoma
no stress
UVA+UVB (80 mJ)
Attività proteolitica (%)
120
100
80
60
40
20
0
Controllo
Dolichos 0.0004%
Dolichos 0.002%
Dolichos 0.01%

Fig. 1

A)


COMET ASSAY (radiazioni UV)
lunghezza scia cometa (micron)
0
5
10
15
20
25
controllo
UVB 20mJ/cm2
Dolichos 0.002%
Dolichos 0.01%
Dolichos 0.1%
Trolox 200uM

B)

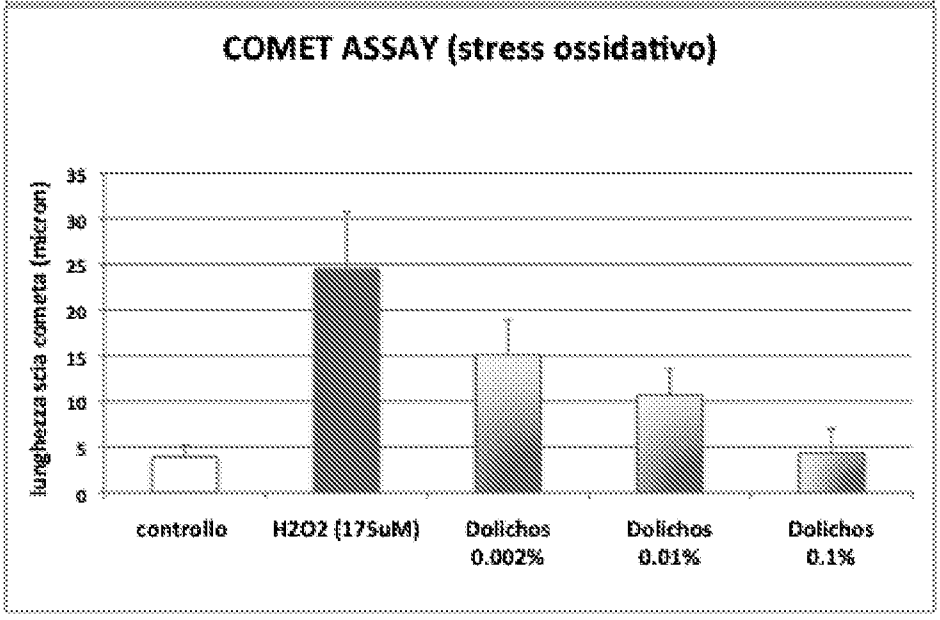

COMET ASSAY (stress ossidativo)
lunghezza scia cometa (micron)
0
5
10
15
20
25
30
35
controllo
H2O2 (175uM)
Dolichos 0.002%
Dolichos 0.01%
Dolichos 0.1%

Fig. 2

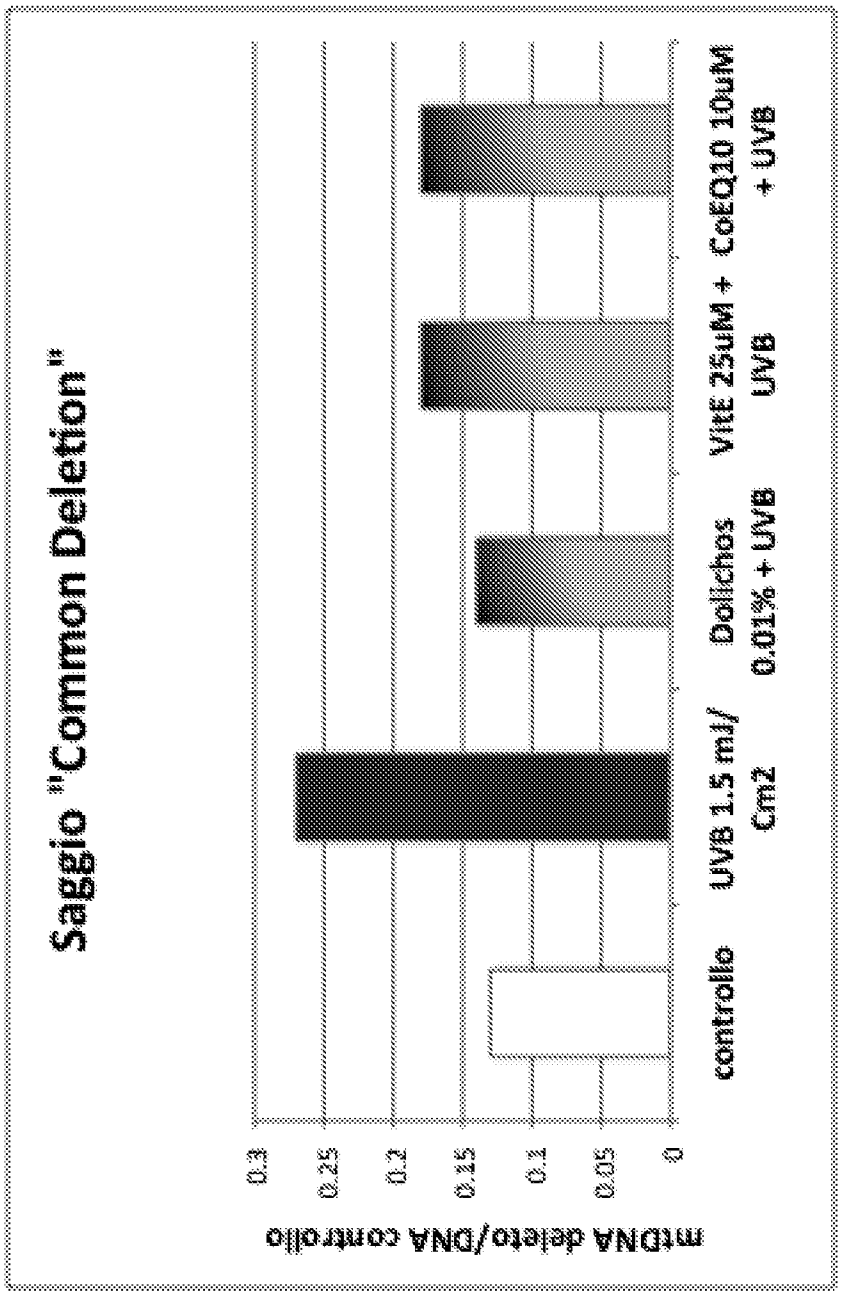

Saggio "Common Deletion"
mtDNA deleto/DNA controllo
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
controllo
UVB 1.5 mJ/ Cm2
Dolichos 0.01% + UVB
VitE 25uM + UVB
CoEQ10 10uM + UVB

Fig. 3

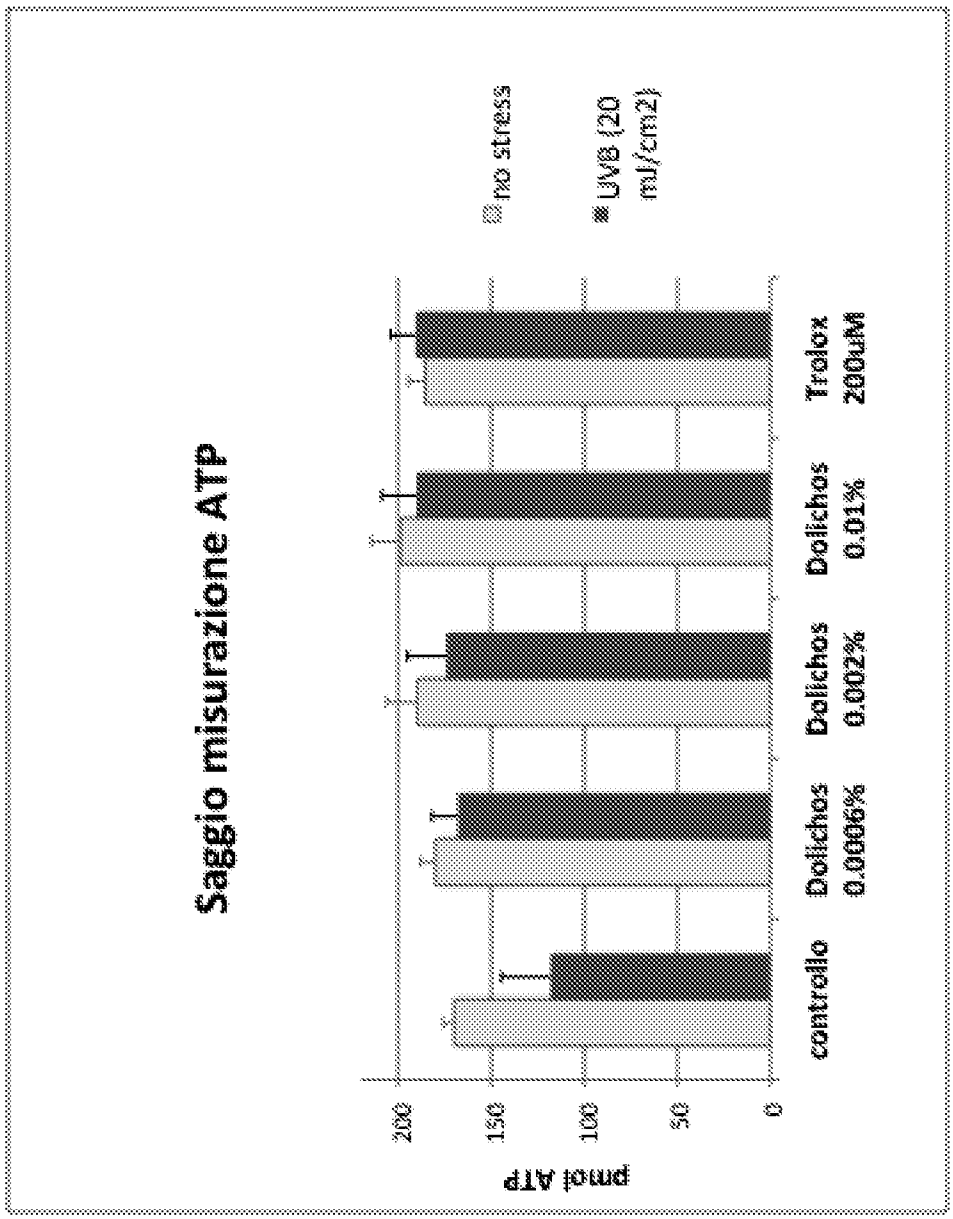

Saggio misurazione ATP
pmol ATP
200
150
100
50
0
no stress
UVB (20 mJ/cm2)
controllo
Dolichos 0.0006%
Dolichos 0.002%
Dolichos 0.01%
Trolox 200uM

Fig. 4

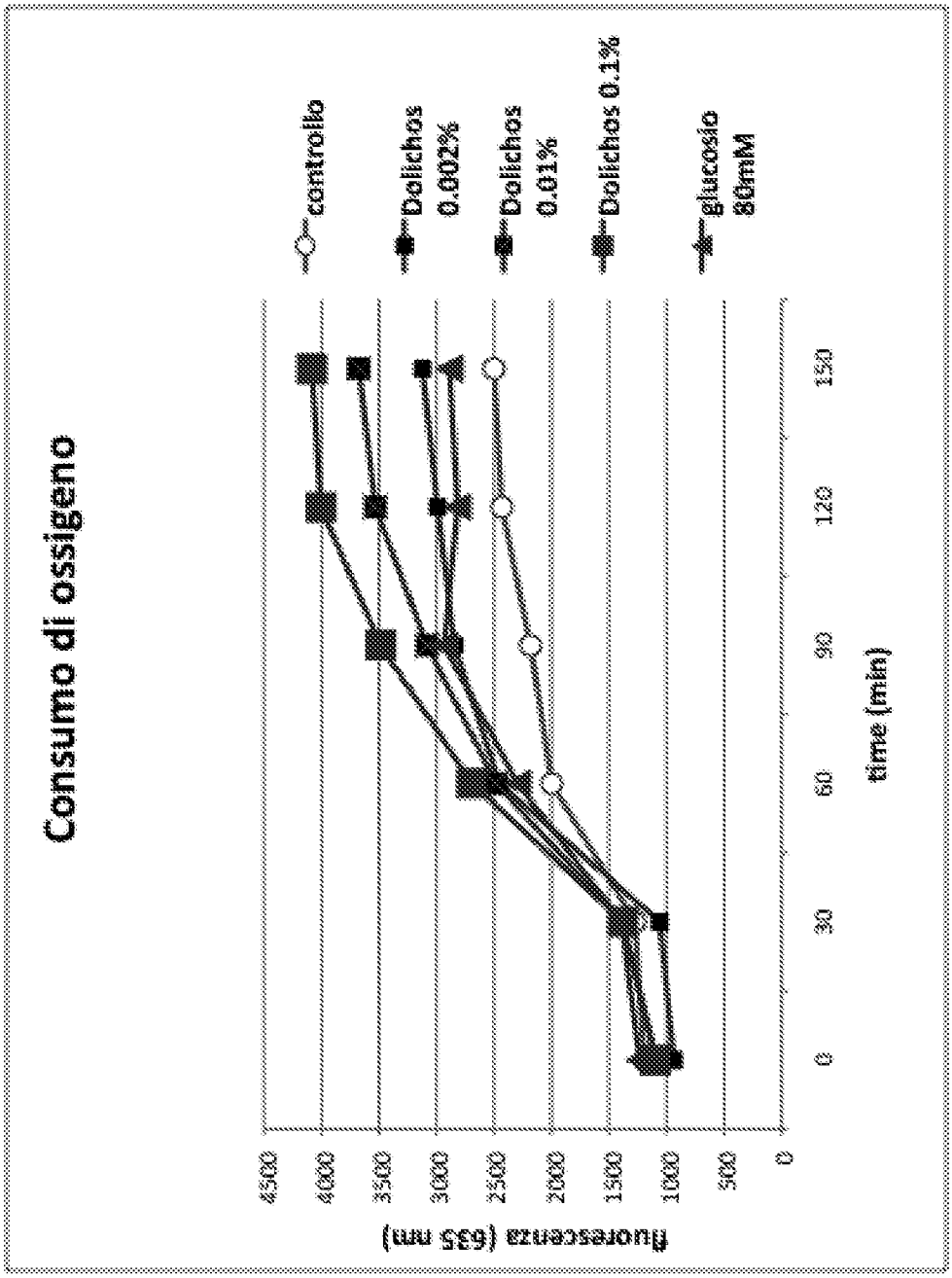

Consumo di ossigeno
controllo
Dolichos 0.002%
Dolichos 0.01%
Dolichos 0.1%
glucosio 80mM
Fluorescenza (635 nm)
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
30
60
90
120
150
time (min)

Fig. 5

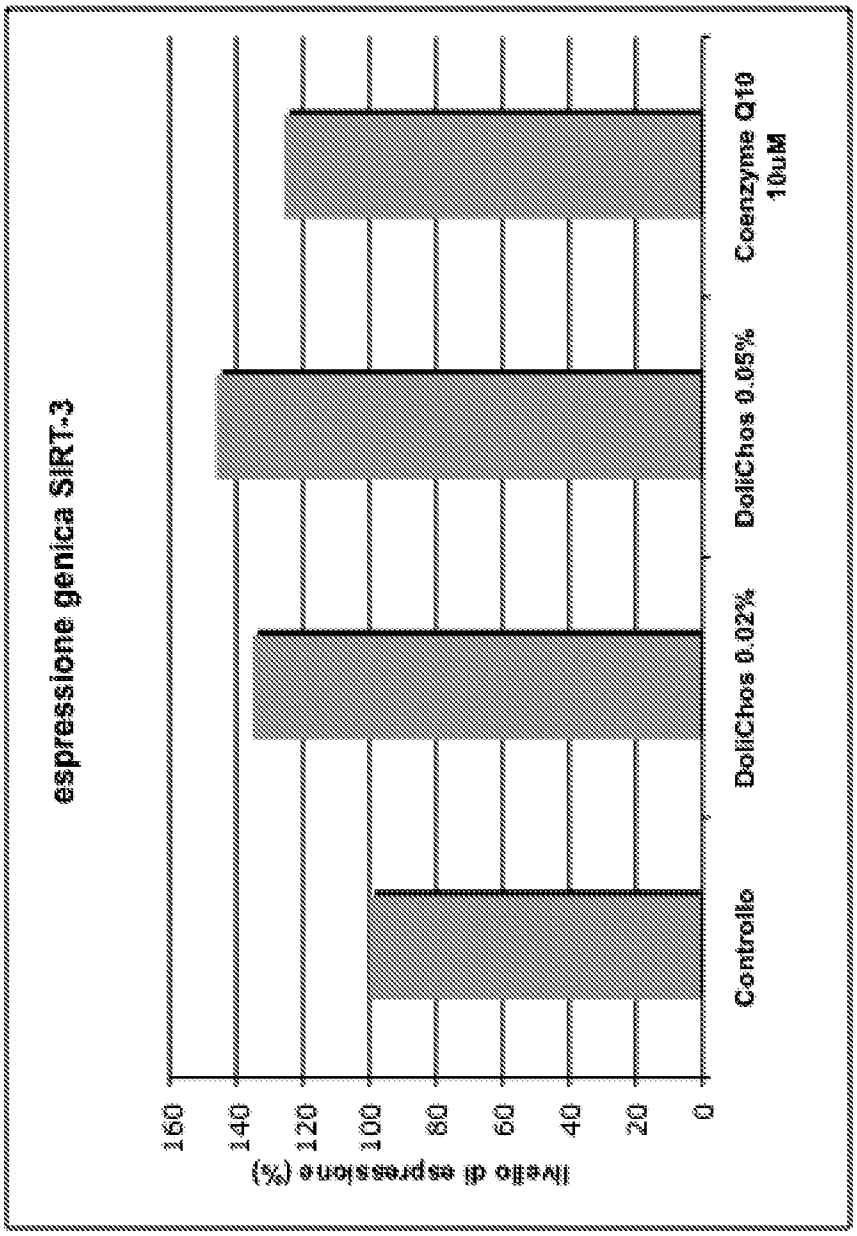

espressione genica SIRT-3
livello di espressione (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Controllo
DoliChos 0.02%
DoliChos 0.05%
Coenzyme Q10 10uM

Fig. 6

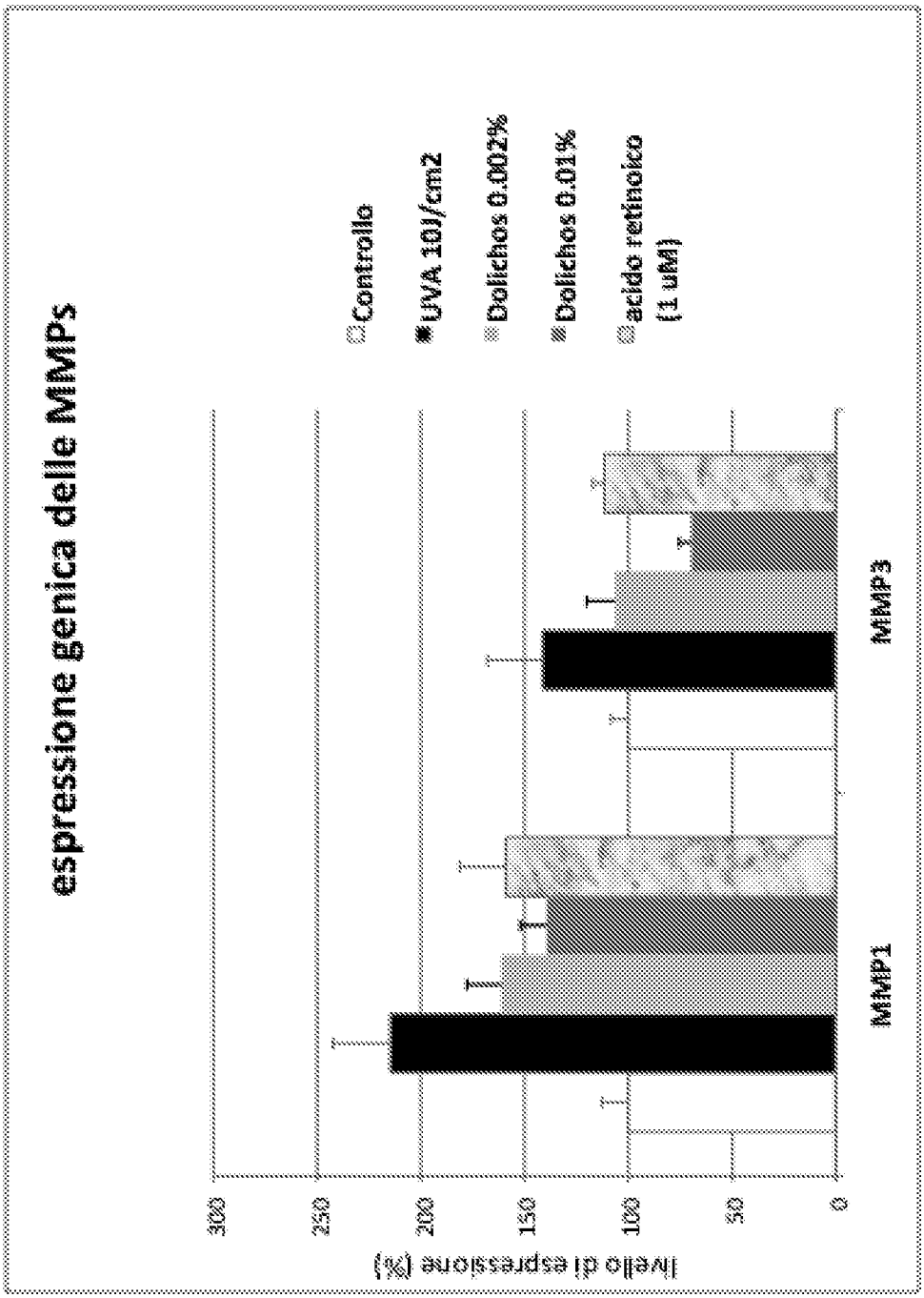

espressione genica delle MMPs
Controllo
UVA 10J/cm2
Dolichos 0.002%
Dolichos 0.01%
acido retinoico (1 uM)
livello di espressione (%)
300
250
200
150
100
50
0
MMP1
MMP3

Fig. 7

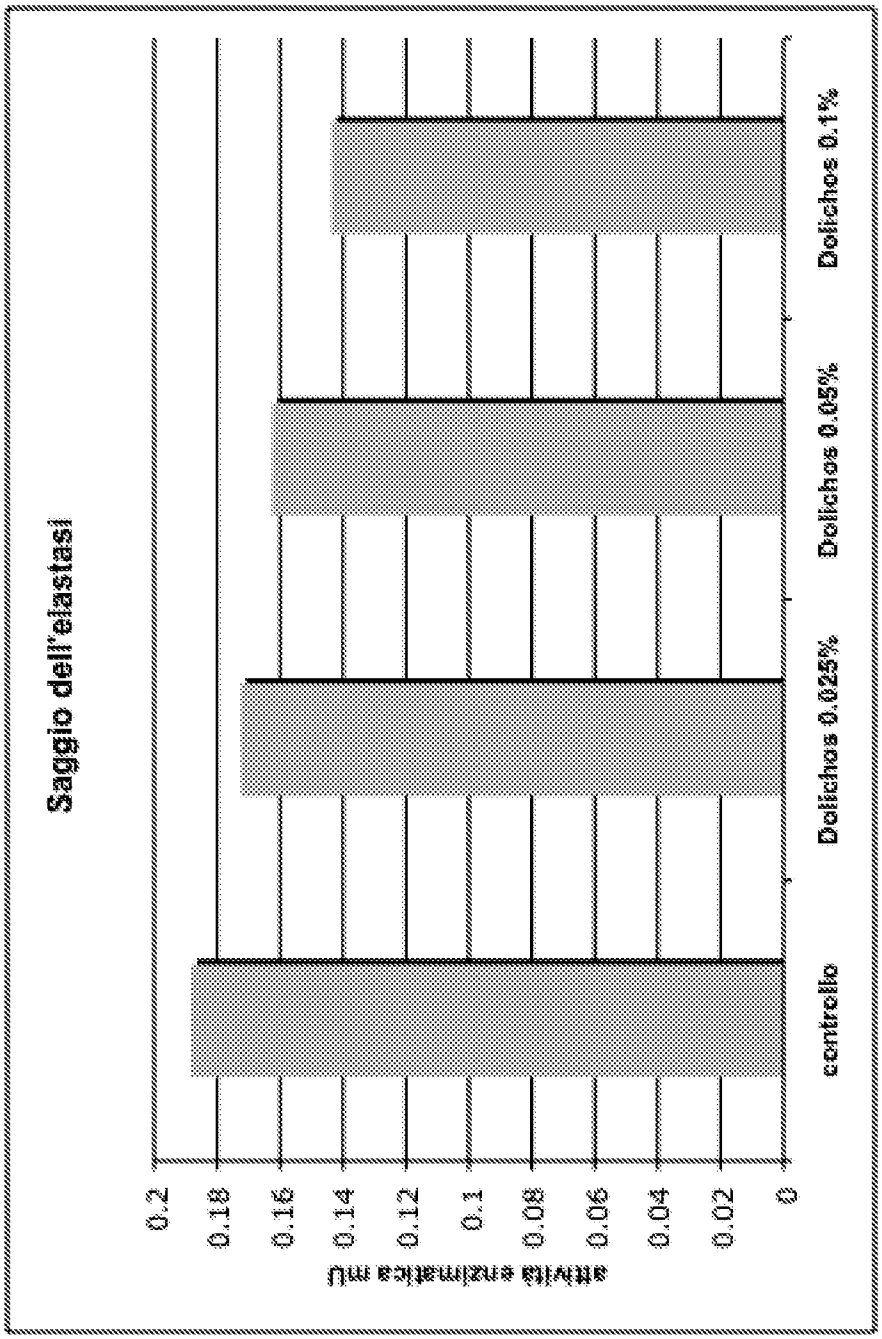

Saggio dell'elastasi
attività enzimatica mU
0.2
0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
controllo
Dolichos 0.025%
Dolichos 0.05%
Dolichos 0.1%

Fig. 8

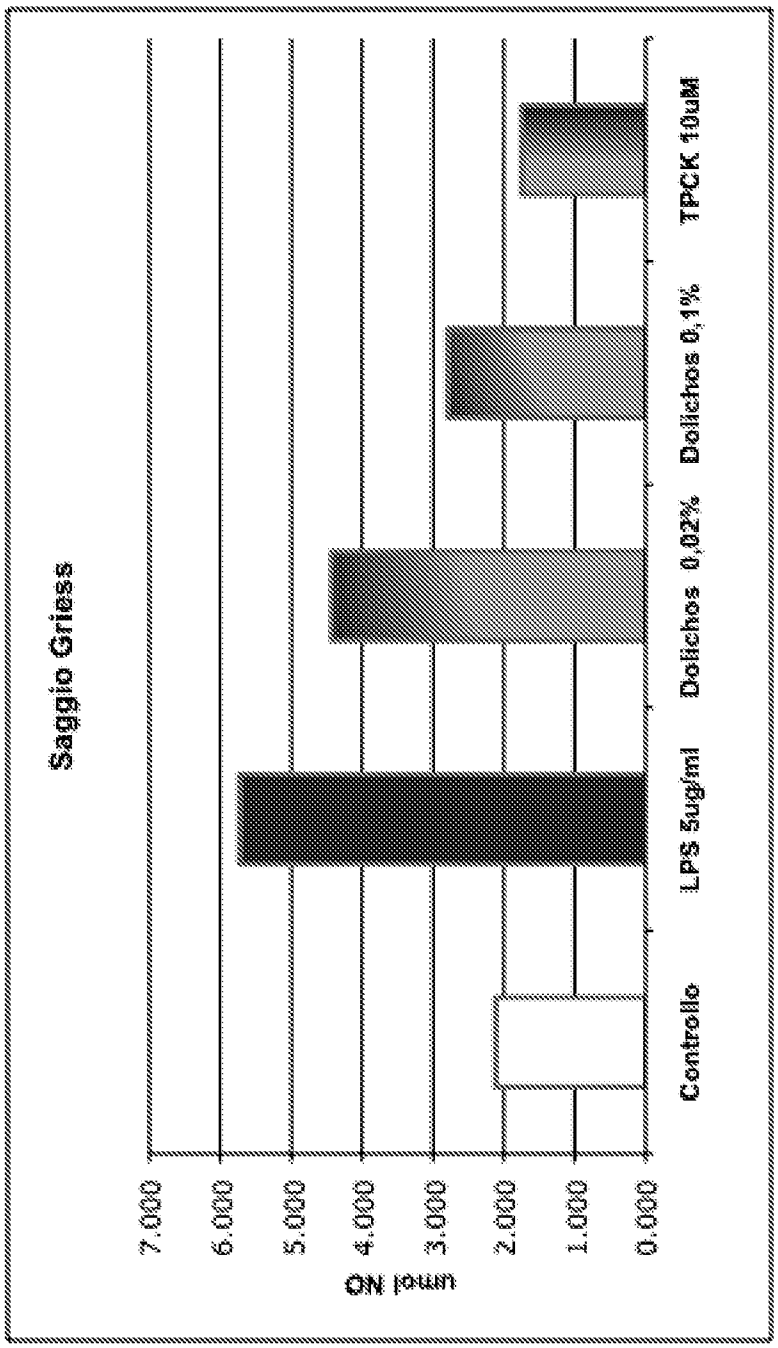

Saggio Griess
umol NO
7.000
6.000
5.000
4.000
3.000
2.000
1.000
0.000
Controllo
LPS 5ug/ml
Dolichos 0,02%
Dolichos 0,1%
TPCK 10uM

Fig. 9

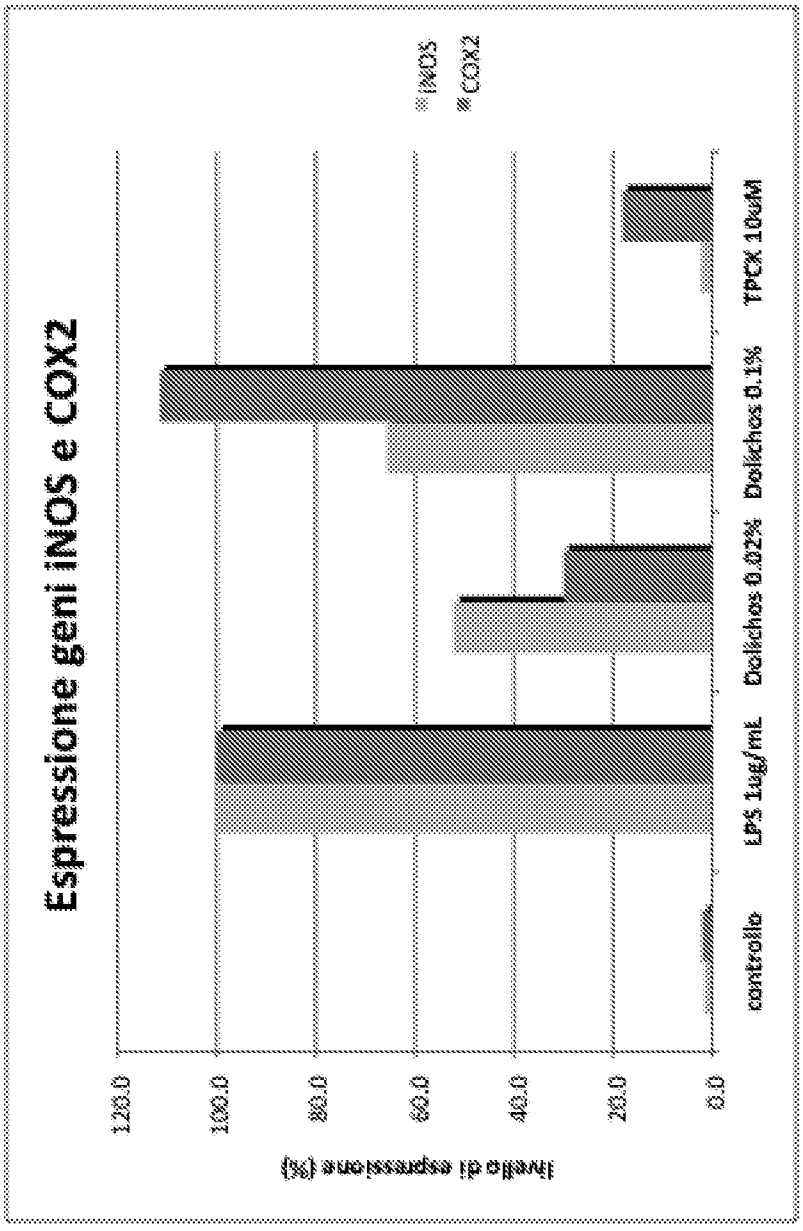

Espressione geni iNOS e COX2
iNOS
COX2
livello di espressione (%)
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
controllo
LPS 1ug/mL
Dolichos 0.02%
Dolichos 0.1%
TPCK 10uM

Fig. 10