

# SCHS SMART CREAM FOR A HEALTHY SKIN

Renzo Toffolo\*, Barbara Dapas\*\*, Mario Grassi\*\*\*, Gabriele Grassi\*\*

\* Farmacia all'Igea sas, Porcia, \*\* Dipartimento di Scienze della Vita Università degli studi di Trieste, \*\*\* Dipartimento Ingegneria Università degli studi di Trieste

## Introduzione

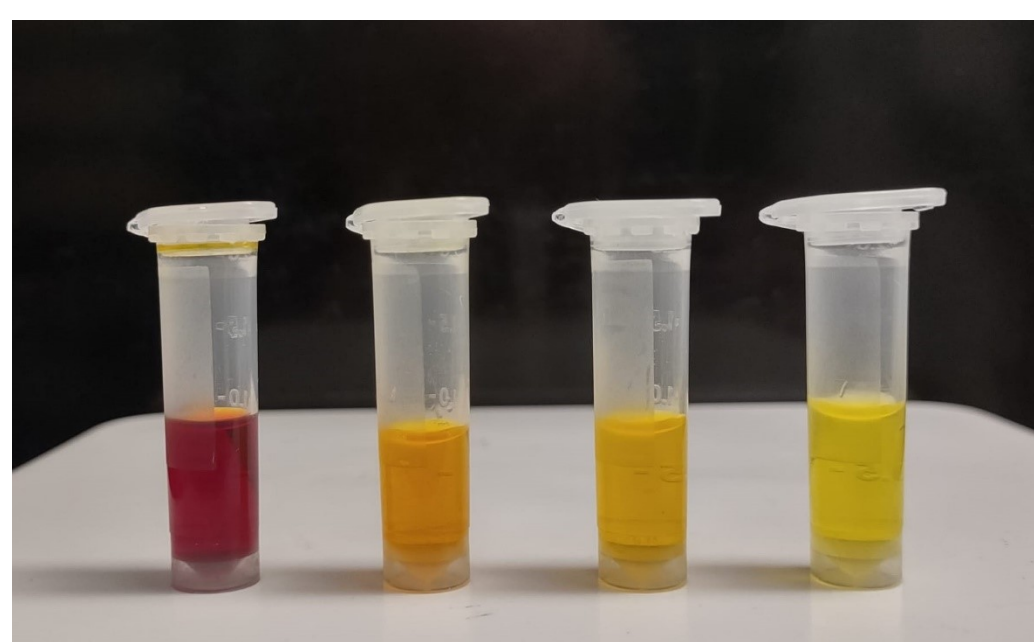
I tumori cutanei sono la forma di cancro più diffusa nel mondo e rappresentano un problema di salute pubblica perché sono in continua crescita. Le forme più comuni di tumori cutanei sono epitelomi (90-95%), melanomi (5%) seguiti da neoplasie rare della pelle (1%). Gli epitelomi sono tumori non melanocitici, più frequenti e meno aggressivi del melanoma che si originano dai cheratinociti e sono distinti in carcinoma delle cellule basali (o basalioma) e carcinoma spinocellulare (detto anche spinalioma o carcinoma squamocellulare). Abbiamo poi il melanoma, tumore che si origina dai melanociti, meno frequente ma più aggressivo dei primi due (Goyal et al., 2020). Dal punto di vista terapeutico i tumori non melanomi vengono trattati, nella maggior parte dei casi, con rimozione chirurgica (Ho e Argaez, 2019). Il melanoma necessita di valutazioni approfondite per il grado di invasività e molto spesso la rimozione chirurgica deve essere accompagnata da eventuali terapie farmacologiche. In particolare, sono a disposizione varie terapie: a bersaglio molecolare, immunoterapia (Malas et al., 2014) e chemioterapia. Spesso però generano resistenza e nel tempo perdono di efficacia. Il presente lavoro ha l'obiettivo di studiare i meccanismi fenotipici e molecolari di alcuni composti nutraceutici (epigallo catechina gallato e curcumina) per i quali il gruppo di lavoro ha evidenze aneddotiche di attività antitumorale in vivo dopo applicazione cutanea.

## Obiettivi

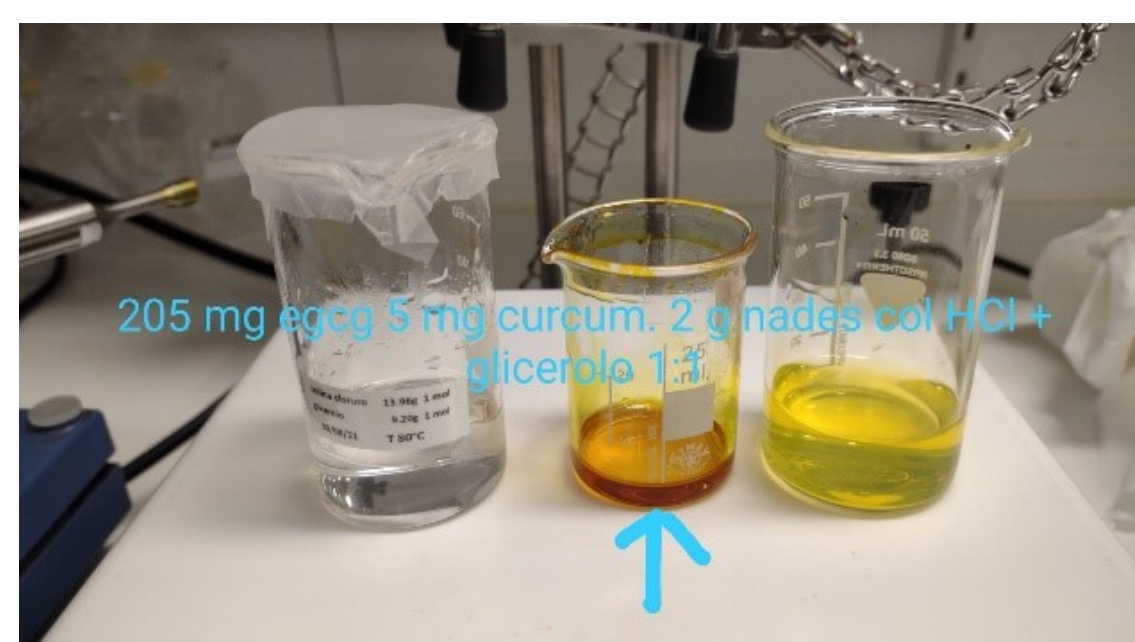
- 1) Indagare i meccanismi molecolari dell'attività «antitumorale aneddotica» di una formulazione galenica dimostrandola almeno in vitro.
- 2) Estendere lo screening ad altre molecole «nutraceutiche» riconosciute come sicure dal punto di vista tossicologico che in letteratura abbiano dimostrato una potenziale attività antineoplastica.
- 3) Ottimizzazione delle caratteristiche chimico-fisiche degli attivi selezionati e validati, per ottenere attivi ottimizzati (multicomposti a migliorata solubilità), con analisi della solubilità e rilascio.
- 4) Elaborare un algoritmo matematico per il confronto degli effetti dei diversi attivi, in forma nativa ed ottimizzata.
- 5) Studiare le componenti della matrice veicolante per incorporare gli attivi ottimizzati.

## Studi di solubilità

Uno dei problemi noti della curcumina è la sua scarsa solubilità in acqua, quindi nel nostro studio mi sono focalizzato sulle tecniche di cosolubilizzazione, scoprendo in letteratura alcuni importanti spunti come l'attività di cosolubilizzazione dell'epigallo catechina gallato nei confronti della curcumina stessa, o l'ottima solubilità della curcumina nel polisorbato 20 (concentrazioni ottenibili fino al 17% in peso). La soluzione Polisorbato 20 curcumina è liberamente diluibile in acqua. Altri solubilizzanti invece, come il polisorbato 80 o il PEG 400 quando diluiamo la soluzione in acqua, tendono a far riprecipitare la curcumina. Alla luce delle recenti ricerche sui NADES (natural deep eutectic solvents) visto l'ottimo potere solubilizzante del Nades colina cloruro - glicerolo (rapporto molare 1:1) nei confronti della curcumina stessa, sto cercando un buon punto di partenza per ottenere emulsioni stabili con la medesima.



Partendo da sinistra: polisorbato 20 + curcumina 17% m/m, composto precedente diluito 1:10 e così via. La soluzione resta limpida alle differenti diluizioni in acqua

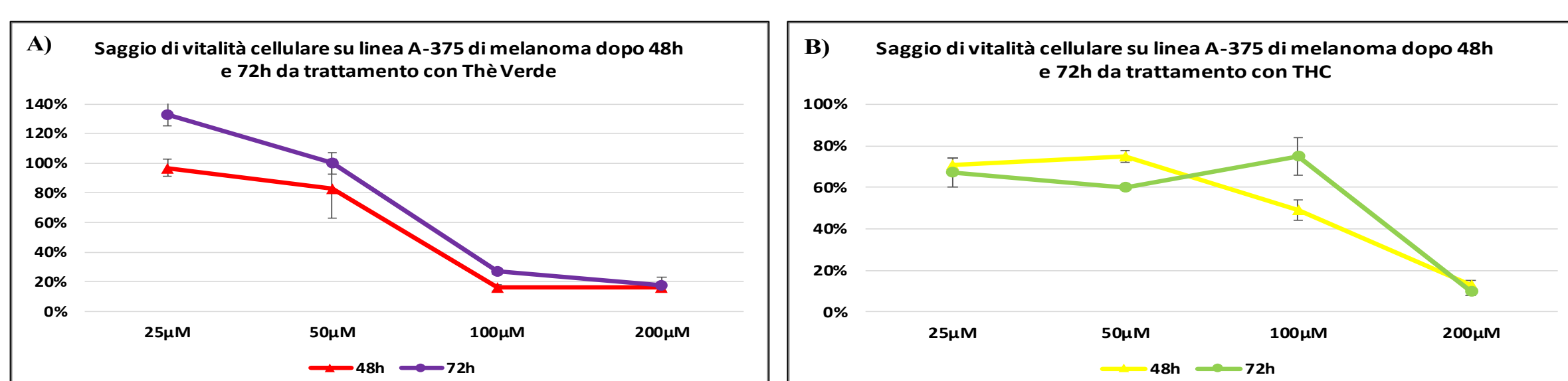


Partendo da sinistra: NADES partenza colina cloruro glicerolo (1:1 molare), soluzione 2 (205 mg EGCG 5 mg curcumina 2 g NADES partenza), soluzione 2 diluita in acqua (limpida)

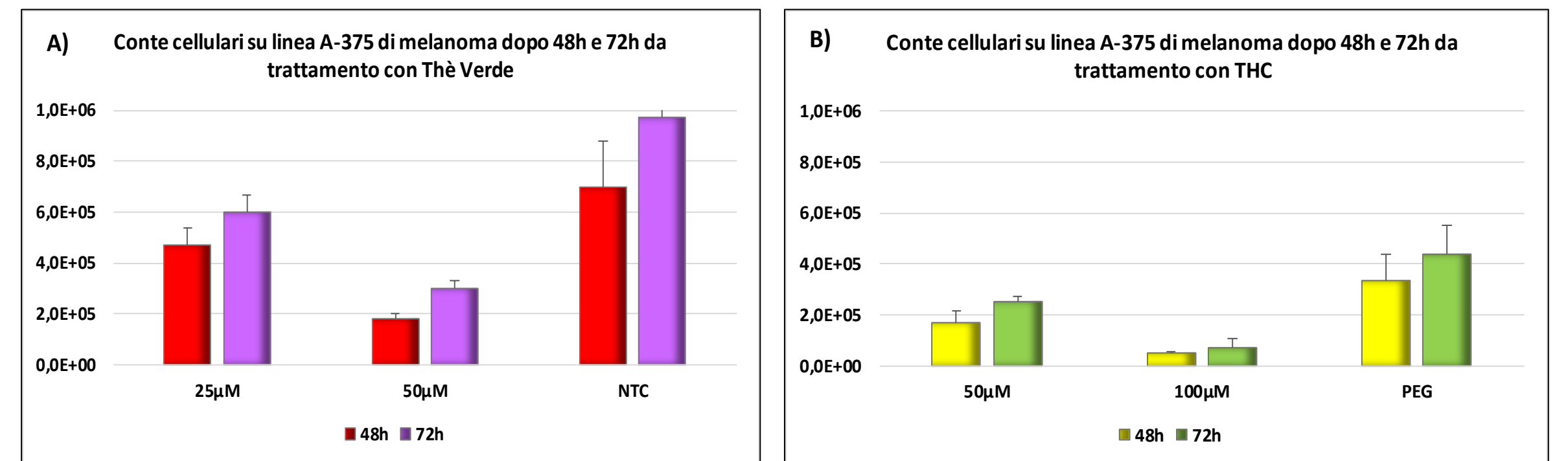
L'utilizzo della tetraidrocurcumina nei test e nelle formulazioni ha invece come razionale la miglior compliance del paziente in quanto non colorante (la curcumina colora in modo vistoso la pelle di giallo). Parimenti la solubilità in ambiente acquoso della tetraidrocurcumina, per quanto meno studiata rispetto alla curcumina, è meno problematica.

## Prove in vitro

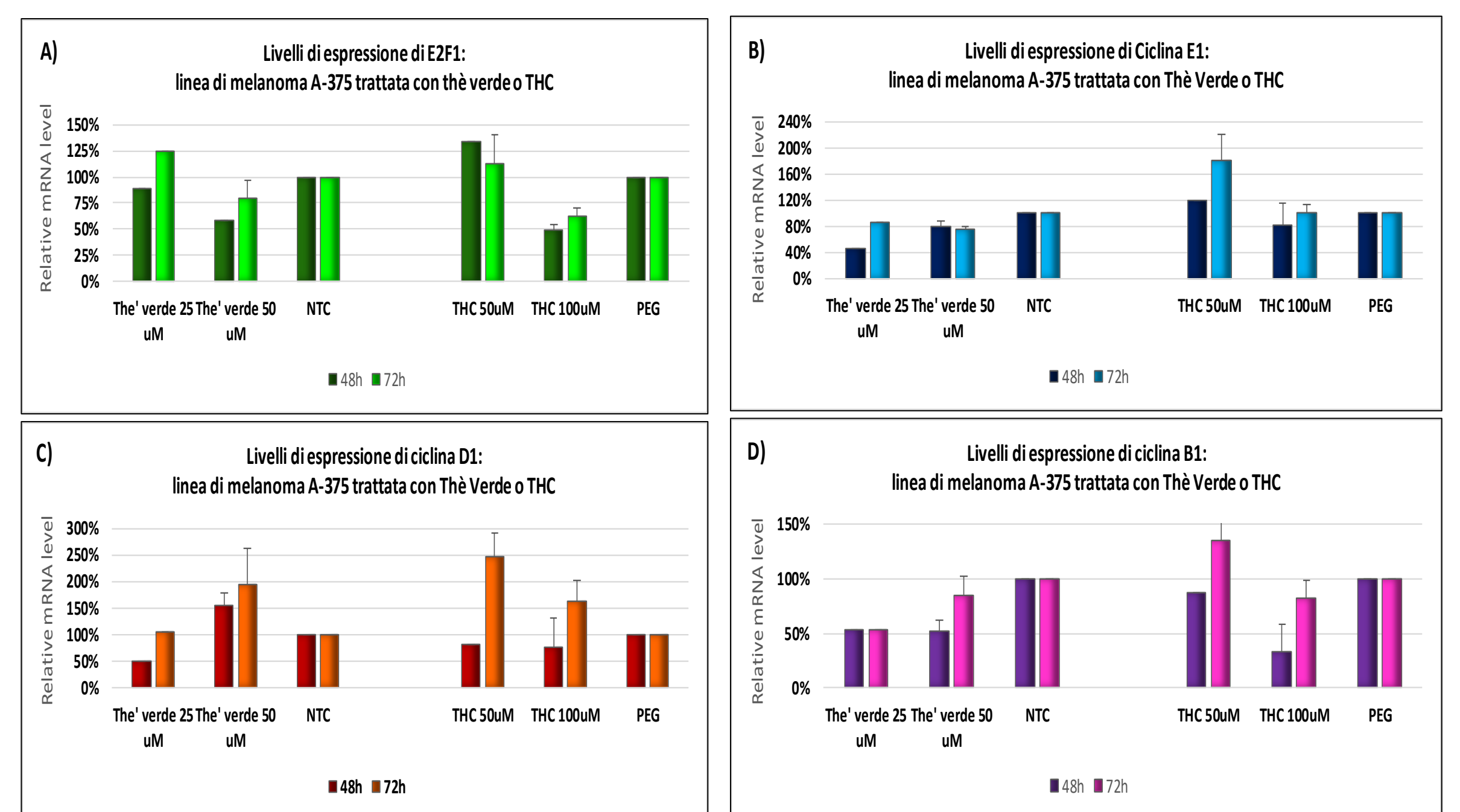
Di seguito i risultati dei test in vitro effettuati presso il dipartimento di Biologia Molecolare dell'università di Trieste



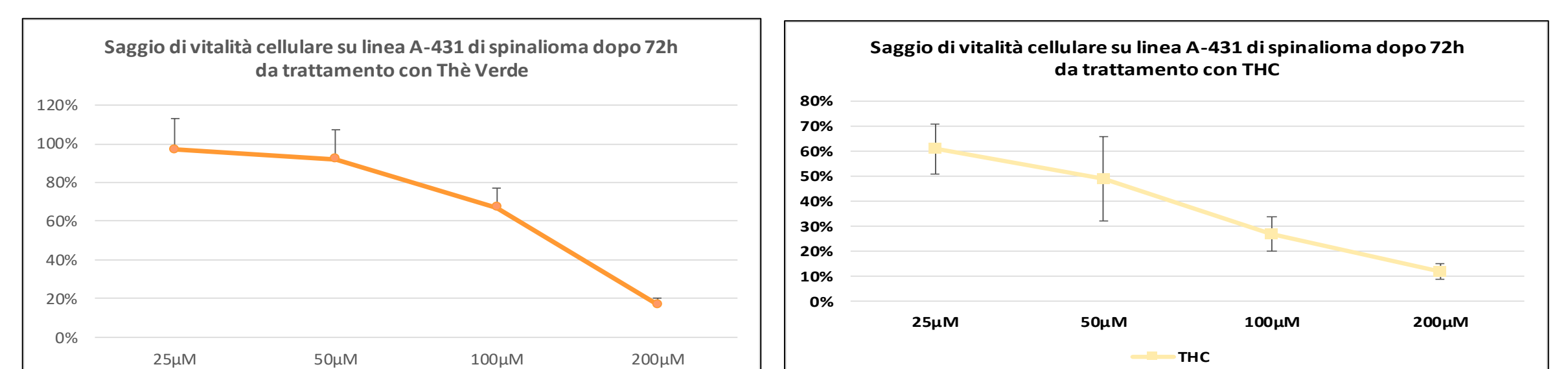
**Fig.1 Dose risposta dopo trattamento con A) Thè verde (65%EGCG) o B) con THC nella linea di melanoma A-375.** In piastre da 96 pozzetti sono state seminate  $2 \times 10^3$  cellule/well. Dopo 24 ore dalla semina, sono stati somministrati i composti alle dosi riportate. La percentuale di cellule vitali è stata valutata a 48 ore o 72 ore dal trattamento mediante il saggio di incorporazione dell'MTT, come descritto nel paragrafo 3.4 del capitolo Materiali e Metodi. I valori ottenuti, relativi al trattamento con il Thè verde e con il THC, sono stati normalizzati rispettivamente al valore delle cellule non trattate (NTC) o trattate con il solo PEG 400 e sono stati riportati come la media  $\pm$  SEM N=4 misurazioni (\* $p < 0,05$ ).



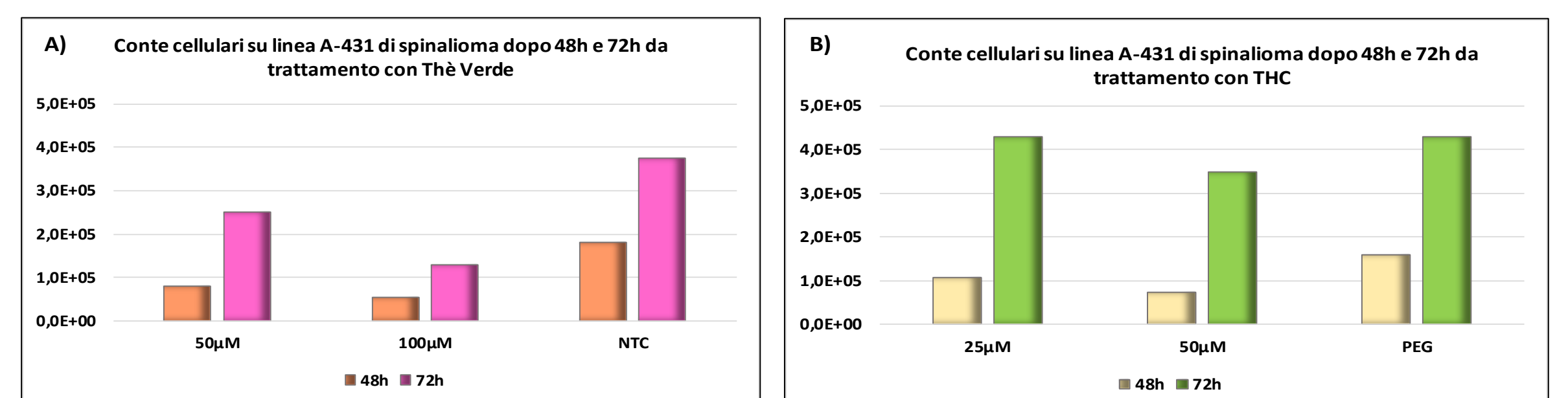
**Fig. 3 Conte cellulari effettuate su colture di melanoma A-375.** Le cellule sono state seminate alla densità di  $7 \times 10^4$ /well in piastre da 6 pozzetti. Il giorno successivo alla semina sono state trattate con le dosi riportate di Thè verde (A) o THC (B) A 48 ore o a 72 ore dalla somministrazione dei composti, le cellule sono state raccolte e contaminate per verificare l'effetto del composto sulla coltura cellulare. I valori di conta ottenuti sono stati normalizzati rispetto ai valori di conta delle cellule non trattate (NTC) e sono stati riportati come media  $\pm$  SEM N= 4 (\* $p < 0,05$ ).



**Fig. 5 Grafico relativo all'analisi di espressione genica mediante Real-Time PCR di alcuni importanti geni coinvolti nel ciclo cellulare:** A) E2F1; B) Cyclina E1; C) Cyclina D1; D) Cyclina B1, in campioni della linea cellulare di melanoma A-375 trattati con Thè verde o con THC. La quantità relativa degli mRNA dei geni target è stata normalizzata rispetto all'RNA ribosomiale 28S. I valori ottenuti sono la media  $\pm$  SEM (N=5), ( $^{\#}p < 0,05$ ; \* $p < 0,001$  rispetto a NT per Thè verde o PEG per THC)



**Fig.2 Dose risposta dopo trattamento della linea di spinalioma A-431 con THC o Thè Verde.** In piastre da 96 pozzetti sono state seminate  $2 \times 10^3$  cellule/well. Dopo 24 ore dalla semina, sono stati somministrati il THC disciolto in PEG 400 ed il Thè Verde disciolto in H<sub>2</sub>O sterile, alle dosi riportate. La percentuale di cellule vitali è stata valutata 72 ore dopo la somministrazione dei composti mediante il saggio di incorporazione dell'MTT. I valori relativi al trattamento con il THC, sono stati normalizzati rispetto al valore delle cellule trattate con il PEG 400; i valori relativi al trattamento con Thè Verde sono stati normalizzati rispetto al valore delle cellule non trattate (NTC). I valori ottenuti sono stati riportati come la media  $\pm$  SEM, N= 12 misurazioni, (\* $p < 0,04$ ).



**Fig. 4 Conte cellulari effettuate su colture cellulari di spinalioma A-431.** Le cellule sono state seminate alla densità di  $7 \times 10^4$ /well in piastre da 6 pozzetti. Il giorno successivo alla semina sono state trattate con Thè verde(A) o THC (B) alle concentrazioni riportate in figura. A 48 ore e 72 ore dal trattamento le cellule sono state raccolte e contaminate per verificare l'effetto dei composti sulle colture cellulari. I valori di conta ottenuti sono stati normalizzati rispetto ai valori di conta delle cellule non trattate (NTC) per il Thè verde o trattate con il solo PEG 400 per il THC (N=2).

**Conclusioni.** I dati fino a qui ottenuti indicano come i due composti nutraceutici considerati siano in grado di ridurre in modo dose e tempo dipendente la vitalità cellulare delle linee tumorali umane di melanoma A-375 e spinalioma A-431. I dati ottenuti indicano come una riduzione della proliferazione cellulare possa essere alla base del calo della vitalità. Il calo di proliferazione è infatti in linea con la riduzione del numero delle cellule. In oltre, il vario grado di riduzione dell'espressione di importanti regolatori del ciclo cellulare come E2F1 e le cicline D1, E1 e B1 confermano tale ipotesi.

Si prevede alla luce dei test in vitro effettuati di testare l'eventuale attività sinergica delle abbinate curcumina EGCG, tetraidrocurcumina EGCG, EGCG NAC, e di un ulteriore promettente sostanza l'acido caffeico fenil etil estere