

Puntare alle cellule zombie per potenziare il “matrisoma e l'emozionalità”

Un concetto senolitico supportato dalle potenzialità dei microrganismi



di Edith Filaire

Greentech, Saint Beauzire, France;
University Clermont Auvergne
(Human Nutrition Unity), ECREIN Team,
Clermont-Ferrand, France
greentech@greentech.fr



di Jean Yves Berthon

Greentech, Saint Beauzire, France
jeanyvesberthon@greentech.fr

Introduzione

Le previsioni demografiche per il 2020 indicavano che per la prima volta nella storia dell'umanità si sarebbe verificato un fenomeno demografico unico nel suo genere: il numero delle persone di 65 anni e oltre avrebbe superato quello dei bambini di età inferiore ai 5 anni, e l'andamento di crescita di queste due fasce d'età sarebbe andato in direzione opposta (1). La generazione d'argento dovrebbe aumentare drasticamente nei prossimi decenni in tutto il mondo. Secondo le proiezioni, 1,5 miliardi di persone nel 2050 avrà almeno 65 anni, con una crescita del +120%. Ciò significa che 1 persona su 6 avrà oltre 65 anni entro il 2050, rispetto al rapporto di 1 su 11 nel 2019. Le donne di 65 anni e oltre hanno rappresentato il 9,5% della popolazione femminile mondiale nel 2015, e la percentuale dovrebbe aumentare al 13,4% entro il 2030 e al 18,5% entro il 2050 (1). Tradizionalmente, le organizzazioni mondiali e la maggior parte dei ricercatori hanno utilizzato indicatori che si basano sull'età cronologica delle persone. Ma l'invecchiamento è più di una semplice somma di anni di vita: riguarda anche l'età percepita e quindi la psicologia. “Buon invecchiamento”/“invecchiare bene”, “invecchiamento felice”: questi termini sono tutti legati a un nuovo concetto dermocosmetico chiamato “invecchiamento positivo” che è cresciuto negli ultimi 10 anni. A differenza dell'approccio *anti-age* che si

concentra solo sulla riduzione degli svantaggi visibili dell'invecchiamento cutaneo (rughe, rilassamento cutaneo, ecc.), l'invecchiamento positivo si concentra sulle strategie per invecchiare meglio e in modo più sano, e sull'accettazione della propria età. Significa trascendere da quelli che sono i segni visibili dell'invecchiamento della pelle per un approccio positivo per quanto riguarda l'età. Si raggiunge così la dimensione psicologica che richiede un approccio sistemico di accettazione del soggetto nella sua globalità che va oltre le condizioni della pelle. Come diceva Rumi (poeta persiano), “Io non sono questi capelli, non sono questa pelle, sono l'anima che vive dentro di me”. L'approccio sistemico è possibile attraverso il concetto psicobiologico che postula l'esistenza di un legame tra emozioni e risposte biologiche. Sebbene la condizione di benessere sia una percezione soggettiva e un concetto che ha attualmente conquistato l'interesse dell'industria cosmetica, tuttavia risulta difficile dimostrare che un prodotto cosmetico porti benefici reali, migliorando in modo percepibile il benessere del consumatore. Con questo studio si è voluto verificare se l'applicazione del fermentato di *Sphingomonas* sulla pelle di donne anziane avrebbe rallentato il meccanismo di senescenza cellulare, apportando nel contempo un effetto positivo sull'umore. Attraverso un approccio psicobiologico è stato valutato *in vivo* l'effetto dell'estratto

fermentato sull'autostima, sull'umore e sulle proprietà biomeccaniche della pelle; inoltre è stato determinato *ex vivo* l'effetto sui marcatori di senescenza cutanei.

Materiali e Metodi

Ceppi batterici e condizioni di coltura

Sphingomonas hydrophobicum è stato isolato da campioni di acqua di un sito situato in Tartras (Aquitania, Francia) e conservato nella collezione dell'azienda Deinove (Montpellier, Francia) che ha partecipato al progetto.

S. hydrophobicum è stato coltivato su terreno Complex Medium Glucose: 10 g L⁻¹ di glucosio, 5 g L⁻¹ di estratto di lievito, 2 g L⁻¹ di bacto-peptone, 5,74 mM K₂HPO₄, 10% v/v di miscela tampone 3-(N-morfolino), acido propansolfonico (MOPS) (400 mM MOPS, 200 mM NH₄Cl, 100 mM NaOH, 100 mM KOH, 2,76 mM Na₂SO₄, 5,28 mM MgCl₂ e 5 mM CaCl₂). La miscela tampone MOPS è stata aggiunta previa sterilizzazione per filtrazione. Il pH iniziale è stato regolato a 7 tramite NH₄OH. Le condizioni di coltura sono state stabilite come segue: temperatura 30°C, pH 7, agitatore rotante a 250 rpm per 21 h. La coltura iniziale di *S. hydrophobicum* è stata utilizzata per inoculare un bioreattore contenente 20 L di terreno di coltura. Le condizioni di coltura sono state le seguenti: temperatura 30°C, pH 7, velocità dell'agitatore da 300 a 900 rpm e aerazione tra 0,25 e 1 vvm. Si è eseguita una fermentazione di 48 h per ottenere la massima resa di biomassa utilizzando un inoculo pari al 5% v/v. Dopo 48 h la coltura è stata centrifugata per recuperare le cellule batteriche e concentrata sino a circa il 15% (m/m) di massa secca. Quindi la biomassa è stata miscelata con etanolo al 96% in un rapporto di 10:1 (etanolo: biomassa (m/m)), riscaldata a 60°C per 30 min

e poi incubata a temperatura ambiente per ulteriori 30 min. L'estratto ottenuto è stato filtrato su carta da filtro, miscelato con propandiolio e posto in evaporatore rotante fino a evaporazione dell'etanolo. Infine l'estratto è stato filtrato con una maglia da 0,2 mm e il filtrato è stato portato al 2% (m/v) di massa secca.

I titoli dei polifenoli, dell'acido malico e lattico, il coenzima Q10 e gli sfingolipidi sono stati utilizzati per la caratterizzazione del prodotto di fermentazione di *Sphingomonas hydrophobicum*.

Test di vitalità delle cellule con MTT

Un modello di pelle invecchiata, corrispondente a un derma umano di 57 anni d'età a tutto spessore (NHDF), è stato trattato con l'estratto batterico a diverse concentrazioni per 42 giorni. Come valutazione preliminare è stata condotta l'analisi citotossica sul monostrato di coltura cellulare per selezionare la più alta concentrazione non-citotossica e quindi evitare qualsiasi effetto cumulativo deleterio per il modello di pelle ricostruita in 3D.

Analisi immunoistologica

Sono state effettuate diverse analisi immunoistologiche per studiare l'elasticità del derma determinando l'espressione delle proteine fibrillina e versicano. Infine la senescenza dei fibroblasti è stata studiata attraverso l'analisi dell'espressione della p16, p21 e della β-galattosidasi.

Studio *in vivo*

Sono stati inclusi 24 soggetti di età compresa tra i 60 e i 70 anni. La durata dello studio è stata di 56 giorni.

I criteri di inclusione erano:

1. soggetto con pelle lassa del viso, con rughe e rughe d'espressione;
2. soggetto con pelle secca del viso (tasso di idratazione cutanea <70A.U.) o delle guance misurata

tramite corneometro (CK Electronic GmbH, Germania).

La valutazione dell'isotropia, misurazioni biomeccaniche e test psicologici sono stati effettuati all'inizio (D0) dello studio e dopo 56 giorni (D56) di trattamento con HEBELYS®, estratto di *Sphingomonas* distribuito da Greentech SA.

Isotropia

Il parametro valutato come isotropia definisce l'orientamento delle linee di rilievo cutaneo. L'orientamento di queste ultime permette di valutare l'effetto di ristrutturazione sulla guancia. Esso è stato misurato utilizzando 3D PRIMOS Lite (Canfield Scientific, Parsippany-Troy Hills, USA) all'inizio dello studio e dopo il 56 giorni di trattamento con estratto di *Sphingomonas*. Questa tecnica consiste nel calcolare un'immagine di fase partendo da immagini ottenute mediante una proiezione delle frange di interferenza (tecnica di profilometria ottica).

Proprietà biomeccaniche della pelle

Le proprietà meccaniche della pelle, elasticità e idratazione sono state valutate utilizzando uno strumento non invasivo mediante suzione (Cutometer MPA 580, Canfield Scientific, Parsippany-Troy Hills, USA). È stata utilizzata una sonda di 2 mm di diametro che ha applicato un'aspirazione costante di 350 mbar in modalità tempo/deformazione (modo 1) di 18 secondi seguita da un tempo di rilassamento di 2 secondi, per due ripetizioni. Le misurazioni sono state effettuate su un unico sito del viso. Il cutometro ha generato un grafico che rappresenta la deformazione immediata o l'estensibilità della pelle (U_e).

Effetto antirughe

Tramite il sistema di imaging VISIA CANFIELD® (Canfield Scientific, Parsippany-

Troy Hills, USA), che permette di scattare foto con diversi tipi di illuminazione, è stato possibile valutare l'effetto antirughe sulle "zampe di gallina" intorno agli occhi.

Parametri psicologici

L'autostima è stata studiata attraverso il test di Rosenberg, che rappresenta uno strumento ampiamente utilizzato per l'autovalutazione (2). Consta di una scala di 10 parametri che misurano l'autostima globale valutando sia le sensazioni positive che quelle negative. I parametri sono valutati utilizzando la scala a 4 punti Likert che va da una valutazione di forte accordo a un forte disaccordo. È apparso che l'autostima aveva un forte rapporto con la felicità (3). La misura ha dimostrato un buon grado di coerenza interna (il coefficiente di affidabilità alfa di Cronbach è stato di 0,85).

Il profilo dell'umore (POMS) è stato determinato nello stesso periodo tramite una scala di valutazione psicologica utilizzata per valutare i diversi stati d'animo transitori (4). La scala misura sei diverse dimensioni di sbalzi d'umore in un dato periodo di tempo. Questi includono tensione o ansia, rabbia, vigore, stanchezza, depressione e confusione. Uno stato d'animo positivo indica una visione positiva della vita (4).

Le situazioni di vita sono state valutate utilizzando una scala analogica visiva (VAS) all'inizio (D0) e fine dell'indagine (D56).

La scala analogica visiva consta di una linea orizzontale di 100 mm di lunghezza avente a entrambe le estremità una parola che descrive uno specifico sentimento (parole chiave). I soggetti sono stati istruiti a contrassegnare, apponendo una crocetta sulla linea di misurazione, la situazione di vita (cattiva o buona) che più precisamente corrispondeva alla loro condizione.

Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state effettuate con il programma SPSS. Tutti i valori sono stati espressi come media ± SD. Il test Mann-Whitney U-test è stato eseguito a causa della distribuzione non gaussiana. Il valore di $p < 0,05$ è stato considerato come statisticamente significativo.

Risultati

Studio ex vivo

Effetto dell'estratto della fermentazione di *Sphingomonas* sulle proteine implicate nel processo di senescenza

Il trattamento sia con acido retinoico (100 nM) che con l'estratto della fermentazione di *Sphingomonas* allo 0,1% ha causato una diminuzione dell'espressione della b-galattosidasi rispetto al controllo non trattato. La diminuzione è stata del 78% rispetto alla condizione non trattata ($p < 0,01$).

Il prodotto ha diminuito l'espressione di p21 nel derma del modello di pelle ricostruita. Questa diminuzione è stata di circa il 58% ($p < 0,001$) rispetto al controllo non trattato. Una significativa diminuzione è stata notata anche nell'espressione di p16. Tale diminuzione è stata del 20% rispetto al controllo non trattato ($p < 0,001$) (Fig.1).

Espressione della fibrillina-1 e versicano, parametri chiave del matrisoma

Il trattamento con l'estratto della fermentazione di *Sphingomonas* ha aumentato significativamente l'espressione della fibrillina-1 nel derma della pelle ricostruita (22%; $p < 0,001$). Questo trattamento ha indotto anche un aumento significativo dell'espressione del versicano (7%; $p < 0,05$) (Fig.2).

Studio in vivo

Dopo 56 giorni di applicazione, l'estratto di *Sphingomonas* ha indotto un miglioramento significativo dell'isotropia (+14%; $p < 0,02$), mentre l'applicazione del placebo ne ha indotto una diminuzione. Inoltre ha mostrato un significativo miglioramento della rugosità media (-9%; $p < 0,05$ vs D0, con un positivo effetto per il 68% dei soggetti) e del "sollevio" medio (relief) (-8%; $p < 0,05$ vs D0, con un effetto positivo per il 64% dei soggetti) (Fig.3).

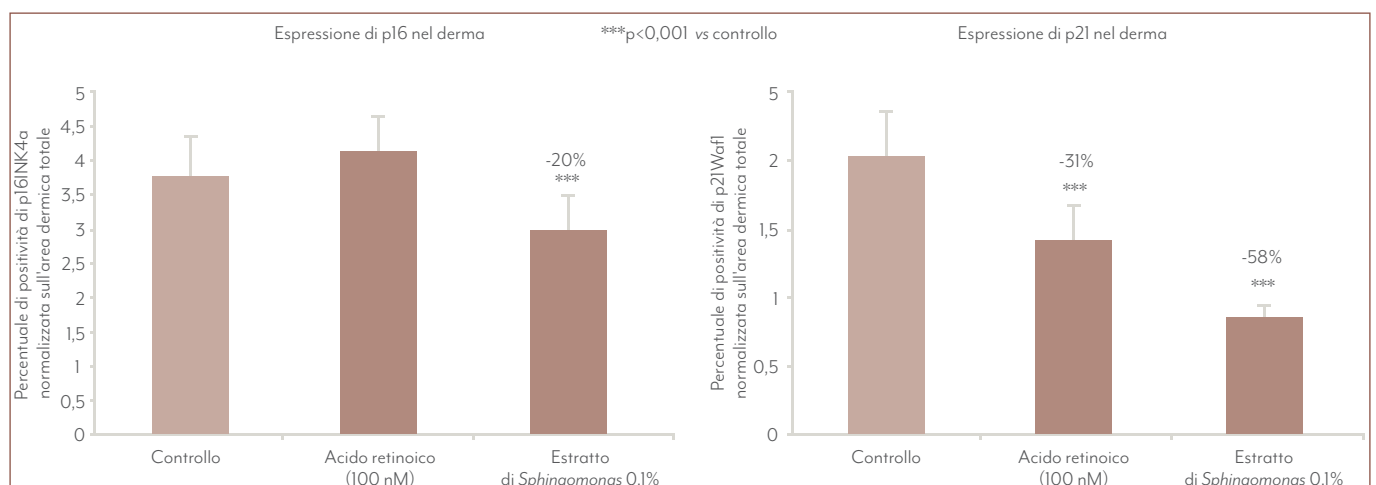


Figura 1 • Quantificazione dell'espressione di p16 e p21 normalizzata sull'area dermica totale. Analisi automatica della colorazione con il software ImageJ

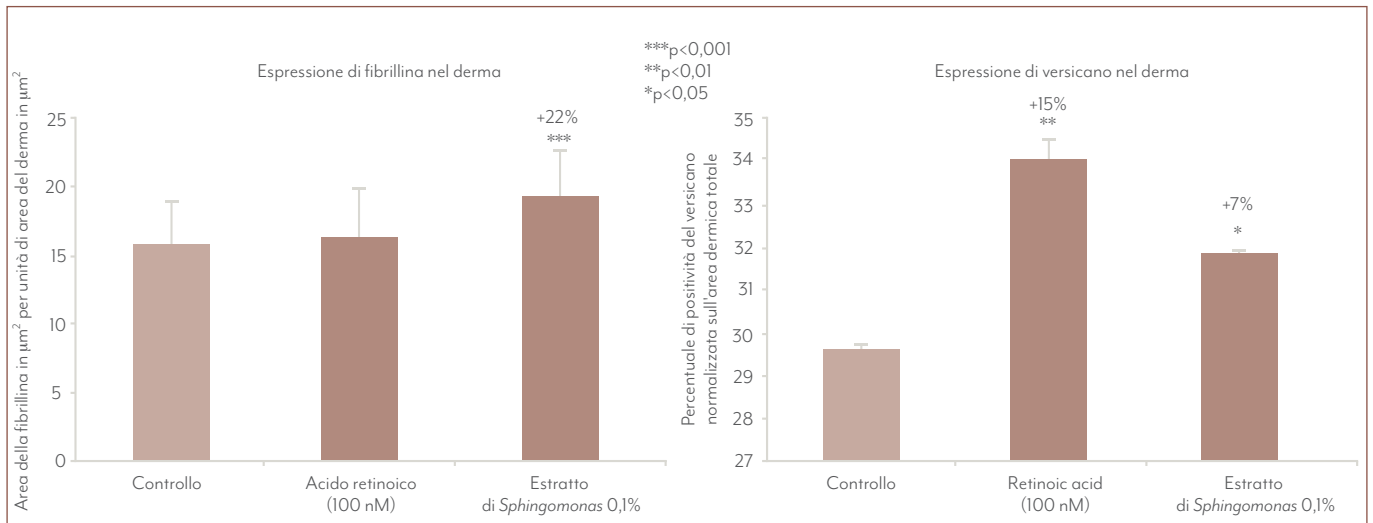


Figura 2 • Effetto dell'estratto della fermentazione di *Sphingomonas* sulla fibrillina e sul versicano nel modello 3D a tutto spessore

Nel 70% dei soggetti è stato osservato un significativo aumento medio del 12% del parametro Ue (riflette l'elasticità valutata utilizzando la deformazione e l'estensibilità della pelle) ($p < 0,001$ vs D0), mentre il placebo ha indotto un aumento non significativo del 4%.

Per quanto riguarda l'aspetto psicologico, c'è stato un aumento significativo dell'autostima e dell'umore da D0 a D56 ($p < 0,001$ e $p < 0,003$ rispettivamente). Nessun cambiamento è stato rilevato nel punteggio VAS tra D0 e D56.

Discussione

A che età possiamo considerarci vecchi? La domanda dovrebbe essere posta diversamente: "Quando iniziamo ad accettare

serenamente noi stessi per come siamo?". La ricerca dell'eterna giovinezza è stata ormai superata a favore della manifestazione della propria età reale. Secondo questo concetto, le donne oltre i 50 anni d'età sono meno interessate a sembrare più giovani ma vogliono sembrare più sane. Questa prospettiva positiva e ottimistica sull'invecchiamento contrasta con il noto fatto che l'autostima è sempre stata legata a un'immagine di bellezza associata alla giovinezza. In accordo con la nuova tendenza dei prodotti cosmetici e di cura della pelle, questo studio ha consentito di valutare se l'applicazione del prodotto per 56 giorni su donne anziane avrebbe rallentato il meccanismo di senescenza cellulare apportando un effetto positivo sull'umore.

I risultati principali hanno dimostrato che questo principio attivo ha tre tipi di azione sulla pelle:

1. un'azione profonda sulla struttura della pelle;
2. un effetto anti-età attraverso l'impatto sui meccanismi di senescenza (cellule zombie);
3. un'azione sulle emozioni migliorando l'umore e l'autostima.

Tutti questi dati dimostrano che una crema per la cura della pelle può migliorare il benessere e gli effetti possono essere quantificati utilizzando test scientificamente convalidati.

Per la prima volta è stato dimostrato l'effetto benefico di un estratto della fermentazione del batterio *Sphingomonas*

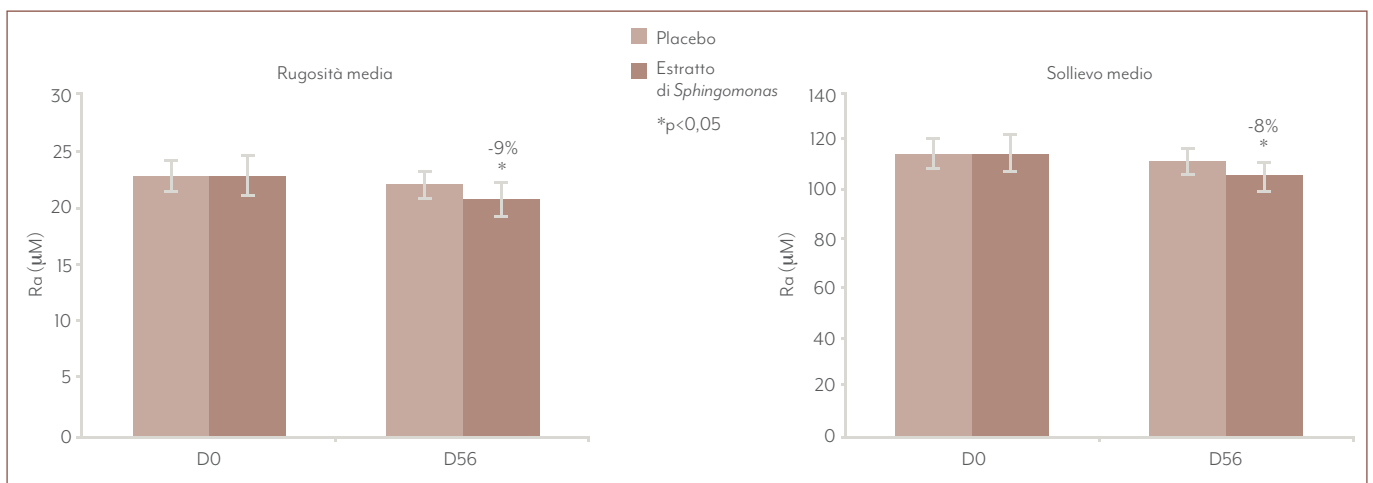


Figura 3 • Misure di rugosità media e di sollievo medio a D0 e D56

hydrophobicum sulla senescenza, indicando il potenziale dei batteri ambientali per le applicazioni per la cura della pelle. Un esempio è *Vitreoscilla fliformis*, uno dei primi batteri isolati dall'acqua termale indicato per la terapia topica di disturbi infiammatori cutanei (5). Più recentemente, *Bacillus methylotrophicus* è stato proposto in un nuovo preparato per prevenire e curare l'acne (6). I nostri risultati dimostrano che l'estratto di *Sphingomonas* attenua la senescenza cellulare sopprimendo la b-galattosidasi e l'espressione degli inibitori del ciclo cellulare (p21 e p16). La proteina p21 è un inibitore della chinasi ciclina-dipendente (CDK); la soppressione dell'attività CDK innesca l'attivazione della proteina del retinoblastoma pRB. La proteina p16, un altro inibitore della CDK, agisce attraverso la via del retinoblastoma, inibendo l'azione delle chinasi ciclina-dipendenti che portano all'arresto del ciclo cellulare in G1. Questi dati supportano gli effetti proliferativi e anti-senescenza dell'estratto di *Sphingomonas*.

L'invecchiamento cutaneo è caratterizzato da un'alterazione del tessuto connettivo sottostante, con conseguenze misurabili sulle proprietà biofisiche globali della pelle e sull'aumento dei cambiamenti dei rilievi della pelle. Infatti, l'orientamento delle fibre cutanee cambia da un orientamento isotropo a uno altamente anisotropo (7). Questa riorganizzazione dei rilievi cutanei durante il processo di invecchiamento potrebbe essere dovuta a una modifica della proprietà meccanica della pelle e in particolare a una modifica delle proprietà meccaniche del derma. I dati dello studio indicano che l'applicazione dell'estratto di *Sphingomonas* per

56 giorni è in grado di ripristinare la flessibilità della pelle e contrastare l'effetto deleterio dell'invecchiamento aumentando significativamente l'orientamento isotropico. Tutto ciò ha migliorato l'aspetto clinico della cute dei volontari e ha definitivamente aumentato la percezione della loro immagine corporea e l'autostima associata. L'apparenza è importante nella nostra società e influenza il modo in cui siamo percepiti dagli altri. La pelle è l'organo più visibile del corpo e determina in larga misura il nostro aspetto. È stato dimostrato che nelle donne i segni del tempo sulla pelle sono percepiti come perdita di femminilità, potere e visibilità sociale. Come suggerito da Baker (8), i cambiamenti fisici tra i 50 e i 60 anni influenzano l'attrattiva fisica e hanno un impatto negativo sull'autostima. Le persone con un'alta autostima affermano di avere relazioni migliori e di fare impressioni migliori sugli altri.

Conclusioni

Recentemente, i probiotici derivanti dalla fermentazione batterica sono emersi come uno degli strumenti cruciali per l'elaborazione di tecnologie cosmetiche per migliorare sia l'assorbimento nella pelle sia le attività farmacologiche. A differenza degli estratti probiotici, poco è stato fatto su altri microrganismi. Questo è il primo studio ad aver individuato che l'estratto di *Sphingomonas* ritarda il processo di invecchiamento cutaneo intrinseco, non solo attenuando la senescenza cellulare attraverso la riduzione dell'espressione di p21 e p16, ma anche agendo sul matrisoma. Tutti questi pro-

cessi, agendo sulle proprietà biomeccaniche della pelle, migliorano anche l'autostima e l'umore. L'approccio psicofisiologico offre indubbiamente nuove opportunità di innovazione per l'industria cosmetica; tuttavia, per sostenere l'approccio olistico alla bellezza, sarà necessario supportare i claim con studi mirati. In sintesi, il prodotto oggetto di studio è in grado di offrire un nuovo concetto positivo di invecchiamento in linea con l'approccio senolitico.

Bibliografia

1. He W, Goodkind D, Kowal P (2016) An aging world: 2015. International Population Reports 95:16-21
2. Rosenberg M (1965) Society and the adolescent self-image. Princeton University Press, Princeton.
3. Erozkhan A, Dogan U, Adigüzel A (2016) Self-efficacy, Self-esteem, and Subjective Happiness of Teacher Candidates at the Pedagogical Formation Certificate Program. J Educ Training Stud 4(8):72-82
4. McNair DM, Lorr M, Droppleman LF (1971) Manual for the Profile of Mood States (POMS). Educational and Industrial Testing Services, San Diego.
5. Volz T, Skabytska Y, Guenova E *et al* (2014) Non-pathogenic bacteria alleviating atopic dermatitis inflammation induce IL-10-producing dendritic cells and regulatory Tr1 cells. J Invest Dermatol 134(1):96-104
6. Choi U-H, Nam ES, Ahmad RI *et al* (2016) *In vitro* evaluation of bioactive potential of *Bacillus methylotrophicus* YML008 against *Propionibacterium acnes*. Pak J Pharm Sci 29(3 Suppl):1081-1085
7. Paillet-Mattei C, Debret R, Vargiolu R *et al* (2013) *In vivo* skin biophysical behaviour and surface topography as a function of ageing. J Mech Behav Biomed Mater 28:474-483
8. Baker L, Gringart E (2009) Body image and self-esteem in older adulthood. Ageing Soc 29(6):977-995