

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA

Scuola di Dottorato in Scienze Biomorfologiche e Chirurgiche

Dottorato in Morfologia Clinica e Patologica XXVI ciclo

Coordinatore: Prof.ssa Stefania Montagnani

Tesi di Dottorato di Ricerca

**EFFETTI DI FARMACI ANTIOSSIDANTI SUL COLLAGENE IN CORNEE DI
ANIMALI SANI E DOPO LESIONI SPERIMENTALI**

Relatore:

Prof.ssa Stefania Montagnani

Candidato:

Dott.ssa Francesca Latino

Anno Accademico 2012/2013

INDICE

| | |
|--|----------------|
| Capitolo 1: Introduzione | pag. 3 |
| Capitolo 2: Anatomia della cornea | pag. 4 |
| • <i>2.1 Struttura della cornea</i> | |
| • <i>2.2 Vasi e nervi della cornea</i> | |
| • <i>2.3 Fisiologia della cornea</i> | |
| Capitolo 3: Lesioni della cornea | pag. 14 |
| • <i>Lesioni traumatiche</i> | |
| • <i>Stress Ossidativo</i> | |
| • <i>Specie reattive dell'ossigeno nel processo di guarigione delle ferite</i> | |
| Capitolo 4: Fenilpropanoidi | pag. 28 |
| • <i>4.1 Il metabolismo fenilpropanoidico</i> | |
| Capitolo 5: Verbascoside | pag. 33 |
| Capitolo 6: Scopo del lavoro | pag. 37 |
| Capitolo 7: Materiali e Metodi | pag. 38 |
| • <i>7.1 Materiali</i> | |
| • <i>7.2 Saggio ABTS</i> | |
| • <i>7.3 Valutazione apoptosi</i> | |
| • <i>7.4 Immunoistochimica</i> | |
| Capitolo 8: Risultati | pag. 45 |
| • <i>8.1 Valutazione clinica</i> | |
| • <i>8.2 Saggio ABTS</i> | |
| • <i>8.3 Apoptosi</i> | |
| • <i>8.4 Immunoistochimica</i> | |
| Capitolo 9: Discussione e Conclusioni | pag. 54 |
| Bibliografia | |

1. INTRODUZIONE

A causa della loro struttura, della loro funzione specifica e per la posizione anatomica le varie componenti dell'occhio (in particolare cornea, cristallino e retina) sono continuamente esposte al rischio di eventi traumatici.

La cornea, in particolare, protegge l'interno dell'occhio dal mondo esterno, essa rappresenta la finestra sul mondo del nostro apparato visivo; come attraverso il vetro di una finestra le immagini, i colori, la luce entrano in una stanza, allo stesso modo la trasparenza della cornea assicura il passaggio delle informazioni visive all'interno del nostro occhio dove la retina è poi in grado di trasformarle in segnali elettrici per il nostro cervello.

Molte sono, dunque, le patologie che colpiscono la cornea alterandone la forma, lo spessore, la trasparenza.

In questo contesto, le forme farmaceutiche derivate da estratti vegetali sono sempre più utilizzate per trattare un'ampia varietà di malattie oculari. Tra gli altri, i Fenilpropanoidi glicosidici svolgono un importante ruolo nel trattamento delle ferite traumatiche, di diversa natura, a carico della cornea.

Uno dei Fenilpropanoidi di maggior interesse in campo medico è il Verbascoside, appartenente al gruppo dei Fenilpropanoidi glicosidici e caratterizzato da una spiccata attività antiinfiammatoria, antiossidante e capacità di rigenerazione tissutale.

2. ANATOMIA DELLA CORNEA

La cornea è la membrana che costituisce l'1/6 anteriore della tonaca fibrosa dell'occhio. Continua posteriormente con la sclera, rispetto alla quale differisce per curvatura, struttura e funzioni. Principale caratteristica della cornea è quella di essere perfettamente trasparente, costituendo quindi uno dei più importanti mezzi diottrici dell'occhio.

Essa, comportandosi come una lente convergente di circa 43-44 diottrie, è in grado, insieme ad un'altra lente di cui l'occhio dispone e che prende il nome di cristallino (potere diottrico medio circa 18-20 diottrie), di convogliare i raggi luminosi provenienti da un oggetto esterno esattamente in un punto di fuoco sulla regione centrale della retina preposta alla visione distinta degli oggetti chiamata fovea. Ciò fa sì che le immagini del mondo esterno giungano perfettamente a fuoco sulla retina e siano chiaramente percepibili.

La superficie anteriore, convessa, è direttamente in rapporto con l'ambiente esterno; quando l'occhio è chiuso essa viene a contatto con la congiuntiva palpebrale. La superficie posteriore, concava, limita in avanti la camera anteriore dell'occhio.

La superficie esterna della cornea ha forma leggermente ellittica, con diametro orizzontale di 12 mm e verticale di 11 mm. Esaminata dalla faccia interna essa si presenta regolarmente circolare, con un diametro di 13 mm. Il raggio di curvatura della superficie anteriore misura medialmente 7,8 mm, mentre 6,8 mm misura quello della superficie posteriore. La cornea è più sottile al centro (0,8 mm) che alla periferia (1,1 mm). Il limite tra sclera e cornea è netto e prende il nome di *orlo sclerocorneale* (o *limbus*); peraltro, sclera e cornea si affrontano secondo un piano obliquo per cui la superficie anteriore della cornea è meno estesa di quella posteriore,

mentre per le superfici della sclera avviene l'inverso. Il materiale che costituisce la cornea presenta particolare robustezza, cosicché questa membrana, al pari della sclera, contribuisce alla protezione delle parti interne dell'occhio. (1)

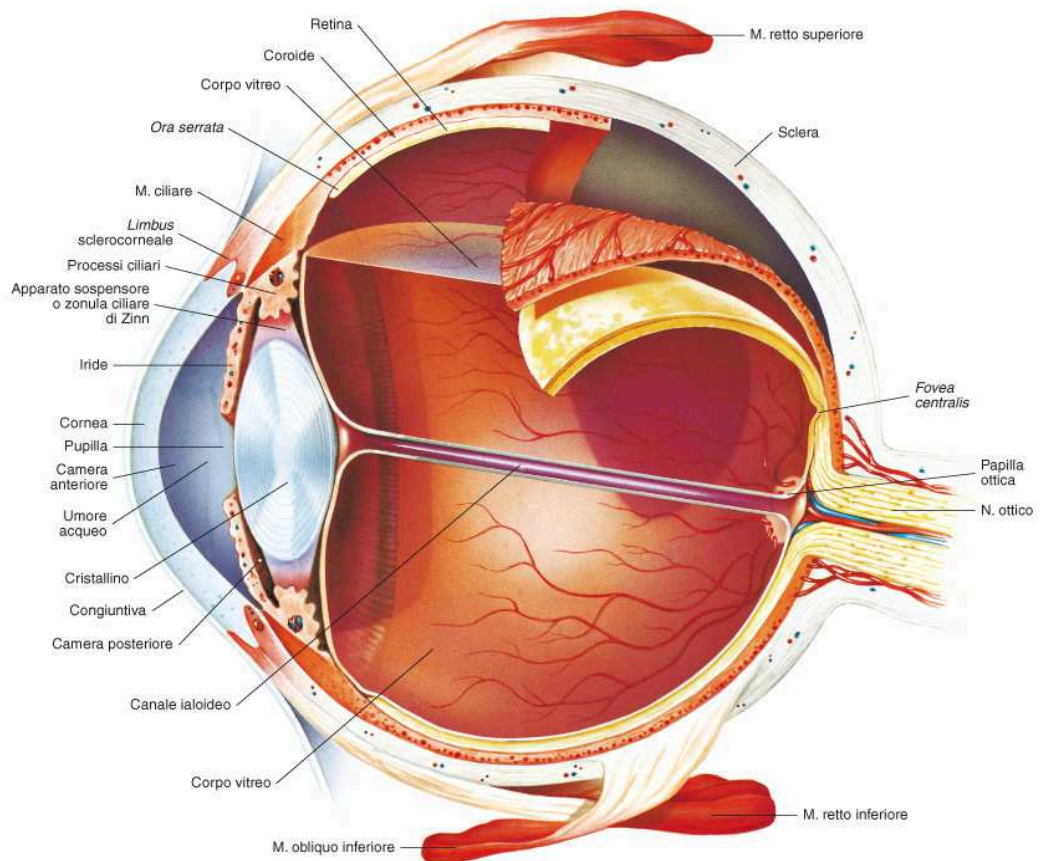


Fig.1: Immagine del globo oculare; si osserva chiaramente la tonaca fibrosa dell'occhio composta da cornea e sclera.

2.1 STRUTTURA DELLA CORNEA

Dal punto di vista strutturale si distinguono nella cornea, a partire dalla sua superficie anteriore, 5 strati: epitelio corneale, membrana limitante anteriore, stroma corneale, membrana limitante posteriore, endotelio.

1. L'*epitelio corneale*, pavimentoso pluristratificato, poggia su una tipica membrana basale. Vi si distinguono:

- *Cellule superficiali piatte*, che al microscopio elettronico mostrano verso l'esterno la presenza di sottili digitazioni, la cui funzione sembra essere quella di trattenere il velo lacrimale che costantemente le bagna.
- *Cellule intermedie*, disposte in 3-5 strati, delle quali le più superficiali si presentano assai estese in superficie e prendono il nome di *cellule alari*, mentre le altre hanno forma clavata.
- *Cellule basali alte*, prismatiche, ricche in tonofibrille.

Le cellule epiteliali sono unite tra loro da desmosomi. Sul contorno della cornea, a livello dell'orlo sclerocorneale (o limbus), l'epitelio corneale continua con l'epitelio della congiuntiva bulbare.

2. La *membrana limitante di Bowmann* è costituita da un intreccio di fibrille collagene, simili a quelle dello stroma, che si addensano in uno strato dello spessore di circa 12 nm. La membrana di Bowmann continua, senza limiti netti, con lo stroma corneale che è situato profondamente.

3. Lo *stroma corneale* forma da solo circa il 90% dello spessore di tutta la cornea. È costituito principalmente da fibrille collagene il cui diametro si mantiene uniformemente sui 20-30 nm, cementate fra loro da una matrice mucopolissacaridica e organizzate in lamelle dello spessore di circa 10 nm, disposte in circa 50 strati. In ciascuna lamella le fibre decorrono parallelamente

fra loro; quelle appartenenti a lamelle contigue decorrono invece in direzione ortogonale le une rispetto alle altre. Tra le lamelle sono presenti numerose cellule, del tipo dei fibroblasti, denominate *cheratociti*, dalle quali prendono origine le fibre collagene. La matrice mucopolisaccaridica ha lo stesso indice di rifrazione delle fibrille e pertanto omogeneizza il collagene rendendo le lamelle perfettamente trasparenti.

La natura dei componenti, oltre alla precisa organizzazione tridimensionale delle fibre e delle cellule corneali, è una delle caratteristiche che conferiscono trasparenza all'organo (trasparenza dovuta anche alla mancanza di vasi sanguiferi).

4. La *membrana limitante posteriore di Descemet* è spessa circa 10 μm e, al microscopio ottico risulta anista (amorfa). Al microscopio elettronico presenta una struttura fibrillare del tutto particolare in quanto le sue fibrille, pur avendo la stessa costituzione chimica del collagene, presentano però una disposizione raggiata.
5. L'*endotelio* riveste la faccia posteriore della cornea ed è costituito da un unico strato di cellule appiattite di forma poligonale, ricche di mitocondri. Esso svolge un ruolo molto importante nella regolazione degli scambi tra cornea e umore acqueo e la sua integrità è necessaria per il mantenimento del trofismo e della trasparenza corneale.

In corrispondenza dell'orlo sclerocorneale si trova, nella parte profonda della tonaca fibrosa, il *sistema trabecolare sclerocorneale*. Questo è costituito da un intreccio di sottili fasci di fibre collagene che delimitano lacune comunicanti fra loro e con la camera anteriore dell'occhio. L'endotelio corneale penetra nel sistema trabecolare rivestendone le lacune. Questa formazione ha grande importanza nella regolazione della pressione endoculare. L'umor acqueo, prodotto continuamente a livello del

corpo ciliare, passa infatti dalla camera posteriore dell'occhio a quella anteriore attraverso il foro pupillare; prende allora la via del sistema trabecolare sclerocorneale, penetra nell'interno del *seno venoso della sclera* (o *canale di Schlemm*) attraversandone la parete e viene infine drenato dalle vene episclerali. Il canale di Schlemm è un vaso venoso, privo di tessuto muscolare liscio nella sua parete, che decorre circolarmente lungo il confine fra sistema trabecolare e sclera; esili vene lo fanno comunicare con le vene episclerali. Alterazioni del sistema trabecolare possono ostacolare il deflusso dell'umore acqueo con il conseguente aumento della pressione endoculare. (1, 2)

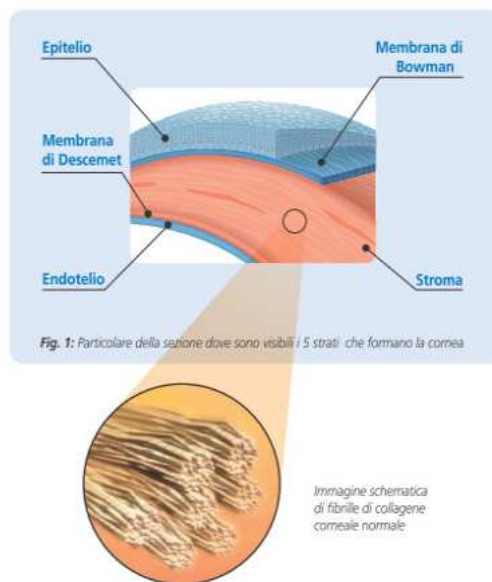
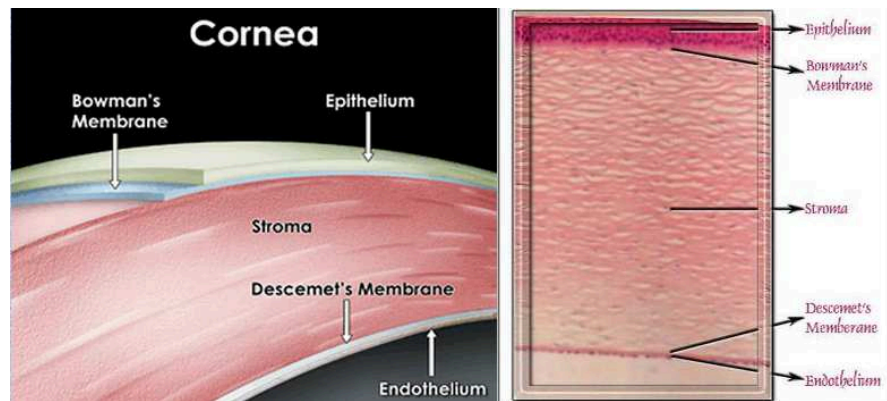


Fig. 2: Struttura microscopica della cornea.

2.2 VASI E NERVI DELLA CORNEA

La cornea è priva di *vasi sanguigni*; sostanze nutritive le pervengono dai vasi del limbus, rami delle arterie ciliari anteriori e dall'umore acqueo che giunge a contatto con la sua faccia posteriore.

Anche i *vasi linfatici* mancano: sono invece presenti spazi interstiziali, comunicanti tra di loro, delimitati dalle lamelle corneali. Questi spazi comunicano con i corrispondenti spazi interstiziali della sclera e con i vasi linfatici della congiuntiva bulbare.

La cornea è riccamente innervata da *rami dei nervi ciliari*. Questi formano, in corrispondenza del limbus, un *plesso anulare* dal quale partono fibre che decorrono radialmente nello spessore dello stroma corneale, si anastomizzano e si suddividono per formare il *plesso corneale profondo*. Da questo originano piccoli rami che attraversano la membrana limitante anteriore e formano, sotto l'epitelio corneale, il *plesso sottoepiteliale*. Quest'ultimo dà origine a fibre che si ramificano nello spessore dell'epitelio. Le fibre mieliniche che penetrano nella cornea perdono immediatamente la loro guaina. (2)

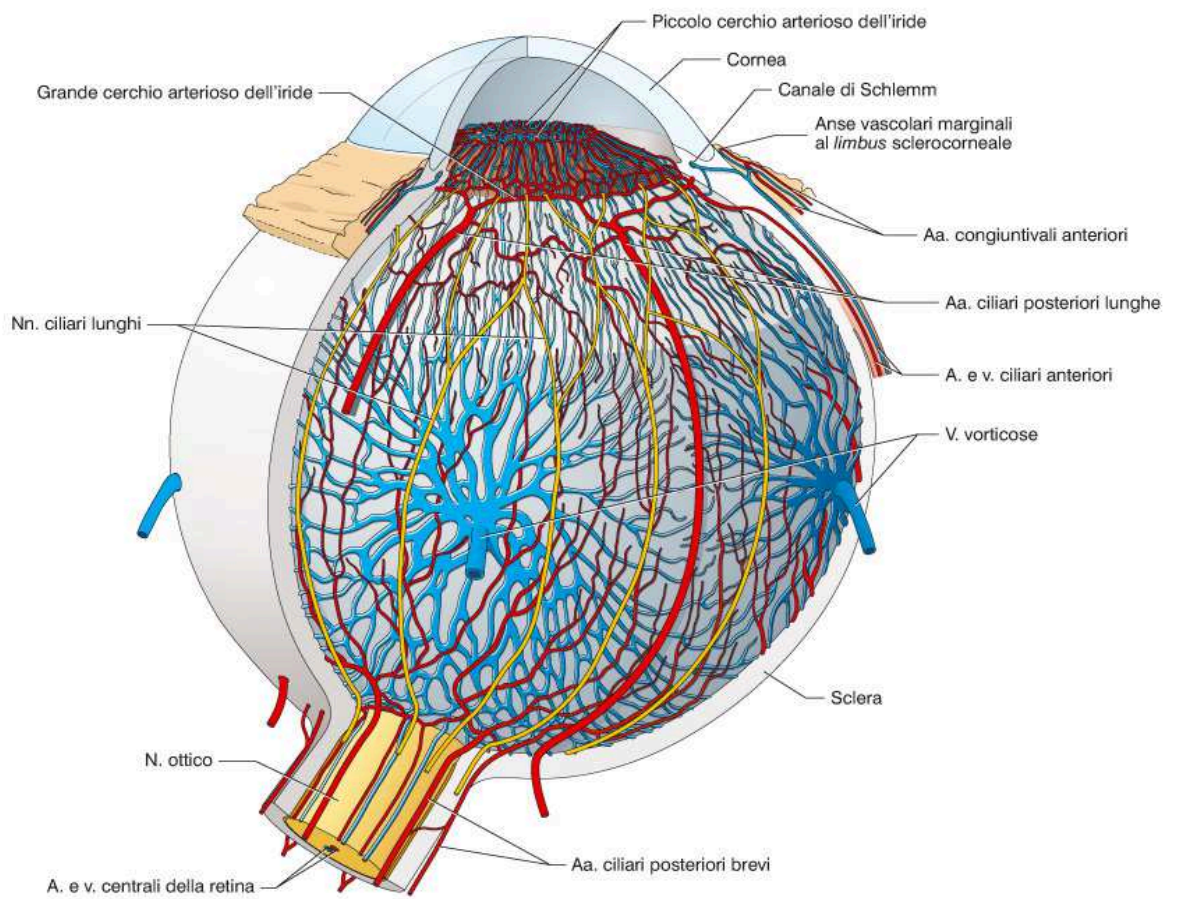


Fig. 3: Vascolarizzazione del globo oculare.

2.3 FISILOGIA DELLA CORNEA

La cornea, primo elemento del sistema diottrico oculare, si comporta come una lente convesso-concava di elevato potere. Tale precipua funzione ottica viene espletata grazie alla sua perfetta trasparenza ed alla regolarità della superficie di contatto con l'aria. Infatti il film lacrimale che ricopre l'epitelio, rugoso per la presenza nello strato esterno di un intreccio di micropliche, lo rende liscio, uniforme e di elevate qualità ottiche. La trasparenza è la proprietà fondamentale della cornea. Essa è resa possibile dall'assoluta avascolarità di questa membrana, dalle caratteristiche strutturali dello stroma e da alcuni indispensabili meccanismi fisiologici che assicurano il ricambio idrico e ne impediscono l'imbibizione (il normale tasso di idratazione corneale è di circa il 78%). Questo fenomeno (deturgescenza) deriva essenzialmente dall'integrità anatomico-funzionale dell'epitelio e soprattutto dell'endotelio che svolgono una fondamentale funzione di membrane semipermeabili e selettive in grado di regolare la diffusione degli elettroliti ed il flusso di acqua. Oltre a tale ruolo di barriere passiva, questi due strati, specie l'endotelio, sono dotati di una funzione attiva di trasporto fuori del parenchima, capace di contrastare la normale idrofilia del tessuto corneale. Si tratta di un meccanismo a "pompa ionica" che favorisce l'escrezione di ioni (Na^+ , Ca^{++} bicarbonato), l'ipertonìa dei liquidi esterni e conseguentemente la fuoriuscita di acqua. Altre caratteristiche fisiologiche della cornea sono la specularità, legata all'integrità epiteliale, e la permeabilità, funzione essenziale per il ricambio idrico e la penetrazione dei farmaci. La notevole sensibilità a stimoli di varia natura (tattile, termica, pressoria) è correlata, infine, alla ricca innervazione trigeminale. Essa si riduce nella vecchiaia ed in talune alterazioni flogistiche e distrofiche-degenerative. (3)

4. LESIONI DELLA CORNEA

La cornea, per consentire ai raggi luminosi e quindi alle immagini di giungere nitidamente sulla retina, necessita di conservarsi integra in tutti i suoi strati e quindi di mantenere intatte le sue peculiarità che sono costituite dalla trasparenza, specularità, levigatezza, curvatura, disidratazione, compattezza ed avascolarità.

Quando la cornea si ammala può perdere le sue caratteristiche di trasparenza, refrattive o tettoniche (cioè di contenimento). La perdita, per una molteplicità di cause possibili, di una di queste peculiarità del tessuto corneale può essere responsabile di una serie di menomazioni che, partendo da un'alterazione della qualità della vista, possono giungere fino alla perdita completa della capacità visiva di un occhio, come per esempio accade nei casi delle gravi causticazioni chimiche della cornea. (3)

3.1 LESIONI TRAUMATICHE

I traumi oculari sono un evento piuttosto frequente. L'occhio è la terza parte del corpo ad essere coinvolta (dopo mani e piedi). Fortunatamente l'incidenza dei traumi oculari gravi non è molto elevata, tanto che una buona percentuale di essi viene risolta senza ricovero. Tuttavia ciò non implica per forza che non ci siano esiti permanenti i quali, a volte, sono anche piuttosto gravi o invalidanti.

I traumi oculari a bulbo aperto, in particolare lo scoppio del bulbo e le ferite perforanti con ritenzione di corpo estraneo, hanno la prognosi peggiore, con gravi risvolti sulla quantità di vista residua. Soprattutto il deficit visivo che si verifica nei bambini può avere importanti risvolti nello sviluppo psico-fisico del bambino, in quanto la vista è da

sempre considerata il senso cardine nell'apprendimento, nell'acquisizione di stimoli esterni, senza parlare di una corretta postura e deambulazione.

I traumi oculari sono, dunque, un'importante causa di perdita della visione monoculare e, quindi, di menomazione anche grave; pertanto hanno una grande rilevanza sociale, psicologica ed economica. Inoltre costituiscono la principale causa di cecità ad un'occhio in una fascia di popolazione piuttosto giovane.

Una delle più comuni cause di danno oculare è la patologia traumatica corneale. La posizione esposta della cornea giustifica la frequenza con la quale essa subisce danni.

Tra le patologie in grado di alterare la trasparenza corneale e pertanto in grado di realizzare un leucoma corneale (cioè un'opacità che per lo più appare biancastra, da qui il termine leucoma) ci sono quindi da considerare le affezioni traumatiche, chimiche ed infettive che rappresentano una percentuale statisticamente significativa delle alterazioni corneali. I traumi corneali colpiscono con maggiore frequenza i soggetti di sesso maschile con età compresa tra i 20 e i 40 anni. Naturalmente i bambini fino ai 14 anni sono particolarmente a rischio durante le attività di gioco. La maggior parte dei traumi per gli uomini avvengono in ambiente esterno (posto di lavoro, pratiche sportive, lavori di giardinaggio o fai-da-te); per le donne, invece, il luogo potenzialmente più pericoloso è l'ambiente domestico.

Tra le cause dirette dei traumi corneali si rilevano con una certa frequenza le pallonate, in particolare mentre si gioca a calcio. A seguire, in ordine di frequenza, i traumi vengono riscontrati a seguito di aggressioni (maggiormente gravi quelli con bottiglie di vetro). Anche le cadute, accidentali o a seguito di patologie, possono provocare traumi corneali importanti soprattutto nelle persone anziane.

Altri traumi corneali che si registrano con una certa frequenza sono dovuti a contatto accidentale con rami o foglie d'albero, molle elastiche, frammenti metallici o utensili di

vario genere utilizzati in ambito domestico. Infine capita di osservare molti casi di traumi corneali a seguito di incidenti stradali, in particolare se il bulbo viene in contatto con frammenti metallici o di vetro oppure se il capo urta violentemente il volante.

Le lesioni del tessuto corneale, infatti, possono essere provocate da diversi fattori come:

- traumi meccanici (da corpo contundente, corpo penetrante e corpo estraneo);
- traumi chimici (come liquidi irritanti o corrosivi che possono venire in contatto con gli occhi durante molte lavorazioni industriali, soprattutto se non vengono rispettate le norme di sicurezza, ad esempio l'impiego di occhiali e maschere);
- eccessiva esposizione ai raggi ultravioletti (U.V.A.);
- uso scorretto delle lenti a contatto oppure una loro rottura accidentale.

Per lesioni oculari di natura meccanica si intendono tra le altre quelle di natura contusivo-concussiva, le ferite lacere, lacero-contuse, da taglio, da strappamento e i corpi estranei variamente localizzati o infissi sulla superficie corneale.

In generale i traumi corneali di natura meccanica si possono suddividere in due gruppi:

1. **traumi contusivi.** Vanno distinti, a loro volta, in *diretti* (il corpo contundente ha colpito direttamente l'occhio) e *indiretti* (il corpo contundente ha danneggiato le strutture ossee vicine al bulbo oculare oppure si tratta di un trauma dovuto a un contraccolpo). Possiamo avere quadri lievi, con presenza di emorragie e abrasioni corneali. Oppure si possono avere quadri più gravi, come emorragie in camera anteriore (ipoema traumatico), causa di possibile ematosi corneale;
2. **traumi perforanti.** I danni a livello corneale hanno uno spettro molto ampio, passando da minime perforazioni o ferite lineari ad ampie lacerazioni con sconvolgimento dell'intera architettura corneale.

I traumi chimici sono dovuti, invece, al contatto con sostanze reattive, come acidi o alcali, e provocano danni più o meno gravi, in base a pH, concentrazione e tempo di

contatto, che possono andare da una lieve erosione dell'epitelio con arrossamento, ad una necrosi tissutale. Il danno da alcali è più ampio, in quanto penetrano rapidamente e si legano ai lipidi dando alterazioni strutturali; gli acidi invece vengono tamponati dalle lacrime e causano precipitazione di alcune proteine di membrana, che formano quindi un'ulteriore barriera. Esistono infine traumi da ustioni termiche, causate da fiamme o corpi incandescenti, e traumi da raggi UV. (3)

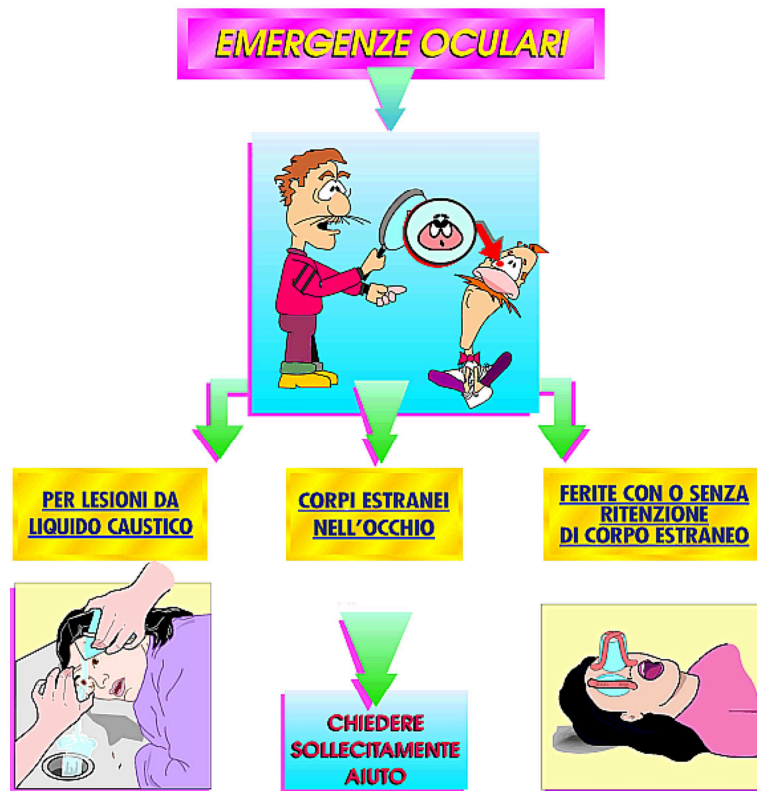


Figura 4: Principali emergenze oculari.

3.2 STRESS OSSIDATIVO

Il termine “stress ossidativo” indica l’insieme delle alterazioni che si producono nei tessuti, nelle cellule e nelle macromolecole biologiche allorché queste rimangono esposte ad un eccesso di agenti ossidanti, sia endogeni, come quelli prodotti dalle cellule infiammatorie, che esogeni, tra i quali numerosi importanti tossici ambientali.

Un corretto bilanciamento tra sostanze ossidanti ed antiossidanti (il cosiddetto equilibrio ossido riduttivo o equilibrio *redox*) è essenziale per tutta una serie di funzioni fisiologiche, in quanto numerose proteine coinvolte nelle catene di trasduzione intracellulare dei segnali (recettori, chinasi e fosfatasi, fattori di trascrizione) sono sensibili ad alterazioni anche lievi di tale equilibrio. Alterazioni di minore entità hanno solitamente un significato fisiologico, di “modulazione”, mentre gli squilibri maggiori finiscono facilmente per produrre disfunzioni, danno cellulare, apoptosi o necrosi. Di solito uno stress ossidativo consegue all’azione di sostanze chimiche, i radicali liberi innanzitutto. Ma non va dimenticato che un’azione ossidante è posseduta anche da agenti non radicalici e dalle radiazioni ionizzanti. Se le difese antiossidanti della cellula non bastano a tamponare l’azione pro-ossidante, la cellula può rimanere allora danneggiata a vari livelli:

1. sui fosfolipidi delle membrane, fino alla distruzione delle stesse con perdita della compartimentazione e dei trasporti selettivi;
2. sugli acidi nucleici, con accumulo di mutazioni ed alterazioni dell’espressione genica;
3. sulle proteine, dove l’ossidazione dei residui di cisteina e di altri aminoacidi finisce per causare alterazioni della struttura e perdita di funzione enzimatica, di trasporto, recettoriale, ecc.

Denham Harman fu il primo a proporre nel 1956 il concetto di "Stress Ossidativo" secondo il quale, l'iperproduzione ed il successivo accumulo di radicali liberi nell'organismo, in assenza di una adeguata capacità difensiva, comporta l'instaurarsi di danni ossidativi a carico di quasi tutti i costituenti dell'organismo, con conseguente insorgenza di patologie a carico dei diversi organi ed apparati.

Un concetto importante da sottolineare è che, i responsabili dello stress ossidativo non sono solamente i radicali liberi, ma anche altri elementi che presentano una struttura chimica differente da essi e che svolgono anch'essi azione ossidativa nei confronti delle nostre cellule. Si tratta delle cosiddette "specie chimiche ossidanti non radicaliche" che, a differenza dei radicali liberi che possiedono un elettrone spaiato a livello orbitale, presentano elettroni per la maggior parte distribuiti in coppie ed impegnati in legami covalenti.

Un esempio è dato dal Perossido di Idrogeno (H_2O_2). I radicali liberi e le specie chimiche non radicaliche, nonostante siano strutturalmente differenti, sono accomunati da una caratteristica intrinseca che è rappresentata dalla loro capacità ossidante. Essi sono, infatti, in grado di acquisire dalle molecole con le quali entrano in contatto, un fattore riducente rappresentato da un elettrone in quanto tale oppure sotto forma di atomo di idrogeno. Spesso, quando si parla di radicali liberi, si fa riferimento ai radicali liberi dell'ossigeno (ROS - Reactive Oxygen Species) ovvero atomi o molecole contenenti l'elemento ossigeno quali il Superossido (O_2), il Perossido di Idrogeno (H_2O_2) e radicali idrossilici. (4, 5)

In realtà, è stato ampiamente dimostrato che anche specie chimiche che contengono l'elemento carbonio oppure l'elemento azoto, possono svolgere azione ossidante e, quindi, rientrano anch'esse nel gruppo dei radicali liberi. I radicali liberi sono molecole altamente instabili in quanto possiedono un elettrone dispari nella loro orbita esterna e

che tendono a raggiungere la loro condizione di massima stabilità energetica acquisendo, dalle molecole con le quali interagiscono, l'elettrone mancante. La conseguenza diretta di questa loro azione è la produzione di altre molecole instabili e quindi di altri radicali liberi. L'iperproduzione di sostanze ossidanti in assenza di un adeguato sistema difensivo può, a lungo termine, innescare una vera e propria cascata di reazioni ossidative altamente dannose a carico della cellula, compromettendo la sua integrità sia strutturale che funzionale. Come ampiamente dimostrato, la membrana cellulare è caratteristicamente costituita da proteine e da lipidi disposti a formare una struttura trilaminare. Distinguiamo, infatti, uno strato esterno di natura proteica, uno strato intermedio costituito da una struttura lipidica bimolecolare (bilayer lipidico) e da un terzo strato orientato verso l'ambiente cellulare interno, costituito da molecole di natura proteica.

Lo strato intermedio rappresentato dal bilayer lipidico svolge senz'altro un ruolo di notevole importanza ai fini del mantenimento dell'integrità cellulare. Si tratta, come ben sappiamo, di una doppia sequenza in parallelo di molecole lipidiche direzionate in modo preciso. Esso rappresenta la matrice di base della membrana cellulare oltre che la struttura portante delle molecole proteiche di membrana, il cui buon funzionamento dipende in larghissima parte dal mantenimento nel tempo e nello spazio delle caratteristiche intrinseche del bilayer lipidico. L'attacco della membrana cellulare da parte dei radicali liberi determina l'innescamento di una reazione di perossidazione dei lipidi con conseguente attivazione di enzimi quali lipasi e fosfolipasi in grado di alterare e distruggere il bilayer lipidico di membrana. A sua volta, l'attivazione delle fosfolipasi determina la conseguente *liberazione di acido arachidonico e dei prodotti del suo metabolismo*: leucotrieni, trombossani e prostaglandine ad azione pro-

infiammatoria innescando, in tal modo, l'insorgenza di processi flogistici di una certa entità.

L'alterazione della permeabilità della membrana cellulare, provocata dalla denaturazione delle proteine e dalla perossidazione dei lipidi costituenti la parete cellulare da parte dei radicali liberi, consente a questi di penetrare facilmente all'interno della cellula e svolgere attivamente azione lesiva nei confronti del DNA con conseguente innesco di alterazioni genomiche tali da determinare l'insorgenza di mutazioni cromosomiche e di processi degenerativi della cellula.

Un aspetto assai importante da sottolineare è che non tutti i radicali liberi sono da considerare lesivi nei confronti dell'organismo. Una piccola quota di essi viene, infatti, prodotta normalmente in condizioni assolutamente fisiologiche per effetto del metabolismo cellulare svolgendo addirittura un ruolo positivo nei confronti dell'organismo. Una certa quota di Radicali Liberi si forma, infatti, durante i processi di riperfusione dei tessuti ischemici; in seguito alla risposta immune primaria cellulomediata in risposta all'attacco di microrganismi patogeni quali i batteri; a livello mitocondriale durante i processi di ossidazione finale dei substrati nutrizionali introdotti con l'alimentazione con produzione di energia sotto forma di ATP; ed ancora durante i processi di ossidazione dei substrati eso-endotossici catalizzati a livello epatico dal citocromo p450.

Un esempio significativo del possibile ruolo positivo svolto dai Radicali Liberi è dato dal radicale idrossile e dall'acido ipocloroso in grado di ridurre la proliferazione neoplastica. Infine ricordiamo il ruolo svolto da un altro radicale rappresentato dall'Ossido di Azoto in grado di svolgere azione vasodilatatrice e che per questa sua caratteristica positiva è stato ampiamente studiato e sfruttato in campo farmacologico. Alla luce di queste ultime considerazioni va sottolineato, quindi, che

non sempre i radicali liberi espletano azione lesiva nei confronti del nostro organismo e che sono necessari, quindi, diversi fattori affinché essi esprimano la loro potenziale capacità ossidante. Infatti, il danno ossidativo dipende dalla coesistenza di diversi fattori: dalle caratteristiche intrinseche della struttura chimica dei radicali liberi, dalle proprietà strutturali e funzionali del substrato molecolare col quale vengono in contatto, ed infine dalle capacità difensive antiossidanti proprie dell'organismo. E' chiaro, quindi, che qualunque condizione in grado di determinare l'alterazione del fisiologico equilibrio esistente tra produzione ed eliminazione dei radicali liberi e deficit dei meccanismi difensivi antiossidanti propri dell'organismo, conduce all'insorgenza di uno stato di stress ossidativo e quindi alla comparsa di eventi patologici. (3-5)

In condizioni fisiologiche e, quindi, in condizioni di adeguato benessere generale dell'organismo, esiste una precisa condizione di equilibrio tra produzione ed eliminazione dei radicali liberi associata ad un'adeguata capacità difensiva dell'organismo indicata come Barriera Antiossidante. La barriera antiossidante gioca un ruolo assolutamente preponderante nell'azione difensiva esercitata dal nostro organismo nei confronti dell'attacco dei radicali liberi. Essa si avvale nell'espletamento della sua attività antiossidante di diverse molecole e sistemi enzimatici sia di origine esogena ovvero introdotti nel nostro organismo con un'adeguata alimentazione oppure come preparati di sintesi e sia di origine endogena ovvero direttamente prodotti dal fisiologico metabolismo cellulare. Queste molecole ad azione antiossidante sono in grado di neutralizzare prontamente i radicali liberi già al momento della loro formazione (Free Radical Scavengers) oppure in un secondo momento ovvero solo dopo che è stata già innescata la loro azione ossidativa. I sistemi enzimatici a maggiore attività antiossidante sono rappresentati dalla Superossidodismutasi (SOD) appartenente ad una famiglia di metallo-proteine la cui funzione è quella di eliminare l'anione radicalico superossido

(O₂); dalla Glutazione Perossidasi (GPx) che svolge azione riduttiva nei confronti degli idroperossidi organici utilizzando come co-substrato il Glutazione ed infine dalla Catalasi (CAT) che riduce il perossido di Idrogeno (H₂O₂).

In questa importante attività difensiva intervengono, altresì, Vitamine, Polifenoli, Oligoelementi. Come è stato più volte sottolineato, i radicali liberi, in particolari condizioni, sono in grado di espletare azione lesiva nei confronti di cellule e tessuti determinando la comparsa di alterazioni cronico-degenerative, cardiovascolari ed infiammatorie croniche responsabili di diverse condizioni patologiche. Nello specifico ricordiamo in modo particolare le alterazioni tipiche a carico dell'occhio che sono oggetto di questa relazione. L'occhio, infatti, a causa della sua particolare struttura anatomica e del suo continuo contatto con l'ambiente esterno, rappresenta sicuramente uno degli organi che subisce gli insulti esercitati dai radicali liberi. In modo particolare la nostra attenzione si rivolge soprattutto all'azione lesiva traumatica della superficie corneale. (3-5)

La comparsa di processi flogistici a carico dell'occhio o l'esposizione a radiazioni di vario tipo o ad agenti chimici possono essere direttamente responsabili del notevole aumento della fisiologica concentrazione di perossido di idrogeno a livello corneale con conseguente incremento di specie reattive dell'ossigeno responsabili di azione ossidativa della cornea. L'azione ossidativa esercitata dai radicali liberi a livello corneale si estrinseca con la comparsa di alterazioni strutturali e funzionali a carico sia dell'epitelio sia dello stroma corneale associati a processi apoptotici che vedono come protagonisti i cheratociti e i fibroblasti stromali.

Ai fini preventivi e terapeutici risulta quindi estremamente importante eseguire un'attenta e precisa valutazione globale dello stress ossidativo, oggi resa possibile attraverso l'esecuzione di indagini bio-umorali o l'esecuzione di Test raccomandati dalla

Comunità Scientifica Internazionale e dall'Osservatorio Internazionale dello Stress Ossidativo per la valutazione della concentrazione degli idroperossidi e del potere antiossidante del nostro organismo.

E' importante, altresì, soprattutto in base ai risultati di queste analisi, programmare un piano terapeutico individualizzato che preveda una modificazione dello stile di vita del paziente e della sua dieta alimentare associate alla somministrazione di antiossidanti in grado di ottimizzare al meglio le sue potenzialità difensive, allo scopo di ridurre al minimo l'azione lesiva dei radicali liberi e fortificare prontamente la sua barriera antiossidante e riportare, quindi, il perfetto e fisiologico equilibrio necessario a bloccare o almeno a rallentare la progressione di eventi patologici che inficiano il suo naturale benessere. (4, 5)

3.3 SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO NEL PROCESSO DI GUARIGIONE DELLE FERITE

Nella patologia odierna le ferite sono ancora un problema clinico e le loro complicazioni rappresentano una frequente causa di stati patologici di varia gravità.

Una ferita è definita come un danno o una distruzione delle normali strutture anatomiche e della funzionalità del tessuto interessato.

La guarigione delle ferite è un processo dinamico e complesso che coinvolge una sequenza di eventi cellulari coordinati: attraverso il processo di emostasi, la risposta infiammatoria acuta, la formazione del tessuto di granulazione, la riepitelizzazione e il rimodellamento, l'organismo cerca di ripristinare l'integrità strutturale e la completa o parziale funzionalità del tessuto. La guarigione delle ferite comincia nel momento stesso del ferimento e coinvolge cellule presenti nel sito della lesione, cellule migrate da aree diverse dell'organismo (cheratinociti, cellule endoteliali, fibroblasti, cellule

infiammatorie) e mediatori dell'infiammazione (citochine, chemochine, fattori della crescita). Anomalie in tale sequenza di eventi possono portare ad una insufficiente cicatrizzazione con riapertura della ferita o ad alterazioni nel sito della lesione. Sebbene al momento i meccanismi patogenetici alla base di tali fenomeni non siano del tutto chiariti, molte ricerche concordano sul fatto che l'interleuchina-6 (IL-6) e il fattore trasformante beta-1 (TGF- β 1) svolgano un ruolo chiave in tali processi. Altri studi evidenziano che numerosi aspetti della guarigione delle ferite sono sotto il controllo delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) rilasciate dai macrofagi migrati nel sito della lesione; un eccesso nella concentrazione delle specie ROS porta alla condizione di stress ossidativo, limitando il processo di guarigione e causando danno tissutale e perpetrazione dello stato di non guarigione della ferita.

Numerosi aspetti del processo di guarigione delle ferite sono sotto il controllo delle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Sperimentalmente è stato osservato che l'essudato della ferita contiene concentrazione micromolari di perossido di idrogeno (H₂O₂). Tali livelli sono significativamente elevati nella fase infiammatoria rispetto alla fase postinfiammatoria (Jiri Kanta, 2011).

Nel sito della ferita le specie reattive dell'ossigeno non solo disinfettano ma contribuiscono direttamente al processo di guarigione. Neutrofili e macrofagi rilasciano ROS nel sito della ferita, ROS che derivano da attività respiratoria dei fagociti tramite:

- enzimi della famiglia NADPH ossidasi fagocitaria (phox)
- enzimi della famiglia NADPH ossidasi non fagocitaria (Nox) espresse in cellule come fibroblasti, cellule endoteliali, cheratinociti.

I macrofagi migrati nel sito della lesione rilasciano una ampia quantità di radicali superossido prodotti dalla NADPH ossidasi. Questo complesso enzimatico è composto da proteine localizzate nelle membrane dei fagosomi di fagociti. Alcuni componenti del

complesso enzimatico si trovano nel citosol ed in seguito a stimolazione si localizzano sulle membrane. Il complesso enzimatico della NADPH ossidasi trasferisce elettroni dal NADPH all'ossigeno molecolare producendo radicale superossido che viene convertito in perossido di idrogeno dagli enzimi SOD. Anche le cellule non fagocitarie come i fibroblasti contengono il complesso della NADPH ossidasi o altri sistemi enzimatici che generano superossido. I fibroblasti producono ROS quando sono stimolati da citochine infiammatorie: IL-1, TNF α o dai fattori della crescita EGF e PDGF.

Se la fase infiammatoria non si risolve e la concentrazione delle ROS eccede rispetto alla capacità antiossidante della cellula, si ha la condizione di stress ossidativo che è uno tra i più importanti fattori che limitano il processo di guarigione. Lo stress ossidativo mediato dai radicali ROS (anione superossido, radicale idrossile) e dalle ROS non radicaliche (perossido di idrogeno) può inibire la migrazione e la proliferazione cellulare causando danno tissutale e perpetrazione dell'infiammazione.

Ci sono due tipi di sistema di difesa che le cellule hanno sviluppato per detossificare le ROS:

- sistema non enzimatico costituito da molecole antiossidanti come: vitamina C, vitamina E, β -carotene, glutazione, coenzima Q, bilirubina e urato;
- sistema enzimatico che comprende tre tipi di superossido dismutasi (citosolico, mitocondriale, extracellulare), glutazione perossidasi e catalasi.

Elevati livelli di SOD sono stati trovati nelle fasi iniziali del processo riparativo delle ferite. Il perossido di idrogeno prodotto da SOD viene poi decomposto da catalasi e viene usato per ossidare il substrato adatto come il glutazione, in una reazione catalizzata dalla glutazione perossidasi. (4, 5)

4. FENILPROPANOIDI

I Fenilpropanoidi glicosidici (PPG) sono derivati solubili in acqua dei Fenilpropanoidi (PP), il più grande gruppo di Polifenoli naturali ampiamente distribuito nel regno vegetale. (6)

Attualmente, sono noti più di duecento diversi PPG, estratti da parti aeree e radici delle piante appartenenti alle famiglie delle Labiateae, Asteraceae, Oleaceae, Liliaceae.

Questi composti costituiscono un'ampia classe di prodotti di origine naturale, chiamati anche "fenoli delle piante" per la presenza di uno o più gruppi ossidrilici, che si formano a partire da amminoacidi aromatici quali fenilalanina e tirosina.

Questi ultimi si generano dalla via dello shikimato, che fornisce una via alternativa per la produzione di amminoacidi aromatici che è impiegata da piante e microrganismi, ma non da animali. Da un punto di vista chimico, i Fenilpropanoidi sono formati da un anello aromatico a cui è legato un gruppo propionico; in posizione para sull'anello, sono presenti generalmente gruppi ossigenati quali quelli idrossilici, metossilici o metilendiossilici. Tra essi possiamo citare l'acido cinnamico ed i suoi derivati, l'acido caffeico, l'acido ferulico, l'acido p-cumarico, le cumarine, i cromoni. L'acido cinnamico si genera per eliminazione di una molecola di ammoniacca dalla catena laterale della L-fenilalanina, mentre la stessa reazione nella L-tirosina porta alla formazione dell'acido 4-cumarico. (6-8)

Tutte le piante hanno la capacità di deamminare la fenilalanina mediante l'azione di un enzima chiamato fenilalanina ammonia liasi (PAL), ma la corrispondente trasformazione della tirosina è meno comune ed è limitata solo alle piante della famiglia delle Gramineae. Altri acidi cinnamici, come l'acido caffeico e l'acido ferulico, sono ottenuti da ulteriori reazioni di ossidrilazione e metilazione.

Le cumarine, invece, si formano a partire dall'ossidrilazione degli acidi cinnamici in orto alla catena laterale. Dalla polimerizzazione dei fenilpropanoidi si ottengono infine lignine e tannini.

Da un punto di vista farmacologico, i Fenilpropanoidi sono dotati di attività antisettiche e antiparassitiche e sono utilizzati, in tecnica farmaceutica, come correttivi del sapore.

Tra le principali proprietà biologiche comunemente ascritte ai Fenilpropanoidi glicosidici vanno ricordate quelle antibatteriche, antimicotiche e antivirali, probabilmente da ascrivere alla componente fenolica. Recentemente sono state riportate evidenze farmacologiche per l'attività neurosedativa che pare accordarsi con l'iso di alcune droghe contenenti questi composti.

Vi è una crescente evidenza che Fenilpropanoidi glicosidici, come altri Polifenoli vegetali in generale e in particolare i Fenilpropanoidi, sono potenti antiossidanti sia come scavenging diretto di ossigeno reattivo e specie azotate. I Polifenoli come i Fenilpropanoidi glicosidici e i Bioflavonoidi con due gruppi -OH adiacenti o altre strutture chelanti, possono anche legare metalli di transizione, prima di tutto ferro e rame, in forme poco attive nella promozione di reazioni a catena dei radicali liberi. Recentemente, si è evidenziato che i Fenilpropanoidi glicosidici possiedono molteplici effetti benefici per salute umana. Infatti, sono efficaci nella prevenzione dei tumori, hanno attività anti-infiammatoria, effetti anti-trombotici, azioni cardio-protettive, inoltre sono importanti nel promuovere la guarigione delle ferite. (7)

4.1 IL METABOLISMO FENILPROPANOIDICO

Il Metabolismo Fenilpropanoide comprende una sequenza di reazioni che porta alla formazione di derivati attivati dell'acido cinnamico a partire da fenilalanina e/o tirosina. L'enzima chiave di questo pathway biosintetico è la fenilalanina ammonio liasi (PAL), il quale catalizza la deaminazione della L-fenilalanina con conseguente formazione di quantità equimolari di acido trans-cinnamico e ione ammonio, il quale fornisce un legame tra metabolismo primario e metabolismo fenilpropanoide. Lo ione ammonio generato dalla PAL viene incorporato in glutamina via glutamina sintetasi (GS) e, successivamente, in glutammato via glutamina: 2-ossiglutarato amminotrasferasi (GOGAT). Il glutammato così formato funge da donatore di azoto nella biosintesi degli amminoacidi aromatici, in particolare viene utilizzato nella formazione di arogenato a partire da p-fenilalanina ed, in seguito, trasformato in fenilalanina e tirosina, viene reimmesso nel metabolismo fenilpropanoide. In mancanza di un efficiente riciclaggio dello ione ammonio possono osservarsi sintomi di deficienza di azoto e/o di tossicità da ione ammonio. Un enzima analogo alla PAL, la tirosina ammonio liasi (TAL), ritrovato essenzialmente nelle Graminaceae, catalizza in maniera analoga la deaminazione della tirosina con formazione dell'acido trans-p-cumarico. La biosintesi dei composti C₆-C₃ ha, quindi, origine a partire da un amminoacido aromatico, la L-fenilalanina o la L-tirosina, e comprende una serie di reazioni in cui, dopo la deaminazione dell'amminoacido, si susseguono una serie di sostituzioni sull'anello aromatico, idrossilazioni e metossilazioni, che portano alla formazione dei vari derivati dell'acido che portano alla formazione dei vari derivati dell'acido 4-idrossicinnamico (acido p-cumarico). L'attività PAL è stata purificata e caratterizzata in numerosissime specie vegetali. L'enzima presenta una certa omogeneità nelle diverse preparazioni: l'enzima estratto dalle piante superiori ha un peso molecolare di circa 330.000 Da, più

grande di quello estratto da *Streptomyces verticillatus* che ha un peso di 226.000 Da, ed è composto da 4 subunità, probabilmente identiche (PM circa 83.000 Da). Nel sito attivo, due o quattro per tetramero, è stata identificata una deidroalanina quale costituente essenziale del centro catalitico. Molte preparazioni enzimatiche si sono rivelate in grado di catalizzare l'eliminazione di ammoniaca da diversi derivati o-, m- e p-sostituiti della fenilalanina, inclusa la tirosina. Questi dati hanno sollevato la questione relativa all'esistenza di un unico enzima responsabile di tutte le attività osservate o, alternativamente, di più enzimi responsabili della catalisi nelle diverse reazioni. E' stato proposto che PAL e TAL possano essere due distinti enzimi presenti in alcune specie vegetali, ma di fatto non sono stati ritrovati casi di specie vegetali in cui fosse presente la sola attività TAL disgiunta dall'attività PAL. Al contrario, esistono numerosissimi casi di preparazioni enzimatiche in cui è presente la sola attività PAL, pertanto l'unica generalizzazione possibile è che alcune preparazioni di PAL presentano un'attività catalitica nei confronti della tirosina. Il prodotto della deaminazione della fenilalanina, l'acido trans-cinnamico, viene, successivamente convertito in acido 4-idrossicinnamico sotto l'azione catalitica dell'acido cinnamico 4-idrossilasi (CA4H), un'ossidasi che richiede ossigeno molecolare ed NADPH come cofattori. L'acido p-cumarico, a sua volta, viene convertito nel suo corrispondente derivato attivato, il p-cumaroil-coenzima a tioestere, ad opera di una idrossicinnamato: CoA ligasi (4CL), un enzima con una pronunciata specificità nei confronti dei derivati dell'acido cinnamico caratterizzati dalla presenza di un gruppo OH libero sull'anello benzenico ed il quale richiede ATP e CoASH come cofattori. Il derivato attivato dell'acido p-cumarico, oltre che da prodotto finale del metabolismo fenilpropanoidico, funge da precursore nella biosintesi di altri composti fenolici. Oltre alla CA4H, una mono-ossigenasi citocromo P-450-dipendente legata a membrana, che utilizza NADPH come agente riducente mentre

il ferro del citocromo si combina con l'O₂ prima che questo si combini con il substrato, nel pathway C6-C3 sono coinvolte altre idrossilasi: la cinnamato-2-idrossilasi, un enzima non ben caratterizzato il quale produce acido o-cumarico, ed una fenolasi che catalizza la conversione dell'acido p-cumarico in acido caffeico (acido 3,4-diidrossicinnamico) con l'introduzione di un secondo gruppo -OH in un monofenolo in posizione orto rispetto al gruppo -OH preesistente ed, usualmente, in posizione meta rispetto alla catena laterale di atomi di carbonio. Quest'ultimo enzima, una mono-ossigenasi contenente rame in grado di accettare equivalenti riducenti da un ampio raggio di donatori di idrogeno, presenta una specificità piuttosto bassa per il substrato, ma molto elevata per quanto concerne la posizione dell'idrossilazione. Alcune preparazioni enzimatiche, infatti, sono in grado di catalizzare l'idrossilazione in posizione 3' dei flavonoidi naringenina, diidrocampferolo e kampferolo, utilizzando come cofattori NADPH ed O₂. (6-13)

5. VERBASCOSIDE

(Acteoside; Kusagin; $C_{29}H_{36}O_{15}$). Il Verbascoside è un glicoside Fenilpropanoide e uno zucchero estere dell'acido caffeico. Può essere trovato in specie dell'ordine delle Lamiaceae (famiglia Scrophulariaceae). Può anche essere prodotto in colture di cellule vegetali di *Leucosceptrum* sp (Lamiaceae) e *Syringa* sp (Oleaceae).

I derivati del Verbascoside possono essere trovati nel *Verbascum undulatum* in particolare nel *Verbascum* sp. (14)

Trova impiego per le sue proprietà antiossidanti nella preparazione di farmaci, cosmetici e alimenti. Le proprietà biologiche del Verbascoside, noto anche come Acteoside, sono state descritte in letteratura e comprendono un ampio spettro di attività, tra cui attività antiossidanti, antiinfiammatorie, fotoprotettive e azioni chelanti.

Possiede, inoltre, attività antitumorale, antibiotica e immunodepressiva. Il Verbascoside è indicato come una molecola efficace nel prevenire o contenere lo stress ossidativo e di conseguenza migliorare lo stato di salute per le sua attività antiinfiammatoria, antitumorale, antivirale, antibatterica ed epatoprotettiva. (15-19)

Il Verbascoside ha un'attività antimicrobica, in particolare contro lo *Staphylococcus aureus*. Presenta anche un profilo genotossico sui linfociti per un coinvolgimento di PARP-1 e delle proteine p53. È un inibitore della protein-chinasi C e dell'aldosio-reduttasi, possiede attività immunomodulatore e antitumorale nonché ipertensiva e anti-epatotossica ed anche antidolorifica nel dolore neuropatico.

In particolare, un significativo effetto antiossidante del Verbascoside è stato recentemente documentato da Aleo et al. in uno studio sperimentale che mette a confronto numerose sostanze antiossidanti naturali con vari metodi di determinazione.

Inoltre l'attività antiinfiammatoria del Verbascoside è stata confermato da un test in

vitro eseguito su colture cellulari di cheratociti umani primari, in cui il Verbascoside è stato in grado di ridurre in modo significativo, con un effetto dose-dipendente, il rilascio di citochine pro-infiammatorie.

Uno studio in vivo, condotto sull'infiammazione della mucosa intestinale, ha dimostrato che il Verbascoside è in grado di inibire l'attivazione di proteine pro-infiammatorie e di conseguenza l'attività enzimatica delle metalloproteinasi della matrice. Pertanto, la somministrazione del Verbascoside può essere utile per il trattamento della malattia infiammatoria intestinale. (20-22)

Effetto antiossidante:

Il noto effetto antiossidante del verbascoside è stato confermato ex vivo attraverso il test KRL in estratti di diversa origine botanica, normali estratti od ottenuti mediante colture cellulari. A livello ematico, con significativa riduzione dei prodotti d'ossidazione (ROMs) ed aumento dell'attività antiradicalica globale del sangue.

A livello enterico con riduzione dell'ossidazione a carico delle proteine come evidenziato dalla riduzione della nitrotirosina.

A livello epatico in condizioni di stress ossidativo indotto da un elevato tenore lipidico delle diete. (22-24)

Effetto antinfiammatorio:

L'effetto antinfiammatorio del Verbascoside è stato osservato in vitro e negli animali da laboratorio e si esplica attraverso:

- Inibizione selettiva della 5-lipossigenasi e della proteina kinasi C (enzimi coinvolti nel processo infiammatorio);
- Inibizione significativa e concentrazione dipendente il rilascio di NO alle concentrazioni di 0.1 e 0.5mg/ml;
- Inibizione dell'espressione della COX-2, enzima pro-infiammatorio.

- Azione come scavenger intracellulare con riduzione dei segni microscopici e macroscopici della colite nel ratto.

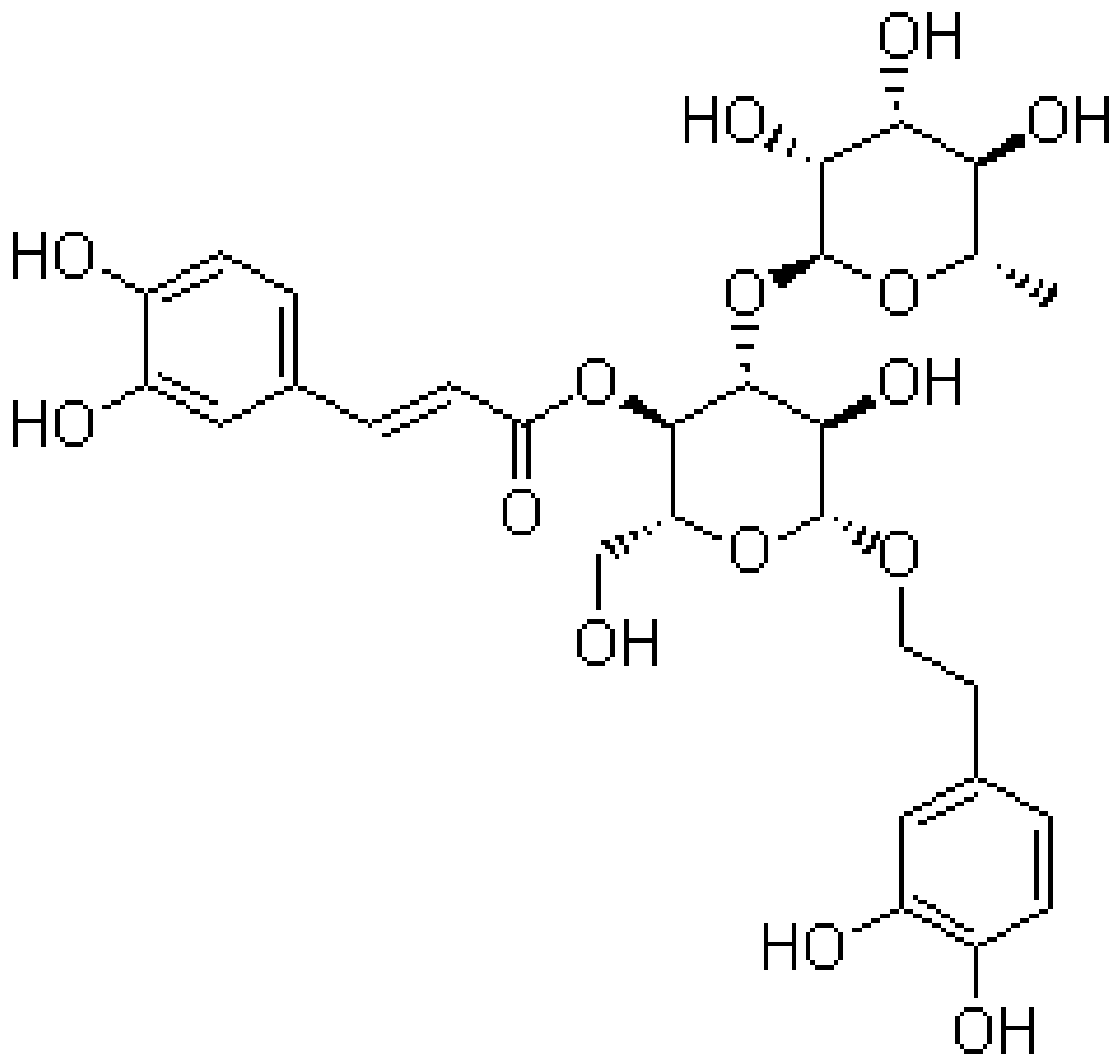


Figura 5: Struttura chimica del Verbascoside.

6. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro è stato, dunque, quello di valutare l'effetto antiinfiammatorio, antiossidante e l'eventuale capacità di induzione della rigenerazione tissutale da parte del Verbascoside.

Lo studio è stato condotto con l'obiettivo di verificare il comportamento del principio attivo in soluzione o in preparazioni, in vista del suo uso potenziale in preparati farmacologici.

Per il raggiungimento di tale scopo sono state utilizzate differenti strategie sperimentali volte a valutare sia il ruolo della molecola target sui parametri ematici relativi allo stress ossidativo che l'effetto topico che essa è eventualmente in grado di svolgere. In particolare ci proponiamo di verificare il ruolo che il Verbascoside ha sui processi di rigenerazione dei tessuti oculari in corso di lesioni sperimentali che riproducono le più comuni lesioni traumatiche a carico dell'occhio e che coinvolgono primariamente la cornea.

7. MATERIALI E METODI

7.1 MATERIALI

Lo studio sperimentale è stato condotto in collaborazione tra il personale dei Dipartimenti di: “Agricoltura, Ambiente ed Alimenti”, “Bioscienze e Territorio” e “Medicina e Scienze della Salute” dell’Università degli Studi del Molise.

Parte degli esperimenti sono stati condotti presso la Sezione di Anatomia Umana diretta dalla Prof.ssa Stefania Montagnani del Dipartimento di Sanità Pubblica dell’Università degli Studi di Napoli “Federico II”.

La strategia sperimentale si è articolata in due distinte fasi: nella prima è stato condotto su un campione di 20 lepri di cui 15 hanno ricevuto nella dieta concentrazioni crescenti di Verbascoside mentre alle restanti 5 è stata somministrata una normale dieta priva di questo integratore dalle notevoli proprietà biologiche. Gli animali erano omogenei per età (80 ± 2 giorni) e per peso corporeo (2.47 ± 0.15 Kg). Gli animali sono stati divisi in quattro gruppi di 5 animali ciascuno; nei primi tre gruppi sono state somministrate concentrazioni crescenti di Verbascoside che sono state rispettivamente: 0.5 mg/100 grammi di cibo nel primo gruppo (gruppo VB100), 0.75 mg/100 grammi di cibo nel secondo gruppo (gruppo VB 150) e 1 mg/100 grammi di cibo nel terzo gruppo (gruppo VB 200), somministrato giornalmente in capsule lipidiche sottili delle dimensioni di 100-1000 μm ; il quarto gruppo è rappresentato dal gruppo di controllo.

Dopo un trattamento di 3 mesi 11 degli animali del gruppo di studio e 3 animali del gruppo sono stati sacrificati e le singole strutture oculari sono state valutate attraverso il test TEAC per la risposta allo stress ossidativo.

In una seconda fase sono state utilizzate le 8 lepri non sacrificate di cui 2 appartenenti al gruppo allevato con una dieta priva di Verbascoside e 4 appartenenti al gruppo allevato con una dieta supplementata con integratori a base di Verbascoside

Di questo nuovo gruppo di studio fanno parte 2 animali appartenenti al gruppo VB150 e 2 animali appartenenti al gruppo VB200.

In questa fase sperimentale si sono valutati anche gli effetti della somministrazione topica di questo Fenilpropanoide Glicosidico.

Negli animali è stata successivamente provocata una lesione da caustici mediante applicazione di alkali (idrossido di sodio) secondo un preciso e consolidato protocollo sperimentale. In ciascuno degli animali l'occhio non interessato dalla lesione ha rappresentato il campione di controllo.

Dopo la lesione, l'occhio è stato immediatamente sottoposto alle misure di emergenza utilizzate nel caso di lesioni chimiche ed a partire da 8 ore dopo l'induzione della lesione è stato somministrato per instillazione un collirio contenente Verbascoside.

La somministrazione del collirio è proseguita per 10 giorni con il dosaggio di 5 gocce di collirio due volte al giorno.

Dopo il trattamento è stato eseguito un esame oftalmoscopico di controllo e successivamente si è proceduto al sacrificio degli animali per poter prelevare le cornee da utilizzare per la valutazione morfologica.

Lo studio è stato condotto nel pieno rispetto delle normative previste dalla sperimentazione animale.

Lo studio è stato approvato dai Comitati Etici delle Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" e dell'Università degli Studi del Molise ed è stato svolto nel rispetto dei principi e delle norme enunciate nella Dichiarazione di Helsinki.

7.2 SAGGIO ABTS

Si tratta di un metodo analitico che utilizza una misura di tipo spettrofotometrico per determinare la capacità antiossidante di un campione. Tramite uno spettrofotometro UV-Vis viene misurata l'assorbanza di una soluzione contenente il radicale $ABTS^+$, generato per ossidazione dell'ABST (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonato), una sostanza incolore che nella forma radicalica si colora assorbendo a lunghezze d'onda caratteristiche nel range del visibile. L'aggiunta alla soluzione di $ABTS^{*+}$ di molecole antiossidanti, che possono agire tramite cessione sia di idrogeno che di un elettrone, determina la riduzione del radicale alla forma incolore, con conseguente decolorazione della miscela di reazione. Tale decolorazione, proporzionale alla quantità di antiossidante presente, può essere misurata come diminuzione dell'assorbanza in un certo tempo ad una specifica lunghezza d'onda (734 nm). Il potere antiossidante viene espresso per confronto con i valori di assorbanza misurati per quantità note di una molecola antiossidante scelta come standard di riferimento, che di solito è acido ascorbico o Trolox (in tal caso si parla di attività antiossidante TEAC Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). La misura del potere antiossidante basata sull'impiego dell'ABTS ha il vantaggio di essere semplice e rapida. Inoltre, permette la misurazione di sostanze antiossidanti sia idrofile che lipofile in un ampio range pH. Tuttavia, bisogna tener presente che il radicale impiegato ($ABTS^{*+}$) non è fisiologico e non è presente nei sistemi biologici e che spesso si evidenziano problemi di ripetibilità della misurazione dovuti alle cinetiche di reazione dei diversi antiossidanti coinvolti.

7.3 VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI

Per stimare l'indice di morte cellulare, i campioni di cornea sono state fissati in paraformaldeide all'1%.

Le cellule apoptotiche sono state marcate e identificate utilizzando "*ApopTag Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit*".

Questo test sfrutta un tipico aspetto dell'apoptosi, ovvero la frammentazione, in singolo e doppio filamento, del DNA nucleare che libera terminali 3'-OH.

I campioni sono stati incubati in presenza di nucleotidi marcati con digoxigenina e in presenza dell'enzima TdT (Deossinucleotidiltransferasi terminale) che catalizza l'aggiunta di nucleotidi in modo "stampo-indipendente".

I nucleotidi incorporati sono stati così rilevati mediante l'utilizzo di un anticorpo marcato con fluoresceina diretto contro la digoxigenina. In questo modo è stato possibile discriminare le cellule apoptotiche da quelle normali. Infatti le nuove estremità terminali, generate dalla frammentazione del DNA, sono localizzate in nuclei alterati dal punto di vista morfologico, oppure nei tipici corpi apoptotici, e possono essere facilmente individuati.

Le cellule normali, o in proliferazione, che hanno un numero di estremità 3'-OH insignificante, non danno alcuna colorazione con questo kit

7.4 IMMUNOISTOCHEMICA

Mediante immunohistochemica utilizzando la metodica immunoenzimatica della avidina-biotina perossidasi è stata valutata la distribuzione del collagene I e III. I campioni di cornea sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina e sottoposti a taglio al microtomo ottenendo sezioni seriate dello spessore di 4 µm. Le sezioni seriate dello spessore di 4 µm sono state sottoposte a sparaffinatura, successivamente reidratate sottoposte a tre lavaggi in PBS ed immerse per 3' in H₂O₂ allo 0,3% per neutralizzare l'attività perossidasi endogena; le sezioni sono state quindi incubate con gli anticorpi primari, in camera umida per un'ora a 37° C oppure overnight a 4° C. Gli anticorpi primari utilizzati sono stati i seguenti: monoclonali contro Collagene di tipo I e III (Sigma, St.Louis, Missouri, USA). I vetrini sono stati quindi sottoposti a numerosi lavaggi in PBS e poi incubati con gli anticorpi secondari sviluppati in coniglio e coniugati con perossidasi (Dako, Carpinteria CA, U.S.A.), in camera umida per un'ora a 37° C. Le sezioni dopo essere state lavate ripetutamente in PBS sono state incubate con il complesso avidina-biotina perossidasi (ABC/HRP; Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.) per 30'. La reazione di colorazione è stata sviluppata con una soluzione di 0,6 mg/ml di DAB (diaminobenzidina idrocloride) contenente H₂O₂ allo 0,03% per 10'. Le sezioni sono infine state sottoposte a colorazione nucleare con Ematossilina e successivamente montate in soluzione acquosa di glicerolo. L'osservazione è stata fatta con un microscopio Leica DMLB (Leica Microsystem, Inc, Bannockburn, III, Germania) connesso ad un PC attraverso una fotocamera digitale Leica LC200.

I campioni sono stati valutati da tre osservatori indipendenti utilizzando una scala arbitraria di 4 valori che vanno dall'assenza di immunopositività (-) a quella massima (+++).

Un avanzato software per analisi di immagine computerizzato (Quantimet 520, Leica, Solms, Germany) è stato inoltre utilizzato per una valutazione semiquantitativa della immunopositività delle sezioni.

Le immagini sono state acquisite direttamente attraverso un microscopio ottico Leitz Axiophot (Leitz, Wetzlar, Germany) all'ingrandimento x 20 attraverso una videocamera specializzata (DC 200, Leica).

Le aree istologiche esaminate sono state digitalizzate e successivamente esaminate attraverso il software. La qualità ottica di queste aree è stata ottimizzata modificandone la luminosità ed il contrasto.

Le aree immunopositive sono state evidenziate dal programma sulla base di una scala di grigi e misurate.

La superficie occupata dagli antigeni marcati è stata espresso come percentuale di aree positive per la immunocolorazione rispetto alla totalità del campione esaminato (pixels colorati/pixels totali).

Questa misurazione è stata realizzata per cinque sezioni di ciascun campione e di ciascun campione sono stati esaminati 6 campi; i valori riportati si riferiscono alla media delle misurazioni di tutti i campi per ciascuna sezione.

Anche questa analisi è stata effettuata utati da tre osservatori indipendenti e la valutazione è avvenuta "in cieco".

7.5 ANALISI STATISTICA

Il software SPSS (versione 10.1; SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA) è stato utilizzato per l'analisi statistica.

Le variabili continue sono state espresse come media \pm DS (Deviazione Standard).

I valori della rinoscopia sono stati confrontati attraverso il test del chi quadro (χ^2).

I valori della immunostochimica, Western Blot, e PCR sono stati confrontati con un test del tipo t di Student per variabili non appaiate.

Le differenze tra i diversi gruppi di studio sono stati analizzati attraverso l'analisi della varianza con la correzione di Bonferroni.

8. RISULTATI

8.1 Valutazione Oculistica

Dopo 10 giorni dall'inizio della terapia è stato eseguito un esame oftalmoscopico dal Medico Oculista del Dipartimento di Medicina e Scienze della salute e dal Medico Veterinario del Dipartimento di Agricoltura, Ambiente ed Alimenti dell'Università degli Studi del Molise.

L'esame oftalmoscopico ha evidenziato una completa riepitelizzazione dell'area causticata in assenza di edema ed arrossamento.

Anche le prove funzionali hanno mostrato una sostanziale completa ripresa della capacità visiva dell'animale.

Nella Figura sono mostrate due foto riferite ad uno degli animali prima (A) e dopo il trattamento (B).

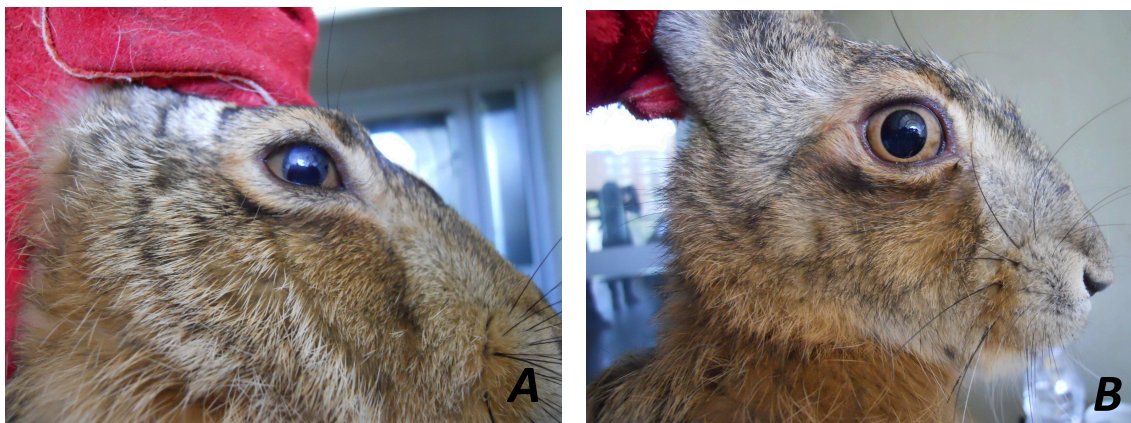


Figura 6: Nella figura vengono mostrate le foto di una lepre prima (A) e dopo (B) trattamento con Verbascoside

8.2 Saggio ABTS

I risultati del Test spettrofotometrico ABTS mostrano un evidente aumento del potere antiossidante nei campioni degli animali trattati rispetto al campione di controllo.

La capacità antiossidante incrementa in maniera significativa con l'incremento della concentrazione di Verbascoside all'interno della dieta dell'animale.

I campioni del segmento posteriore mostrano complessivamente un incremento maggiore della capacità antiossidante rispetto a quelli del segmento anteriore.

I risultati del test ABTS sono efficacemente riassunti in forma grafica nelle figure 7 e 8.

Nella figura 7 sono messi in evidenza i dati relativi alle strutture del segmento anteriore mentre nella figura 8 sono espressi in forma grafica i risultati riferiti alle strutture del segmento posteriore.

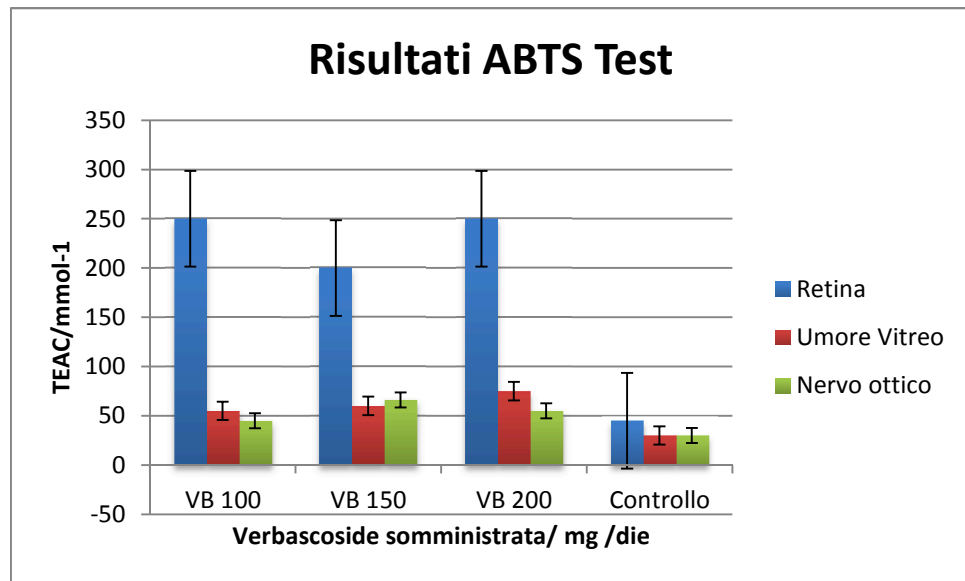


Figura 7: Nella figura vengono mostrati i risultati del test spettrofotometrico ABTS riferito al potere antiossidante misurato nelle strutture del segmento anteriore dell'occhio.

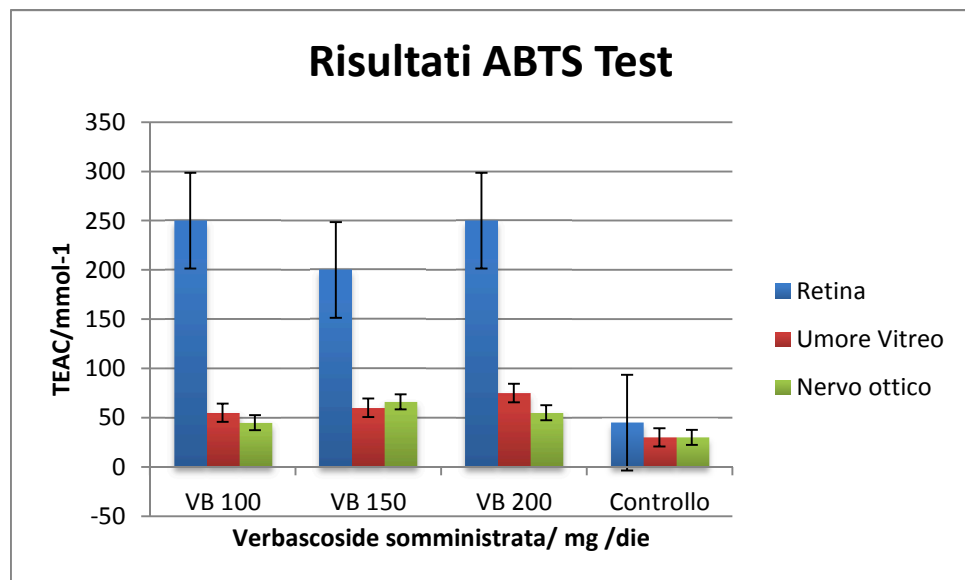


Figura 8: Nella figura vengono mostrati i risultati del test spettrofotometrico ABTS riferito al potere antiossidante misurato nelle strutture del segmento posteriore dell'occhio.

8.3 Apoptosi

I risultati degli indici apoptotici non ha mostrato differenze significative nelle cornee sottoposte a lesione chimica rispetto alle cornee degli occhi di controllo.

Anche il differente potere antiossidante dimostrato attraverso il test ABTS non sembra avere effetto su questo parametro non essendosi evidenziate differenze in relazione ai livelli di Verbascoside assunti con la dieta.

I risultati dell'analisi apoptotica sono stati riassunti nella Tabella 1.

Nella Figura 9 viene mostrata a titolo esemplificativo una immagine in microscopia a fluorescenza.

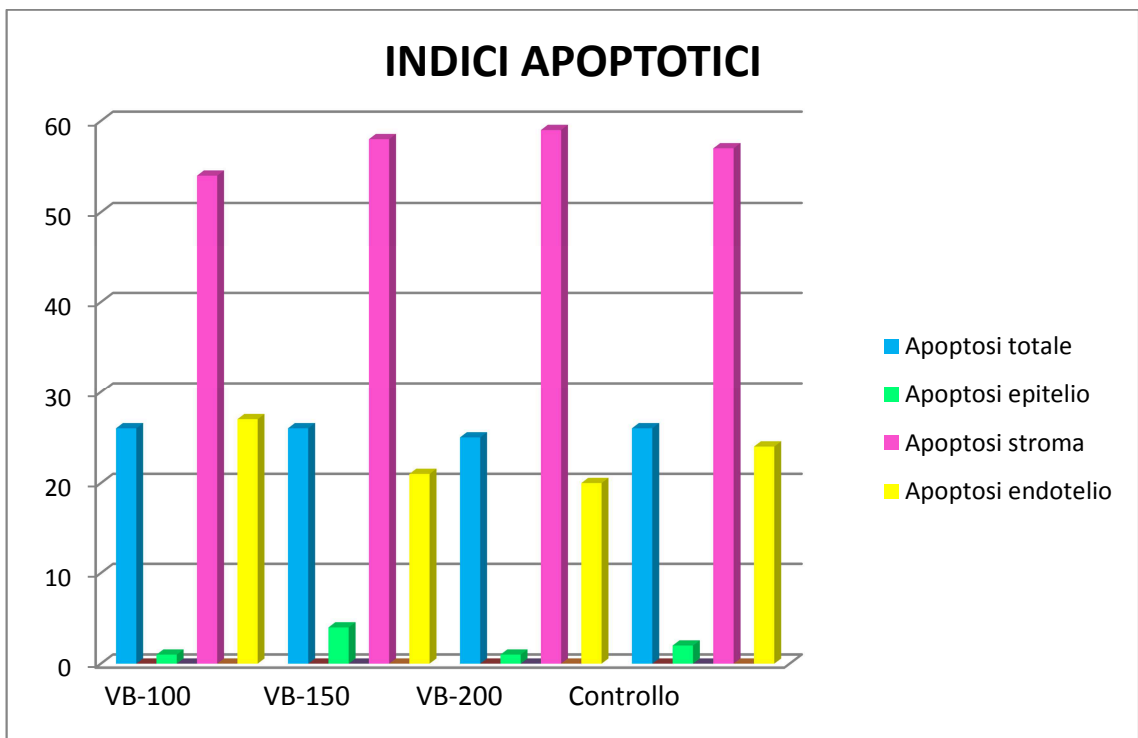


Tabella 1: Indici apoptotici delle cornee di animali trattati e di controllo.

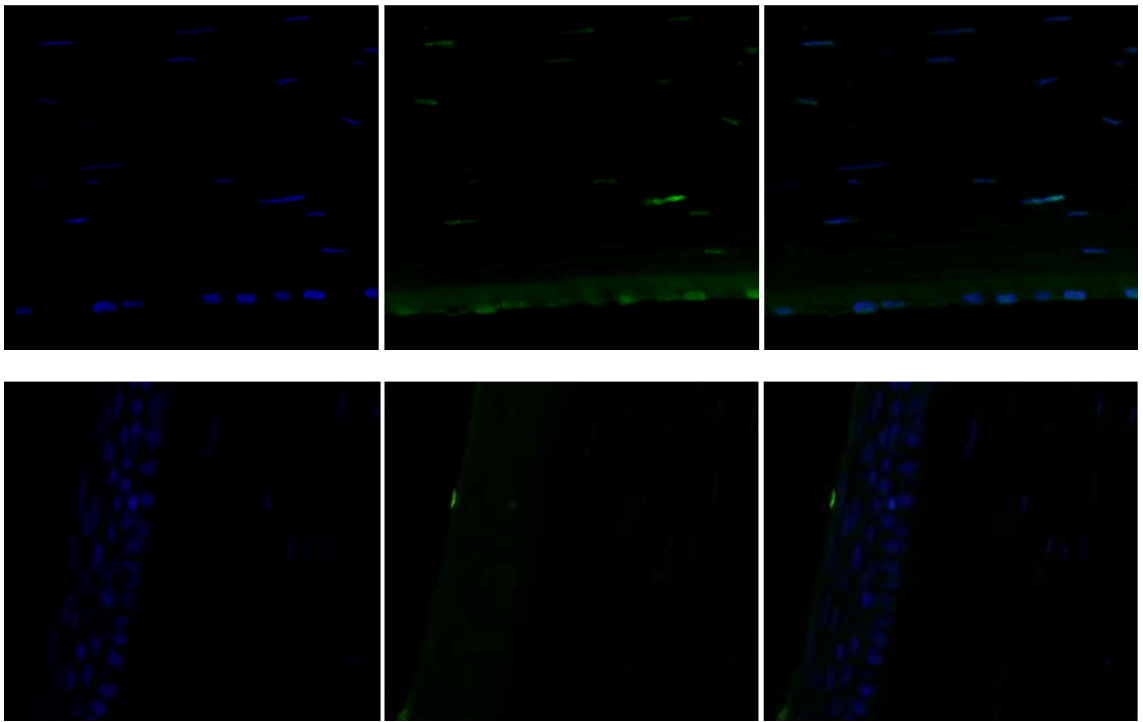


Figura 9: Microscopia a fluorescenza esemplificativa del test apoptotico.

8.4 Immunoistochimica

L'analisi immunoistochimica delle cornee degli occhi di lepri alle quali è stata praticata la lesione da alkali evidenzia un incremento della sintesi complessiva di collagene rispetto alle cornee di controllo.

Analizzando la distribuzione delle diverse tipologie di collagene all'interno sia dello stroma corneale che del connettivo subepiteliale e sottoendoteliale si osserva un incremento più significativo del collagene di tipo I rispetto al collagene di tipo III.

Rispetto alla quantità di Verbascoside somministrato con la dieta l'analisi della sintesi di collagene evidenzia che una maggiore quantità di Verbascoside correla positivamente con l'incremento della sintesi di collagene.

I risultati dell'analisi immunoistochimica sono riassunti nella Tabella 2.

Nella figura 10 sono invece mostrate delle immagini esemplificative della immunopositività per Collagene I e Collagene III nel gruppo di studio ed in quello di controllo.

| | VB150 | VB200 | Control |
|---------------------|-------|-------|---------|
| Collagen I | ++ | +++ | + |
| Collagen III | + | ++ | + |

Tabella 2: Risultati dell'analisi immunohistochimica.

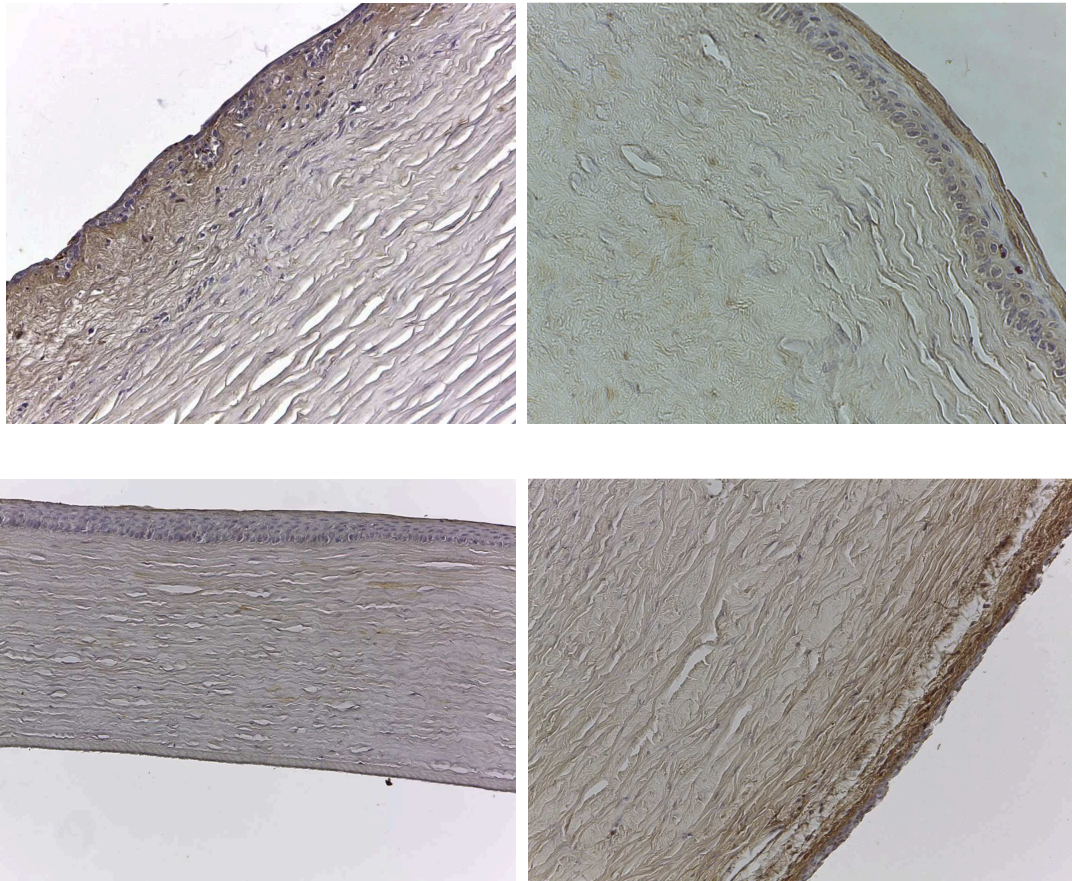


Figura 10: Immunopositività per Collagene I e Collagene III. Ingrandimento 40x.

7. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le lesioni chimiche dell'occhio possono determinare un danno esteso alle strutture della superficie oculare, agli strati corneali ed all'intero segmento anteriore.

L'ischemia tessutale, la necrosi cellulare e la denaturazione delle proteine (specialmente del collagene), provocano una reazione infiammatoria che potrebbe esitare in un'alterazione dell'integrità oculare con deficit uni- o bilaterale della visione.

Una grande varietà di agenti chimici e tossici possono danneggiare la superficie oculare, ma se non penetrano profondamente spesso il trauma è reversibile.

Gli acidi deboli tendono a rimanere confinati alla superficie oculare determinando la precipitazione delle proteine dell'epitelio, perdendo rapidamente la loro forza di penetrazione e formando una barriera parziale che impedisce all'acido residuo di penetrare più in profondità.

Gli acidi forti, al pari degli alcali, possono penetrare assai velocemente nell'occhio determinando lesioni più severe. Gli alcali saponificano le membrane cellulari, denaturano il collagene, penetrano profondamente e rapidamente nell'occhio danneggiando la superficie oculare ed il segmento anteriore.

Ricerche cliniche e di laboratorio hanno contribuito alla comprensione dei processi fisiopatologici ed hanno facilitato lo sviluppo di strategie mediche e chirurgiche per una terapia di successo.

La frequenza e la distribuzione delle lesioni chimiche dell'occhio variano da nazione a nazione. La maggior parte delle vittime sono giovani ed in molti casi l'esposizione all'agente chimico avviene in ambiente industriale, in quello domestico ed in occasione di azioni criminali.

Le lesioni da alkali sono molto più frequenti di quelle da acidi a causa della loro

presenza nei detersivi domestici e nei materiali da costruzione.

Recenti studi riferiscono che l'incidenza delle causticazioni oculari varia dal 7,7% al 18% di tutti i traumi oculari.

Ci sono profonde ripercussioni psicologiche, sociali ed economiche in seguito alla causticazione oculare. Il trauma chimico anche di un solo occhio determina costi sanitari, spesso perdita del lavoro, conflitti interpersonali ed isolamento almeno per il periodo di tempo necessario a stabilizzare l'occhio colpito.

La cecità conseguente alle causticazioni bilaterali solitamente restringe le opportunità di lavoro ed economiche. (3)

I risultati del nostro studio dimostrano come l'incremento dei meccanismi di difesa dell'organismo tra cui è certamente compreso il potere antiossidante dei nostri organi e tessuti sia una valida strategia per la prevenzione ed il trattamento delle lesioni traumatiche da agenti chimici (24-28).

Il nostro studio dimostra infatti che la somministrazione topica di molecole naturali ad azione antiinfiammatoria ed antiossidante quali il Verbascoside determina una risposta al danno significativamente migliore.

Siamo infatti riusciti a dimostrare che una preparazione farmaceutica (collirio) a base di Verbascoside accelera il processo di guarigione riducendo rapidamente l'infiammazione locale e l'edema perilesionale.

Tale azione antiinfiammatoria viene amplificata se l'animale al quale è stato indotto il danno è stato pretrattato con una dieta nella quale erano state aggiunte concentrazioni crescenti di Verbascoside.

Il collagene è una proteina fibrosa che costituisce la matrice extracellulare dei tessuti umani tra i quali pelle, tendini e ossa e che rappresenta circa il 25% delle proteine totali del corpo.

Il collagene svolge una funzione importante nel processo biologico della cicatrizzazione fungendo da driver dei processi di riparazione tessutale. La sua azione meccanica fornisce un supporto strutturale, contribuendo a:

- fornire una struttura portante (scaffold) per il recupero della perdita di sostanza
- controllare la differenziazione, la migrazione e la sintesi di numerose proteine delle cellule
- favorire la formazione fisiologica dei fibroblasti, del tessuto di granulazione e del collagene nativo
- facilitare il contatto di piastrine e fattori della coagulazione (emostasi)
- favorire la neoformazione di capillari (angiogenesi).

La struttura microscopica della cornea è costituita in larghissima parte da fibre collagene pertanto valutare il turnover di questa proteina rappresenta un buon parametro per verificare se e quanto gli integratori alimentari come il Verbascoside intervengano in maniera diretta o indiretta sui processi rigenerativi a carico di questa tonaca dell'occhio. (1-2)

I nostri risultati mostrano con chiara evidenza che la somministrazione topica di Verbascoside contenuto all'interno di una specifica forma farmaceutica (collirio) determina un incremento della sintesi di collagene.

L'osservazione dei campioni dimostra in particolare come venga incrementato il collagene di nuova sintesi dimostrando un chiaro effetto di incremento della capacità rigenerativa del tessuto.

È inoltre evidente come la somministrazione nella dieta di concentrazioni crescenti di Verbascoside determini un potenziamento della capacità rigenerativa indotta da questo integratore naturale.

L'unico parametro sul quale la somministrazione di Verbascoside sembra non avere effetto è l'indice apoptotico.

Dall'analisi dei nostri dati infatti emerge come sia la semplice somministrazione per os del Verbascoside che la combinazione tra somministrazione per os e topica di questo integratore naturale non sortisca nessun effetto sugli indici di apoptosi.

Gli indici apoptotici non mostrano infatti nessuna variazione significativa sia nei campioni di animali che non hanno assolutamente assunto Verbascoside sia nei campioni di animali ai quali l'assunzione dell'integratore è avvenuta esclusivamente per os nella dieta.

Infine nessuna variazione è stata osservata nei campioni di animali ai quali la somministrazione di questo Fenilpropanoide Glicosidico è avvenuta sia per via orale che per via topica.

Questo dato non ci stupisce in quanto è verosimile che la somministrazione di questa sostanza incida esclusivamente sui parametri fenotipici delle cellule e non su quelli genotipici come la morte programmata.

In conclusione i dati di questo studio ancorchè preliminari si dimostrano molto promettenti in quanto la somministrazione di questo integratore per via orale sembra indurre un benefico effetto antiossidante che si riverbera su un potenziamento dei meccanismi di difesa dell'organismo e sui processi di invecchiamento e senescenza tissutali.

Inoltre la somministrazione topica di Verbascoside sembra davvero essere responsabile di un incremento dei processi di rigenerazione cellulare aprendo promettenti scenari sull'utilizzo di tale molecola a scopo terapeutico nelle lesioni oculari.

BIBLIOGRAFIA

1. Frederic H. Martini, Michael J. Timmons, Robert B. Tallitsch, *Anatomia umana*. Edises, 2012.
2. Anastasi, Motta, Balboni, Aa.vv, Netter, *Trattato di Anatomia umana*. Ediermes, 2011.
3. Bonavolontà G. et al. *Patologie del distretto Testa Collo*. Idelson Gnocchi 2013.
4. Davies K.J.A. *Oxidative stress: the paradox of aerobic life*. Biochem. Soc. Symp. 61, 1–31. 1995
5. Denisov E. and Afanas'ev I. *Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology* 2005; CBC Taylor & Francis Group, Boca Raton-London- New York-Singapore.
6. Buzzoni L, Molesini S, Vertuani S, Manfredini S, Nicotra G, Vicentini S. *Ricerca, sviluppo ed attività antiossidante di estratti di Plantago lanceolata titolati in acteoside*. Natural 1 2009, 83, 60-67.
7. Cos P, Rajan P, Vedernikiva I, Calomme M, Pieters L, Vlietinck A.J., Augustus K, Haemers A, Berghe D.V. *In vitro antioxidant profile of phenolic acid derivatives*. Free Rad. Res. 2002; 36: 711-716.

8. Davies K.J.A, Ursini F, *The Oxygen Paradox*. CLEUP University Press, ISBN 88-7178-374-3 , Padova, Italy, 1995.
9. Dixon R.A. and Paiva N.L. *Stress-induced phenylpropanoid metabolism*. *Plant Cell* 1995; 7: 1085- 1097.
10. Korkina L.G, Mikhalchik E, Suprun M, Pastore S, Dal Toso R. *Molecular mechanisms underlying wound healing and anti-inflammatory properties of naturally occurring biotechnologically produced phenylpropanoid glycosides*. *Cell. Mol. Biol.* 2007, 53, 78-83.
11. Korkina L. G. *Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: From plant defense to human health*. *Cellular and Molecular Biology*, 53, 15–25. 2007.
12. Korkina L.G, Mikhal'chik E, Suprun M, Minghetti A, Crespi Perellino N, Boninsegna S, Pressi G. and Dal Toso R. *Phenylpropanoids as a new class of natural chelators and antioxidants Feasibility for dermatology and cosmetology*. 4th world Congress of “Cellular and molecular biology”, 7-12 October, Poitiers, France, 2005:
13. Douglas C.J. *Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees*. *Trends in Plant Science* 1996; 1: 171-178.

14. Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, Dal Toso R, Pressi G, Caminiti R, Cuzzocrea S. *PPAR- α contributes to the anti-Inflammatory activity of verbascoside in a model of inflammatory bowel disease in mice.* PPAR Res. 2010, 2010, 917312.
15. Akbay P, Calis I, Undeger U, Basaran N, Basaran A.A. *In vitro immunomodulatory activity of verbascoside from Nepeta ucrainica.* Phytother. Res. 2002; 16: 593-595.
16. Kostyuka V.A., Potapovich A.I, Suhan T.O., de Luca C, Korkina L.G. *Antioxidant and signal modulation properties of plant polyphenols in controlling vascular inflammation.* Eur. J. Pharmacol. 2011, 658, 248-256.
17. Kurkin V.A. *Phenylpropanoids from medicinal plants: distribution, classification, structural analysis, and biological activity.* Chem Nat Compd. 2003, 39: 123-153.
18. Mazzon E, Esposito E, di Paola R, Riccardi L, Caminiti R, Dal Toso R, Pressi G, Cuzzocrea S. *Effects of verbascoside biotechnologically produced by Syringa vulgaris plant cell cultures in a rodent model of colitis.* Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 2009, 380, 79-94.
19. Minghetti, A., *Una tecnologia innovativa per la produzione di principi attivi da piante. Colture cellulari di origine vegetale.* Natural 1, 2003, 20: 54-57.

20. Ozben, T. *Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants: Pathological and Physiological Significance*. (Nato ASI Series A, Vol. 296.) Plenum Press, New York. 1998.
21. Rice-Evans C, Miller N.J, Paganga G. *Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids*. Free Radic. Biol. Med. 1996, 20, 933-956.
22. Steiling H, Munz B, Werner S. and Brauchle M. *Different types of ROS-scavenging enzymes are expressed during cutaneous wound repair*. Exp. Cell Res. 1999, 247: 484-494.
23. Speranza L, Franceschelli S, Pesce M, Reale M, Menghini L, Vinciguerra I, de Lutiis M.A, Felaco M, Grilli A. *Antiinflammatory effects in THP-1 cells treated with verbascoside*. Phytother. Res. 2010, 24, 1398-1404.
24. Tognolini M, Barocelli E, Ballabeni V, Bruni R, Bianchi A, Chiavarini M and Impicciatore M. *Comparative screening of plant essential oils: phenylpropanoid moiety a basic core for antiplatelet activity*. Life Sci. 2006, 78: 1419-1432.
25. Mosca M, Ambrosone L, Semeraro F, Casamassima D, Vizzarri F, Costagliola C. *Ocular tissues and fluids oxidative stress in hares fed on verbascoside supplement*. Int J Food Sci Nutr. 2014 Mar;65(2):235-40.

26. Pendota SC, Aderogba MA, Ndhlala AR, Van Staden J. *Antimicrobial and acetylcholinesterase inhibitory activities of Buddleja salviifolia (L.) Lam. Leaf extracts and isolated compounds*. J Ethnopharmacol. 2013 Jul 9;148(2):515-20.
27. Kohda H, Tanaka S, Yamaoka Y, Yahara S, Nohara T, Tanimoto T, Tanaka A. *Studies on lens-aldose-reductase inhibitor in medicinal plants. II. Active constituents of Monochasma savatierii Franch. et Maxim.* Chem Pharm Bull (Tokyo). 1989 Nov;37(11):3153-4.