

## Effetto protettivo di timolo ed estratto di *thymus vulgaris* L. nei confronti del danno indotto da raggi UVB in un modello ex vivo di cute umana

R. Calò<sup>1</sup>, L. Cornaghi<sup>2</sup>, F. Arnaboldi<sup>2</sup>, W.F. Baruffaldi Preis<sup>3</sup>, E. Donetti<sup>2</sup>, L. Marabini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Laboratorio di Tossicologia, Università degli Studi di Milano, Milano

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Laboratorio di Morfologia Strutturale ed Ultrastrutturale, Università degli Studi di Milano, Milano

<sup>3</sup>IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi, Milano

La capacità di penetrazione degli UV aumenta al diminuire della loro lunghezza d'onda: gli UVA penetrano fino al derma, mentre gli UVB sono assorbiti quasi esclusivamente dagli strati epidermici basali. UVA ed UVB interagiscono e danneggiano le macromolecole biologiche, in particolare il DNA, in maniera diversa: i primi indirettamente, causando un incremento intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che a loro volta interagiscono con basi azotate del DNA, ossidandole; i secondi, invece, sono direttamente assorbiti dal DNA in corrispondenza di specifiche sequenze caratterizzate dalla presenza di due pirimidine adiacenti, tra le quali inducono la formazione di legami covalenti, determinando la produzione di dimeri di pirimidine (CPDs) e 6-4 fotoprodotto (6-4PPs). Negli ultimi anni è aumentato l'interesse nei confronti di sostanze appartenenti al mondo vegetale, note per le loro molteplici proprietà biologiche. Particolare attenzione è rivolta a sostanze

ricche di polifenoli, ben conosciuti per le loro attività antiossidanti, antimicrobiche, antinfiammatorie. L'obiettivo di questo studio è stato la valutazione dell'attività di un estratto secco di *Thymus Vulgaris* L. e del suo principale componente Timolo a protezione del danno indotto da UVB. La capacità protettiva di questi due composti è stata valutata in un modello ex vivo di cute umana, ottenuta da interventi di chirurgia estetica (donne non fumatrici, 20-40 anni, sane, n=7) a seguito di consenso informato. I campioni sono stati irradiati con dosi di UVB comprese nel range 0.24-0.72 J/cm<sup>2</sup>. Al fine di riprodurre la sperimentazione in campioni biotici il più possibile omogenei tra di loro, sono state scelte delle donne con fototipi cutanei II o III, considerati anche i più comuni in Europa. I frammenti biotici sono stati mantenuti in coltura in sistemi Transwell con la superficie epidermica rivolta verso l'alto e il derma immerso nel mezzo di coltura. Alcuni campioni sono stati pretrattati per un'ora con *Thymus Vulgaris* L. (1,82 µg/mL, contenente 1 µg/mL di Timolo) o Timolo (1 µg/mL) in terreno senza siero e successivamente irradiato con UVB. I

campioni controllo sono stati pretrattati con le sostanze in esame per lo stesso tempo, ma non irradiati. Tutti i test sono stati eseguiti 24 ore dopo la fine dell'esposizione ad UVB. La proliferazione cellulare degli strati epidermici è stata valutata mediante l'immunofluorescenza indiretta; l'aspetto genotossico mediante comet test alcalino (rileva rotture a singolo, doppio filamento del DNA e siti labili agli alcali), immunomarcatura dell'istone H2AX fosforilato (γH2AX, evidenzia solo rotture al doppio filamento del DNA), test del micronucleo (identifica danni al cromosoma o al fuso mitotico). Il processo apoptotico è stato quantificato attraverso il test specifico dell'Annexina V. I test di genotossicità (comet e micronucleo) e apoptosi sono stati condotti su cellule estratte dallo strato epidermico. I risultati ottenuti hanno evidenziato l'effetto protettivo dell'estratto di *Thymus Vulgaris* L. e Timolo in ogni ambito testato. Il pretrattamento dei campioni biotici a Timolo prima dell'irradiazione con UVB è risultata più efficace nella protezione del danno. In conclusione, i dati ottenuti indicano che la frazione fenolica presente nei composti testati possa essere utilizzata in sostanze fotoprotettive per prevenire il danno causato da UVB.