

# The Physiological Medical Letter

Vol. XV

October 2020

N° 3

## VERIFICA DELLA RISPOSTA DI UN NUOVO FARMACO LIPOCLASICO

*Maurizio Ceccarelli, Stefano Ceccarelli*

La riduzione del numero di cellule, nelle adiposità localizzate iperplastiche, richiede l'induzione del processo apoptotico (morte cellulare senza rottura della parete cellulare e, quindi, senza infiammazione).

Avevamo già formulato, alcuni anni fa, un prodotto capace d'indurre apoptosi cellulare mediante la produzione di una quantità, stechiometricamente tarata, di radicali liberi dell'ossigeno (ROS).

Nella fase avanzata della Panniculopatia edemato-fibro-sclerotica (PEFS), abbiamo l'iperplasia adipocitaria, conseguente all'ipertrofia cellulare anossica, indotta dall'edema. In questo stadio, la produzione di citochine (IL6 e TNF), da parte dell'adipocita, che tenta di ridurre il suo volume, colpisce i macrofagi (arrivati per fagocitare le goccioline di trigliceridi trasudate dall'adipocita ipertrofico), inducendo una risposta infiammatoria (produzione di citochine infiammatorie e di ROS da parte del macrofago in fase M1).

Da ciò, incrementare la concentrazione di ROS con il trattamento apoptotico, vorrebbe dire incrementare lo stato infiammatorio. Abbiamo, quindi, cercato una via apoptotica diversa.

Tra i vari antiossidanti che, in eccesso, inducono danno cellulare, abbiamo scelto l'**acido lipoico**.

Acido  $\alpha$ -lipoico (LA), noto anche come acido tioctico, è un composto naturale che funge da cofattore per molti importanti complessi enzimatici mitocondriali. L'acido lipoico partecipa a diversi meccanismi antiossidativi quali la riduzione del glutatione (GSH) e dell'acido ascorbico. La vitamina C ridotta riattiva la vitamina E ossidata riducendola a tocoferolo (vitamina E attiva).

L'acido  $\alpha$ -lipoico (LA) mostra questo effetto protettivo, sul danno cellulare da stress ossidativo, in piccoli dosaggi, mentre, in alti dosaggi, induce l'apoptosi.

Si è scoperto che LA, in alti dosaggi, diminuisce la vitalità cellulare e aumenta la frammentazione del DNA delle cellule attraverso la sovraregolazione della poli-(ADP-ribosio)-polimerasi (PARP1).

La PARP1 ha un ruolo nella riparazione delle rotture del DNA a filamento singolo (ssDNA). Ridurre i livelli di PARP1 intracellulare o inibire l'attività di PARP1 riduce la riparazione delle rotture di ssDNA. In assenza di PARP1, quando si incontrano queste rotture durante la replicazione del DNA, la forcella di replicazione si blocca e si accumulano rotture di DNA a doppio filamento (dsDNA).

La PARP1 agisce come un primo risponditore che rileva i danni al DNA e quindi facilita la scelta del percorso di riparazione, contribuisce all'efficienza di riparazione mediante ADP-ribosilazione degli istoni. Questo porta alla decompattazione della struttura della cromatina, interagendo su più fattori di riparazione del DNA.

La PARP1, inoltre, è implicata nella regolazione di diversi processi di riparazione del DNA, inclusi i percorsi di riparazione per escissione di nucleotidi, giunzione di estremità non omologa, giunzione di estremità mediata da microomologia, riparazione ricombinazionale omologa e riparazione della mancata corrispondenza del DNA.

La sovraregolazione della PARP-1 porta alla morte cellulare per apoptosi, mediante il rilascio dell'effettore di morte AIF (apoptosis inducing factor) dai mitocondri. Gli eventi biochimici che mediano questo crosstalk nucleare-mitocondriale non sono completamente noti.

Sembra che l'iperattivazione del PARP-1 nel nucleo, porti alla formazione di poli (ADP-ribosio) (PAR) in grandi quantità e alla deplezione di NAD<sup>+</sup>.

Il polimero PAR, in eccesso, può spostarsi dal nucleo al citosol dove lega proteine citosoliche e mitocondriali, con permeabilizzazione della membrana mitocondriale e rilascio di AIF. Altri eventi, a valle dell'iperattivazione di PARP-1, includono l'attivazione della calpaina (enzima proteolitico) e la traslocazione di Bax (proteina che forma un eterodimero con BCL2 e funziona come attivatore apoptotico) nei mitocondri.

Questi eventi sembrano essere importanti per il rilascio di AIF: si ipotizza che la calpaina consenta il rilasciamento dell'AIF dai mitocondri attraverso i pori formati da Bax. L'AIF rilasciato migra verso il nucleo dove induce la lisi della cromatina e la morte cellulare.

Il fattore di induzione dell'apoptosi (AIF) è una flavin-adenin-dinucleotide, una ossidoreduttasi dipendente dal NADH che risiede nello spazio intermembrana mitocondriale la cui specifica attività enzimatica rimane sconosciuta. A seguito dell'insulto cellulare descritto, l'AIF subisce proteolisi (calpaina) e si trasloca nel nucleo (attraverso i pori mitocondriali formati da Bax), dove innesca la condensazione della cromatina e la degradazione del DNA su larga scala in modo indipendente dalla caspasi.

L'AIF, inoltre, può promuovere anche il rilascio del citocromo c dai mitocondri e la successiva attivazione delle caspasi. Queste potenziano l'esecuzione del programma apoptotico con morte cellulare.

Quanto esposto motiva la nostra scelta dell'Acido Lipoico quale nuovo sistema apoptotico.

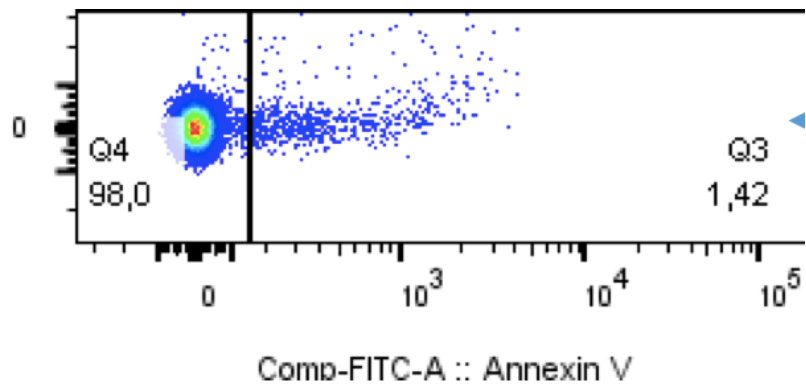
La letteratura (*Sang Yong Choi, Ji Hoon Yu, Hyeyoung Kim, Mechanism of alpha-lipoic acid-induced apoptosis of lung cancer cells, Ann N Y Acad Sci. 2009 Aug; 1171:149-55*) ci ha indicato la concentrazione da utilizzare per indurre apoptosi, senza necrosi.

## **Materiale e metodi**

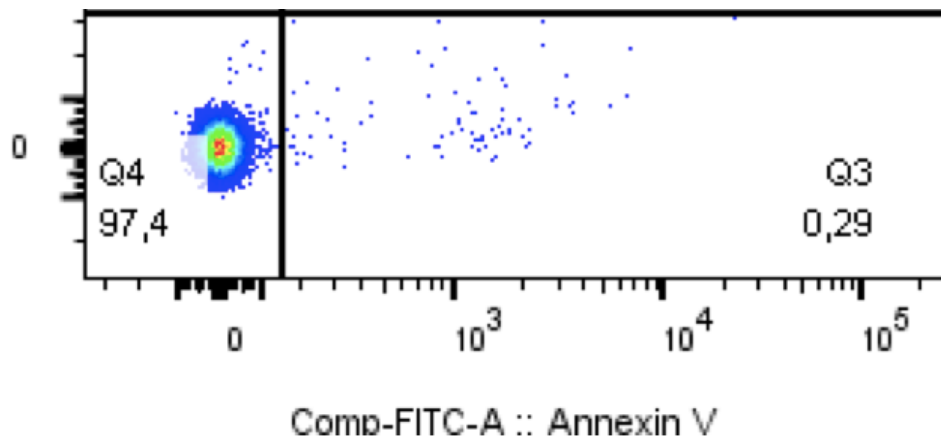
La risposta apoptotica, in assenza di necrosi è stata verificata, mediante citofluorimetria, su due pezzi anatomici provenienti da biopsia del tessuto adiposo addominale in un paziente con un emilato infiltrato con la nuova soluzione apoptotica e l'altro integro.

La risposta (vedi foto in allegato) ha evidenziato presenza di cellule positive all'Annexina V (apoptosi) nel tessuto infiltrato con Acido Lipoico e assenza nel tessuto normale.

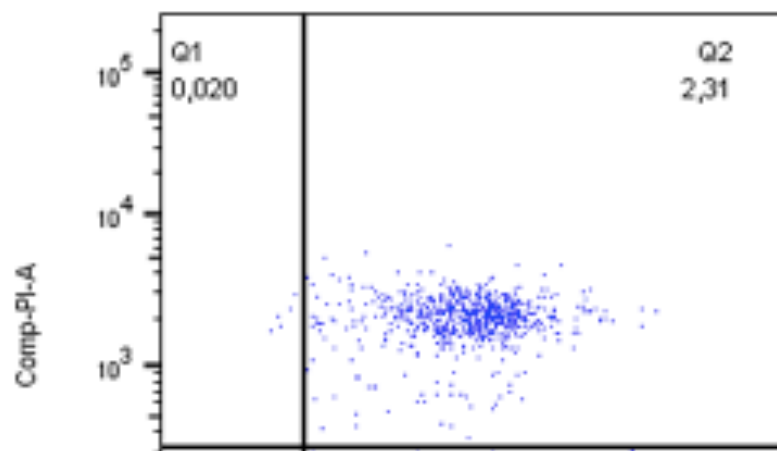
Le cellule positive per lo Ioduro di Propidio (necrosi) erano scarsamente presenti nel tessuto non trattato e, praticamente assenti nel tessuto trattato con Acido Lipoico.



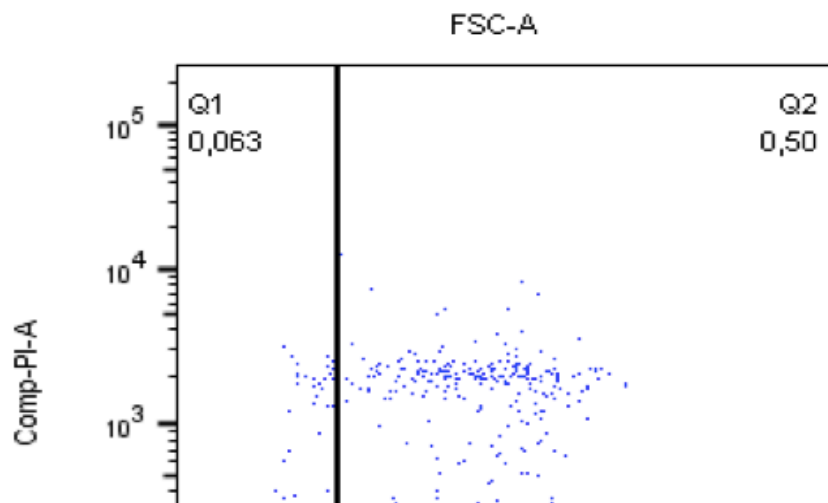
Cellule apoptotiche in tessuto adiposo trattato con Acido Lipico



Cellule apoptotiche in tessuto adiposo non trattato.



Cellule necrotiche in tessuto adiposo non trattato



**Cellule necrotiche in tessuto adiposo trattato**

L'indagine citofluorimetrica supporta i principi scientifici che ci hanno portato alla scelta dell'acido lipoico (in corretta concentrazione) come nuovo agente apoptotico.

Altra interessante particolarità dell'Acido Lipoico riguarda la sua azione sulla coagulazione del sangue. (*Susan A Marsh 1, Jeff S Coombes, Vitamin E and alpha-lipoic acid supplementation increase bleeding tendency via an intrinsic coagulation pathway, Clin Appl Thromb Hemost. 2006 Apr;12(2):169-73.*)

L'integrazione di acido alfa-lipoico induce l'inibizione della via intrinseca della coagulazione. Questo risulta è positivo nella PEFS dove il microcircolo presenta dei rallentamenti che possono portare ad un aumento dell'attività coagulativa del sangue. L'Acido Lipoico con l'inibizione della via intrinseca della coagulazione, mantiene fluido il sangue, anche se rallenta il suo movimento. (Questo, però, può facilitare la formazione di microematomi durante l'iniezione).