

L'universo della “Matrice Extracellulare”

Rapporti tra Galium-Heel®, plasticità e rigidità del microambiente cellulare

The Extracellular Matrix universe *Connections between Galium-Heel®, plasticity and rigidity of the cell microenvironment*

Alessandro Perra¹, Paolo Acerbis¹, Vincenzo Miranda¹, Diego Cardani¹

¹Dipartimento Scientifico, Guna S.p.a. Milano, Italia

PAROLE CHIAVE

- Matrice Extracellulare
- Stress ossidativo
- Turnover del collagene
- Metalloproteinasi
- Inibitori Tissutali delle Metallo proteinasi
- Medicina di Bioregolazione dei Sistemi
- Galium-Heel®

KEYWORD

- Extracellular Matrix
- Oxidative stress
- Collagen turnover
- Metalloproteinases
- Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
- Bioregulatory Systems Medicine
- Galium-Heel®

RIASSUNTO

Dal momento in cui si è incominciato ad interpretare il tessuto connettivo non più come una struttura inerte con la sola funzione di supporto meccanico ma come una componente vitale e dinamica di ogni tessuto, gli studi sulla Matrice Extracellulare (Extra-Cellular Matrix - ECM) - o microambiente cellulare - si sono fatti via via più numerosi ed approfonditi.

Con l'aumento delle conoscenze sull'ECM stessa, anche il suo ruolo in varie forme patologiche è diventato sempre più chiaro.

Alcune modificazioni della regolazione della biologia dell'ECM sono state individuate come fondamentali nell'*onset* e nella progressione di alcune patologie, in particolare le alterazioni del *turnover* delle componenti fibrillari e la modifica delle caratteristiche meccaniche ed elettrostatiche (responsabili delle proprietà di filtro selettivo) dell'ECM.

Il peculiare ruolo fisiopatologico dell'ECM rende l'ECM stessa un potenziale *target* terapeutico ma, ad oggi, non esiste possibilità di agire sulla sua omeostasi attraverso l'utilizzo di un approccio farmacologico classico. Recentemente, in accordo con i principi dell'*Omotossicologia* e della sua interpretazione più moderna, la *Medicina di Bioregolazione dei Sistemi* (*BrSM*), nuovi strumenti sono stati proposti per intervenire sulla regolazione fisiologica della matrice. Galium-Heel®, medicinale naturale *low dose multicomponent e multitarget*, appare in grado di agire su alcuni aspetti chiave della biologia della matrice, in accordo con quanto descritto dalla letteratura scientifica relativa ai singoli componenti che lo costituiscono. In questa *review* vengono illustrate le basi teoriche di un innovativo approccio farmacologico volto al recupero dell'omeostasi dell'ECM in condizioni patologiche.

ABSTRACT

Since the connective tissue was no longer considered as an inert structure aimed at the mere mechanical support of a tissue but a dynamic and alive component of each tissue, the study of the extracellular matrix (ECM) – or cell microenvironment - has become more and more in-depth.

Therefore, with the increase in knowledge of the ECM itself, its involvement in many diseases has become progressively clear.

The dysregulation of some key aspects of ECM biology have been identified as pivotal for the disease's onset and progression, in particular the turnover alteration of the fibrillary components and the modification of the mechanical and electrostatic characteristics that modulate the ECM's selective barrier effect.

The peculiar pathophysiological role of ECM makes it a potential therapeutic target but, at present, there is no possibility to act on matrix homeostasis through a traditional pharmacological approach. Recently, according to the principles of Homotoxicology and its modern evolution named Bioregulatory Systems Medicine (*BrSM*), new tools have been proposed for the physiological regulation of the matrix. Galium-Heel®, a natural, low dose, multicomponent and multitarget medication that seems to be able to intervene on some key aspects of matrix biology, if literature on its individual ingredients are considered. In this review, the theoretical basis for the development of an innovative approach, aimed at the recovery of ECM homeostasis in pathological situations, are illustrated.

Per gentile concessione di Therapia Georgia (pubblicato su *Therapia Georgia*, Special Edition 2019, pp. 12-19).

1. Introduzione

La domanda “*qual è la più piccola unità vivente?*” ha rappresentato uno dei dilemmi più appassionanti per la biologia del XIX Secolo (1).

La rapida evoluzione della microscopia ottica nel corso del XVII Secolo (degna di nota è la prima descrizione di una cellula vegetale da parte di *Robert Hooke*) e del suo utilizzo sperimentale durante i Secoli XVIII e XIX ha consentito a scienziati quali *Spallanzani* e *Pasteur* di confutare definitivamente la teoria della generazione spontanea della vita e di identificare inequivocabilmente nella cellula l’unità vivente fondamentale.

Nel 1838, il botanico *Matthias Schleiden* introdusse il concetto di cellula come più piccola unità strutturale delle piante e lo zoologo *Theodor Schwan*, nel 1839, formulò la medesima ipotesi in campo animale affermando che “le componenti elementari di tutti i tessuti sono formate da cellule” e che “esiste un unico principio universale alla base delle componenti elementari di ogni tessuto... e questo principio è la formazione delle cellule” (1).

Ciononostante, queste affermazioni non chiariscono il punto cardine delle teorie cellulari: come si originano le cellule?

La teoria della “libera formazione delle cellule” fu l’ultima reminiscenza della sopravvissuta dottrina della “generazione spontanea” e venne definitivamente superata grazie al lavoro di *Robert Remak*, *Albert Kölliker* e *Rudolf Virchow*, padre della Patologia Cellulare; l’afirmazione di *Virchow* “*omnis cellula e cellula*” (ogni cellula deriva da una precedente cellula) è considerato il principio fondante delle teorie moderne sulla formazione dei tessuti (1, 2). Considerati nel loro complesso, gli studi di Schleiden, Schwan e Virchow rappresentano le pietre miliari della Teoria Cellulare.

Rudolf Virchow osservò inoltre che tra le singole cellule cerebrali e spinali era presente un tessuto connettivo e che le cellule erano rintracciabili anche a livello dei tessuti osseo e muscolare. *Virchow* attribuì un ruolo passivo al tessuto connettivo; egli considerò la neuroglia un “collante dei nervi” in accordo con la sua ipotesi che, a livello del Sistema Nervoso dovesse esistere un tessuto connettivo derivato dal mesoderma in cui le cellule nervose stesse dovessero essere immerse. *Virchow* formulò anche una teoria sui meccanismi dell’aterosclerosi secondo la quale le cellule sarebbero in grado di modificare in modo unidirezionale la struttura del connettivo senza essere da esso influenzate; risulta dunque evidente come il tessuto connettivo fosse considerato unicamente un elemento di supporto per le cellule.

Il ruolo biologico del tessuto connettivo, modernamente denominato **Matrice Extracellulare (ECM)** o “**microambiente cellulare**”, è stato trascurato per anni e solo nel periodo successivo alla Seconda Guerra Mondiale si è riacceso l’interesse verso l’ECM, in particolare grazie alle ricerche di *Alfred Pischinger* ed *Hartmut Heine* (3, 4).

Pischinger e *Heine* contribuirono allo sviluppo del concetto di *matrice vivente* superando la vecchia visione dell’ECM

come una struttura di supporto inerte secreta dalle cellule, e integrando l’ECM stessa nel *network* intercellulare.

La teoria cellulare di *Schleiden* e *Schwan* ha aperto la strada per lo studio di tutti gli organismi viventi trattandoli come strutture cellulari complesse organizzate in tessuti, organi e sistemi. La conseguenza di questo approccio è stata la sempre più evidente consapevolezza dell’importanza del *cross-talk* intercellulare come fattore chiave dell’organizzazione e della funzione tissutale.

Nel corpo umano, **circa 40.000 miliardi di cellule** (5) “parlano” tra loro e “l’etere” che ospita le comunicazioni è l’ECM, in accordo con la teoria della matrice vivente. Il *cross-talk* intercellulare all’interno dell’ECM e dall’ECM verso le cellule è esemplificata in modo chiaro dai movimenti di fattori di crescita ed altre molecole segnale, prodotte, immagazzinate e diffuse nella matrice extracellulare in accordo con le specifiche necessità omeostatiche di un tessuto.

L’ECM, in virtù delle sue caratteristiche meccaniche e biologiche, partecipa a questi processi regolando il flusso delle molecole segnale.

La matrice vivente è definita come una struttura molecolare ubiquitaria, composta da tessuto connettivo, citoscheletri cellulari e molecole di ancoraggio tra le fibre della matrice e le strutture citoscheletiche (ad esempio le integrine), la matrice nucleare e gli acidi nucleici (6).

Pischinger ampliò il modello di patologia cellulare proposto da *Virchow* affermando che l’unità più piccola vitale non è la singola cellula, ma è una struttura composita “**capillare sanguigno-matrice-cellula**”, costituenti un’unità morfo-funzionale.

Il lavoro di *Pischinger* e colleghi ha dimostrato che l’ECM non è solo una sostanza di sostegno o un filtro inerte, facente da intercapedine tra il sistema vascolare e le cellule; al contrario, l’ECM è una componente vivente e dinamica di tutti i tessuti continuamente soggetti a rimodellamento strutturale e coinvolti in un gran numero di processi fisiologici e patologici, tra i quali i fenomeni infiammatori.

Il concetto di reciprocità dinamica (RD) si riferisce al continuo *cross-talk* bidirezionale tra le cellule ed il loro microambiente, in particolare la matrice extracellulare (7). Il continuo rimodellamento dell’ECM fa sì che una forza meccanica sia esercitata sulle cellule, contribuendo a modificare i mediatori biochimici vicino alla membrana cellulare ed a modulare le cascate di segnale che regolano l’espressione genica e, in generale, il metabolismo cellulare. Le variazioni fisiologiche del metabolismo delle cellule, a loro volta, influenzano la composizione e l’organizzazione dei componenti dell’ECM.

Queste continue interazioni sono il principio fondamentale alla base della RD, il cui ruolo fondamentale durante lo sviluppo e l’omeostasi dei tessuti è stato ampiamente studiato.

2. Fisiologia e patologia della matrice

Condizioni persistenti di **infiammazione cronica (sistematica) di bassa intensità (LGSCI)** (8) sono correlate ad altera-

zioni della struttura della ECM e, di conseguenza, della sua funzione.

La presenza di questo tipo di alterazioni favorisce la cronizzazione del processo patologico e favorisce la progressione della malattia (9, 10).

Secondo la cronobiologia dell'infiammazione fisiologica, i fenomeni infiammatori acuti dovrebbero essere seguiti dalla fase di *restitutio ad integrum*, caratterizzata da processi di riparazione dei tessuti, innescati da specifiche molecole di segnalazione, che hanno luogo principalmente a livello dell'ECM (11).

La perdita dell'omeostasi della matrice, dovuta alla persistenza di uno stato infiammatorio, induce dapprima un aumento della solubilità dell'ECM e quindi, come meccanismo di compensazione, la deposizione di collagene disorganizzati (Tipi I, III e IV) che portano a **fibrosi** (12). In particolare, il collagene di tipo III è correlato in modo univoco con le proprietà elastiche del tessuto connettivo ed è coinvolto in numerose malattie caratterizzate da fenomeni di fibrosi (13, 14). I cambiamenti delle caratteristiche strutturali dell'ECM compromettono il flusso delle molecole segnale che influenzano i processi di riparazione di un tessuto infiammato e danneggiato, perpetuando così la presenza di *trigger* pro-infiammatori.

Per spezzare questo circolo vizioso, un medicinale naturale low dose *multicomponente* e *multitarget*, Galium-Heel® (Biologische Heilmittel Heel GmbH, Baden-Baden, Germania), può essere utilizzato per mantenere o recuperare la plasticità dell'ECM e contrastare la sua rigidità raggiungendo il doppio obiettivo di ripristinare l'omeostasi dell'ECM e ridurre le conseguenze dell'infiammazione non risolta e il perdurare dello stato di LGCSI che ne deriva.

3. La complessità della matrice extracellulare: componenti e funzioni principali

L'ECM è sintetizzata e depositata principalmente dai fibroblasti o da cellule derivate dai fibroblasti stessi come ad esempio i condrociti (15-17). L'ECM è costruita da due strutture-base: la **membrana basale (MB)** e la **matrice interstiziale (MI)**; la MB è una matrice sottile e specializzata localizzata tra un'epitelio, un endotelio, o mesotelio e la MI. La MI a sua volta è la componente preponderante dell'ECM; essa forma una struttura tridimensionale che circonda le cellule ed ha caratteristiche diverse e specifiche per ciascun tessuto (18). La MB, composta principalmente da laminina e collagene di tipo IV, fornisce il supporto meccanico, separa diversi tipi di cellule e contribuisce alla differenziazione, alla migrazione e alla sopravvivenza delle cellule stesse all'interno del tessuto (19, 20).

La MI presenta una struttura più complessa e contiene prevalentemente proteine e glicosamminoglicani (polisaccaridi caricati negativamente).

L'ECM è composta da tre sottoclassi principali di molecole:

- **Glicosamminoglicani (o mucopolisaccaridi)** e de-

rivati **proteoglicani**: conferiscono un'adeguata resistenza alle forze di compressione.

- **Proteine fibrose** tra le quali **collagene ed elastina**, fondamentali per la trasduzione delle forze tensili.
- **Glicoproteine adesive** (ad esempio laminina e fibronectina).

Glicosamminoglicani (GAGs)

I GAGs sono polisaccaridi lineari composti da due saccandi-base: uno zucchero amminico e un'acido uronico. Questi componenti di base sono variamente modificati enzimaticamente e combinati per conferire ad essi caratteristiche o funzioni specifiche (21).

I GAGs erano tradizionalmente considerati semplici "molecole di riempimento" all'interno dell'ECM. Recentemente i GAGs sono stati rivalutati come molecole segnale attive, che partecipano attivamente a vari processi metabolici cellulari. Queste evidenze rafforzano il concetto di matrice vivente.

Lo Ialuronano è il GAG strutturalmente più semplice; altri GAGs sono il condroitin-solfato (CS), il dermatan-solfato (DS), il keratan-solfato (KS) e l'eparan-solfato (HS), quest'ultimo fondamentale per la gestione delle proprietà elettrostatiche dell'ECM.

Proteoglicani

I proteoglicani sono composti da un nucleo proteico con uno o più GAGs innestati su di esso. Sono conservati in granuli secretori, inseriti nella membrana plasmatica o secreti nell'ECM (22). Un esempio di PG è perlecano (PLC).

Proteine fibrose

Ventotto tipi di collagene (classificati da tipo I a tipo XXVIII collagene) rappresentano il principale componente strutturale dell'ECM con distribuzione tissutale specifica. Il tipo più comune di collagene è quello fibrillare, che rappresenta il 90% del collagene nel corpo; è presente nell'osso, nella pelle, nei tendini, nei legamenti e nei tessuti cartilaginei (23).

L'elastina è la seconda principale proteina fibrosa che conferisce il giusto grado di elasticità all'ECM.

Glicoproteine

Sono note 15 laminine eterotrimeriche composte da diverse catene proteiche. Le laminine sono un componente della MB e contengono eterodimeri tessuto-specifici (24).

La fibronectina è un dimero proteico in grado di legare tra loro il collagene, l'eparina, le integrine di superficie e la fibronectina stessa (22, 23).

All'interno di ogni tessuto, l'ECM, le cellule, e le strutture vascolari, linfatiche e nervose costituiscono un'unità morfo-funzionale, cioè un sistema biologico complesso (sia strutturale che funzionale appunto) in cui tutte le componenti agiscono in modo mutualistico, influenzandosi a vicenda.

L'interazione tra i vari componenti dell'unità morfo-funzionale è resa possibile dalle caratteristiche meccaniche e biologiche dell'ECM e dal microambiente della cellula stessa; essi possono svolgere molte funzioni, tra le quali:

- supporto meccanico tissutale,
- mantenimento dell'integrità strutturale e dell'elasticità del tessuto,
- controllo dell'omeostasi tissutale (attraverso il continuo rimodellamento dell'ECM stessa),
- regolazione di numerose funzioni cellulari (proliferazione, migrazione, differenziazione),
- controllo selettivo del traffico di molecole attraverso un filtro molecolare a doppia azione (sterico ed elettrostatico).

4. L'ECM come barriera/filtro molecolare: una questione di plasticità

La funzione più interessante dell'ECM è probabilmente quella di **barriera/filtro molecolare**. L'ECM può regolare il flusso di molecole di varia origine e dimensione in base alla sua struttura e alle specifiche caratteristiche elettriche (25, 26). La struttura reticolare dell'ECM (*mesh*) è caratterizzata dalla presenza di pori di dimensioni definite entro un certo intervallo, i quali possono bloccare selettivamente le macromolecole di dimensioni incompatibili con quelle dei pori stessi (filtro meccanico o sterico). Questa funzione è importante perché le macromolecole più grandi rintracciabili nell'ECM sono principalmente di origine batterica o virale; il loro sequestro all'interno dell'ECM è un evento chiave per l'attiva-

zione di un'adeguata risposta immunitaria volta al loro confinamento ed eliminazione.

La Membrana Basale è il tipo di matrice in cui la funzione filtro è più sviluppata e studiata per la sua prossimità rispetto alle cellule isolate e alle strutture epiteliali/endoteliali/mesoteliali.

La funzione di **filtro meccanico o sterico** è governata semplicemente dalla dimensione della struttura reticolare costituita dal collage di Tipo IV e dalla laminina che oscilla tra 2 e 3 micrometri. La mobilità di proteine e altre macromolecole è determinata geometricamente dalla dimensione delle maglie.

Il **filtro elettrostatico** è l'altro raffinato strumento atto al controllo del traffico molecolare all'interno dell'ECM, sia in entrata che in uscita dalle cellule. Le caratteristiche di carica elettrica dell'ECM sono conferite dalle catene di eparan-solfato (HS), organizzate nel complesso PLC.

Le molecole elettriche neutre sono libere di fluire passivamente all'interno dell'ECM, guidate dai loro coefficienti di diffusione; le molecole polarizzate sono progressivamente rallentate e sequestrate in accordo con l'intensità della loro carica (25). Pertanto, la diffusione all'interno della ECM di molecole più piccole della dimensione del mesh ed altamente polarizzate è estremamente ridotta se non completamente inibita.

Questo filtraggio elettrostatico è reso possibile dalla presenza di zone elettricamente caricate sulla struttura fibrillare dell'ECM. Il collageno dei mammiferi è una molecola *zwittrionica* con gruppi di residui amminoacidici positivi e negati-

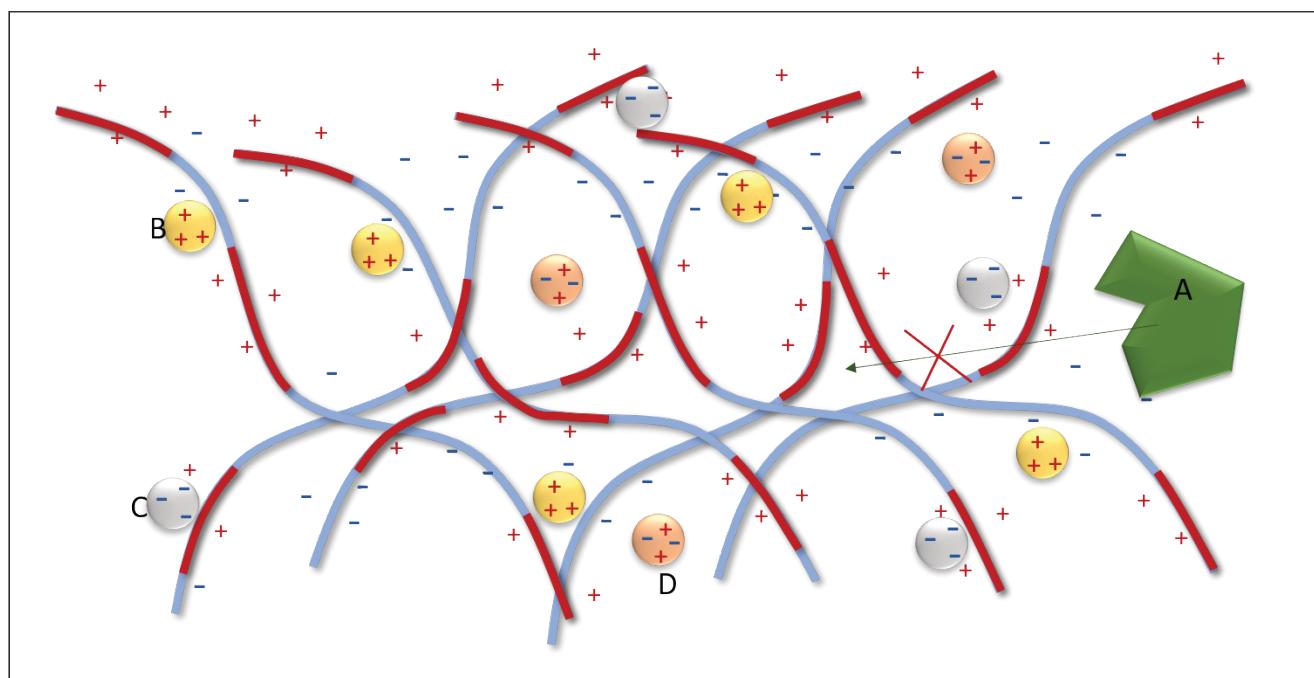


Figura 1 - L'ECM è un efficiente filtro sterico ed elettrostatico. Le molecole più grandi dei pori della matrice (A) non saranno in grado di fluire liberamente. Le molecole caricate positivamente o negativamente (B-C) saranno sequestrate e legate alle zone con carica opposta. Solo le molecole neutre (D) saranno in grado di diffondersi liberamente all'interno dell'ECM.

vi (infatti, a pH fisiologico, questi residui sono neutri, cioè al loro punto isolelettrico) mentre le catene di HS sono caricate negativamente; la successione di zone differentemente caricate nella struttura reticolare della matrice determina l'azione di filtro elettrostatico.

Esperimenti *in vitro* su modelli sintetici di ECM hanno chiarito il ruolo fondamentale delle catene di HS; la distruzione enzimatica delle strutture di eparan-solfato determina la perdita dell'azione del filtro (25). Gli esperimenti *in vivo* hanno confermato questa ipotesi: l'eparina (un glicosammignoglicano solfato) e l'enzima eparanasi possono determinare l'alterazione dell'effetto barriera subendoteliale mediante degradazione dell'HS (25, 27).

La fluttuazione fisiologica dello stato elettrico dell'ECM è fondamentale per distaccare e far fluire molecole cariche come ormoni ed altre molecole segnale coinvolte nel metabolismo cellulare e tissutale. Un complesso sistema di enzimi regola anche il *turnover* dei componenti strutturali dell'ECM modificando la dimensione del *mesh* della matrice stessa.

In sintesi, la variazione delle proprietà meccaniche ed elettriche all'interno di un intervallo omeostatico descrive la **plasticità dell'ECM**; la plasticità della matrice determina a sua volta la capacità di modulare fisiologicamente il flusso di un gran numero di molecole (e cellule) nel tessuto connettivo (Figura 1).

La variazione di plasticità dell'ECM segue un **ritmo ciradiano** basato su una fase catabolica caratterizzata dalla solubilizzazione della matrice e una fase anabolica caratterizzata da una nuova deposizione di componenti della matrice. Durante un periodo di 24 ore, la ECM cambia la sua solubilità; l'ECM è alternativamente in fase catabolica (**fase SOL**) prevalentemente caratterizzata da un'aumentata attività proteasica in condizioni di acidosi, e in una anabolica (**fase GEL**) prevalentemente caratterizzata da un aumento dell'attività delle sintesi in condizioni di alcalosi.

La cronobiologia del *turnover* dell'ECM è controllata da spe-

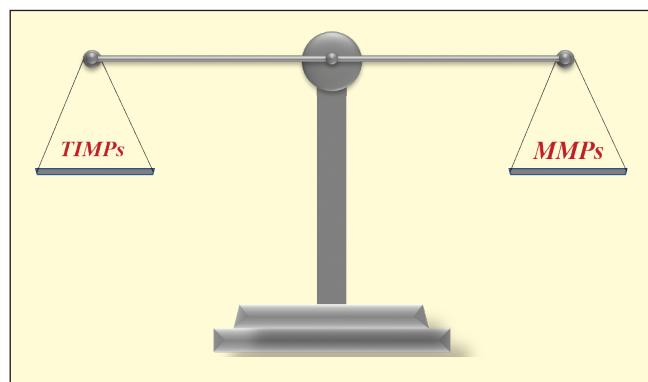


Figura 2 - La cronobiologia del turnover dell'ECM è controllata da specifici enzimi e da molecole che inibiscono gli enzimi stessi. Il turnover dell'ECM è modulato dall'interazione tra le MMPs e corrispettive TIMPs determinando l'effetto combinato sul *turnover* dell'ECM: le TIMPs inibiscono le MMPs in modo stechiometrico in rapporto 1:1.

cifici enzimi (MMPs - Metalloproteinasi, 22 enzimi proteolitici umani) (28), da corrispettive molecole che inibiscono le MMPs (4 TIMPs - *Tissue Inhibitor of metalloproteinases*) e da ormoni come il **cortisolo** (29) (Figura 2).

Sintesi ed azione delle MMPs e delle TIMPs sono controllate da diverse citochine (30): le citochine pro-infiammatorie guidano l'attività delle MMPs con conseguente degradazione della ECM; le citochine antinfiammatorie guidano l'attività delle TIMPs con conseguente nuova deposizione di ECM (Figura 3).

5. La perdita dell'omeostasi dell'ECM

Il *turnover* dell'ECM è modulato dall'interazione tra le MMPs e le loro TIMPs. L'equilibrio tra MMPs e TIMPs è controllato da citochine che gestiscono l'equilibrio tra fibrolisi e fibrogenesi. IL-1, IFN- γ e TNF- α stimolano la proteolisi enzimatica

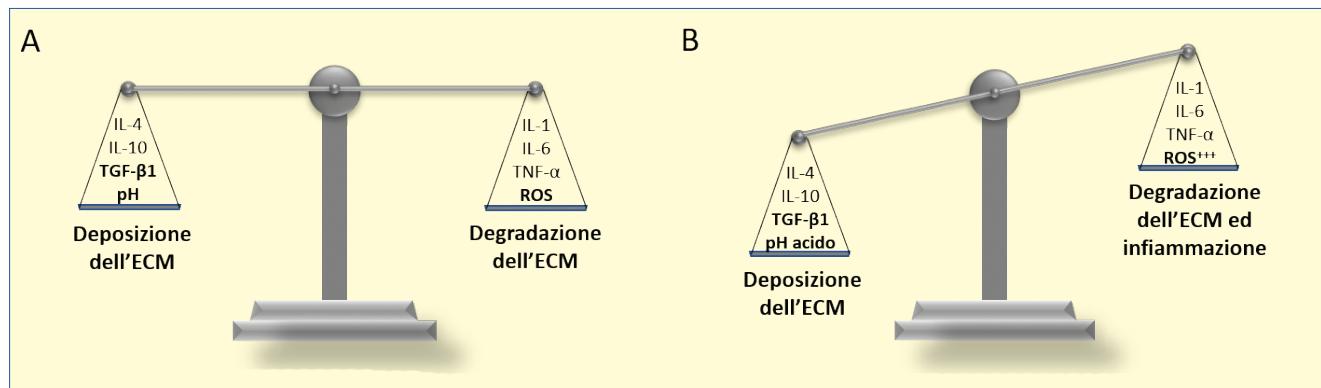


Figura 3 - A) Nella fisiologia dell'ECM, le citochine controllano l'equilibrio tra fibrolisi e fibrogenesi. IL-1, IFN- γ e TNF- α stimolano gli enzimi proteolitici mentre TGF- β , IL-4 e IL-10 stimolano gli inibitori degli enzimi proteolitici stessi. B) L'alterazione dell'espressione dei mediatori del rimodellamento dell'ECM è strettamente connessa con i fenomeni infiammatori.

mentre TGF- γ , supportato da IL-4 e IL-10, stimola gli inhibitori degli enzimi proteolitici (30).

L'alternanza ciclica dell'espressione delle proteine che rimodellano l'ECM induce **fenomeni infiammatori fisiologici responsabili del rimodellamento stesso**.

Il pannello di citochine coinvolto nel turnover dell'ECM è parzialmente speculare a quello infiammatorio e, analogamente, il suo dispiegamento è legato all'infiammazione del microambiente del tessuto connettivo con alterazione del pH locale e delle condizioni di ossidriduzione (formazione di ROS/RNS).

L'iper-espressione di ROS e la concomitante riduzione del pH inducono un'**infiammazione patologica**, responsabile della modifica delle condizioni elettriche dell'ECM con compromissione sia della funzione di filtro elettrostatico sia di barriera meccanica a causa dell'alterazione del turnover dell'ECM stessa. Le malattie infiammatorie sono uno dei principali fattori scatenanti della riduzione del pH a livello extracellulare (31, 32). Il ruolo dei ROS e del pH nell'omeostasi dell'ECM è particolarmente interessante in quanto entrambi sono precursori e mediatori dell'induzione delle metalloproteinasi (30).

Lo stress ossidativo a livello della matrice extracellulare causato dai ROS induce direttamente la traslocazione nucleare di NF-kB e la sintesi di MMPs; inoltre, i ROS sono anche i mediatori di vie pro-infiammatorie indotte da citochine come IL-1 β e TNF- α che partecipano alle loro cascate di segnalazione intracellulare con conseguente sovra-espressione di MMPs (Figura 4).

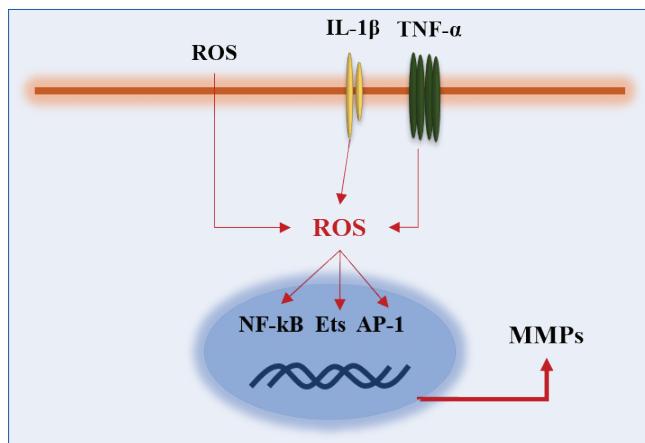


Figura 4 - Ruolo dei ROS nell'espressione delle MMPs. I ROS extracellulari attivano direttamente la sintesi delle MMPs via NF-kB. Le cascate di segnale pro-infiammatorie innescate da IL-1 β e TNF- α inducono la sovra-espressione di MMPs tramite la stimolazione dei ROS intracellulari.

Una condizione acida persistente è deleteria per l'omeostasi dell'ECM ed è responsabile della degenerazione dell'ECM stessa. Uno stato di acidosi è responsabile dell'aumentata at-

tività delle proteasi, dell'eccessiva idrolisi e rimodellamento delle proteine dell'ECM e della persistenza della fase SOL. Al contrario, uno stato di alcalosi prevalente è legato all'aumentata attività anti-proteasica con eccessiva neo-sintesi di proteine dell'ECM e conseguente persistenza della fase GEL (Figura 5).

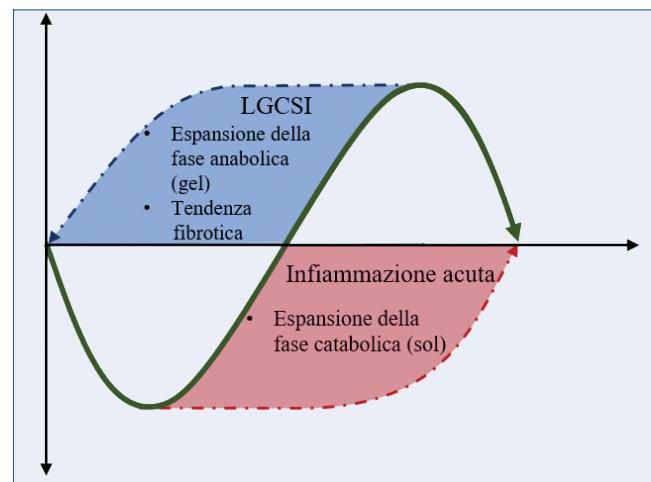


Figura 5 - ROS, pH e infiammazione patologica. La sovra-espressione di ROS, la riduzione del pH e l'infiammazione sono responsabili dell'alterazione delle fisiologiche fasi metaboliche dell'ECM (curva verde). L'infiammazione acuta aumenta la durata della fase catabolica (curva e area rossa) e la solubilità della matrice. L'infiammazione sistemica cronica di basso grado aumenta la fase anabolica (curva e area blu) promuovendo la gelificazione progressiva della matrice (tendenza fibrotica).

È interessante notare che una prevalenza persistente della fase GEL è spesso la conseguenza di una mancata risoluzione di un evento infiammatorio acuto. Questa condizione porta a una persistente fase GEL compensativa, interpretabile come un tentativo dell'ECM di neutralizzare la fase SOL persistente (e, per questo, non fisiologica).

L'alterazione della struttura dell'ECM e delle sue proprietà elettrostatiche altera l'azione barriera/filtro della matrice stessa. La perdita dell'omeostasi dell'ECM influenza il traffico molecolare nel microambiente cellulare causando la progressiva alterazione del *signaling* intercellulare e favorendo l'imregnazione della matrice da parte di sostanze metaboliche di scarto, anche tossiche nel medio-lungo periodo. Di conseguenza, sia i processi cellulari anabolici che catabolici sono progressivamente perturbati dalle alterazioni dell'ECM. Un numero considerevole di patologie presenta, tra i suoi agenti etiologici, l'alterazione delle caratteristiche della matrice extracellulare, le alterazioni del suo turnover e la degenerazione della stessa ECM.

Il turnover dell'ECM è compromesso, ad esempio, nelle malattie degenerative fibrotiche e nella nefropatia diabetica. È interessante notare come, anche nei fenomeni di invecchia-

mento patofisiologico, l'alterazione dell'omeostasi dell'ECM sia fondamentale (30, 33, 34).

La degenerazione litica dell'ECM è principalmente studiata in relazione a patologie oncologiche (meccanismi di metastatizzazione) ed in malattie che influenzano gli equilibri proteolitici come il Morbo di Crohn, l'Epidermolisi Bollosa e l'Osteoartrosi (35-38).

Un tratto distintivo comune a tutte le malattie citate è la presenza di una condizione infiammatoria cronica che, come detto, può guidare l'alterazione del pH e del bilancio *redox* all'interno del microambiente cellulare e, di conseguenza, alterare il *turnover* dell'ECM.

La lenta degradazione della cartilagine articolare durante l'osteoartrosi (OA) è un chiaro esempio della perdita di omeostasi dell'ECM (37). Sia in condizioni normali che patologiche, il *turnover* dell'ECM della cartilagine è controllato dai condrociti attraverso vie anaboliche e cataboliche e vie di segnalazione autocrina/paracrina. I condrociti, sotto il controllo di specifici fattori di crescita (ad esempio TGF- β e IGF-1) producono le macromolecole e gli insiemi di enzimi per la corretta deposizione dell'ECM e per la gestione del suo *turnover*. L'equilibrio tra fasi anaboliche e cataboliche è cruciale per l'integrità dell'ECM; in presenza di OA, i processi catabolici superano i processi anabolici; il catabolismo è innescato dalle citochine proinfiammatorie che promuovono l'infiammazione del microambiente cellulare con gli effetti precedentemente citati sull'ECM (37).

Una conoscenza più approfondita dei meccanismi di *turnover* dell'ECM e la possibilità di un intervento terapeutico sulla matrice stessa possono essere punti chiave per la progettazione di un nuovo approccio al trattamento e alla prevenzione di un gran numero di condizioni patologiche in cui l'infiammazione gioca un ruolo preminente. Sfortunatamente, all'aumento delle conoscenze nel campo della fisiologia dell'ECM non corrisponde un altrettanto rapido interesse nel rendere l'ECM un bersaglio farmacologico.

6. Omotossicologia e Medicina di Bioregolazione dei Sistemi (*Bioregulatory Systems Medicine - BrSM*) e la modulazione del turnover della matrice Extracellulare.

La moderna ricerca medica e farmacologica concentra i suoi sforzi principalmente sullo studio dei meccanismi intracellulari di regolazione biologica al fine di identificare le principali alterazioni patologiche e stabilire strategie per il loro controllo. Pertanto, il microambiente cellulare è, nella maggior parte dei casi, relegato al ruolo di luogo in cui si verificano parte delle interazioni cellula-cellula e, in quanto tale, non è considerato un bersaglio farmacologico rilevante. Tuttavia, il moderno concetto di microambiente cellulare dimostra che l'ECM non è inerte ma un attore importante nei sistemi di segnalazione extracellulare. Il mantenimento dell'omeostasi della matrice garantisce lo sviluppo ottimale delle interazioni che si svolgono al suo interno; pertanto, le strategie volte al mantenimento o al ripristino dell'omeostasi

dell'ECM possono essere considerate come interventi terapeutici a tutti gli effetti.

La progettazione di un approccio farmacologico innovativo per la modulazione dell'omeostasi dell'ECM è possibile applicando i principi dell'Omotossicologia e della sua più moderna interpretazione, la Medicina di Bioregolazione dei Sistemi (BrSM). (9, 39)

BrSM è un approccio medico di recente formulazione volto ad integrare i progressi nella scienza dei *network* molecolari, dell'infiammazione e della biologia dei sistemi al fine di formulare ipotesi terapeutiche basate sulla bioregolazione dei sistemi interessati dall'evento patologico (9); L'obiettivo della BrSM è quello di stimolare le capacità di autoregolazione di cellule e tessuti e può essere considerato l'approccio ideale per la modulazione dell'omeostasi dell'ECM.

Gli interventi di BrSM utilizzano farmaci *multicomponent/multitarget* che agiscono su più vie di segnalazione intrinseche alle reti autoregolatrici; una strategia di BrSM, applicata alla modulazione del *turnover* dell'ECM, ha il potenziale per influenzare lo stato infiammatorio, il bilancio *redox* e le fasi anaboliche/cataboliche, consentendo un controllo efficiente dell'omeostasi della matrice.

Il medicinale naturale *low dose multicomponent/multitarget Galium-Heel®* (*Biologische Heilmittel Heel GmbH, Baden-Baden, Germania*) è in grado di agire sui meccanismi di *turnover* dell'ECM; i suoi componenti esercitano, in particolare, le seguenti azioni biologiche:

- **stimolo del turnover della sostanza fondamentale. Risincronizzazione delle fasi SOL/GEL della Matrice Extracellulare** (*Thuja occidentalis D3, Pyrogenium D6, Galium aparine D3, Galium album D3, Clematis recta D4, Ononis spinosa D4, Apis mellifica D12, Caltha palustris D3, Betula alba D2, Saponaria officinalis D4, Hedera helix D4*);
- **attivazione del drenaggio linfatico ed emutoriale epato-renale** (*Caltha palustris D3, Thuja occidentalis D3, Hedera helix D4, Betula alba D2, Thuja occidentalis D3, Urtica urens D3, Clematis recta D4, Ononis spinosa D4, Saponaria officinalis D4*);
- **azione antinfiammatoria** (*Echinacea D5, Apis mellifica D12*);
- **azione anti-degenerativa** (*Galium D3, Sedum D3, Sempervivum D4, Ac. Nitricum D6, Argentum Metallicum D8, Aurum Met. D10*).

Galium-Heel®, in virtù della sua composizione *multicomponent/multitarget*, può modulare il *turnover* dell'ECM agendo in modo differenziato sui mediatori dell'infiammazione, sul bilancio *redox* e sui processi catabolici/anabolici.

7. Farmacologia dei componenti di Galium-Heel®

Il meccanismo d'azione dei medicinali contenenti rimedi vegetali, animali e minerali, come nel caso di Galium-Heel®, è basato sulle attività biologiche dei singoli componenti, i quali

esercitano il loro effetto farmacologico in virtù della loro preparazione omeopatica.

Le basse concentrazioni (ottenute attraverso il metodo di preparazione omeopatico) dei principi attivi contenuti nei componenti costituenti Galium-Heel® consentono loro di mantenere un'attività farmacologica riducendo enormemente e eliminando i possibili effetti avversi che questi principi attivi possono mostrare se usati a concentrazioni più elevate.

Nello specifico:

- I **rimedi minerali** di Galium-Heel® contribuiscono alla modulazione della sintesi e della deposizione delle componenti fibrillari della matrice extracellulare. In particolare: *Nitricum acidum* agisce come donatore di ossido

nitrico (NO) attraverso il percorso nitrato-nitrito-NO basato su un meccanismo di azione indipendente dalla NOS - Ossido Nitrico Sintetasi - (tipico delle fasi del dolore tissutale, causato ad esempio da ipossia che è accompagnato da perdita di plasticità dell'ECM) (40-43). La stimolazione di questa via alternativa di sintesi dell'NO può supportare la sintesi del collagene. È significativo notare che l'NO agisce in modo bifasico, stimolando la sintesi di nuovo collagene a basse concentrazioni e inibendolo a concentrazioni più elevate. *Argentum metallicum* e *Aurum metallicum* sono fonti di argento ed oro, elementi fisiologicamente presenti in tracce ed esercitanti una funzione antiossidante (44); l'oro è anche coinvolto nei meccanismi di inibizione delle metalloproteinasi (MMPs)

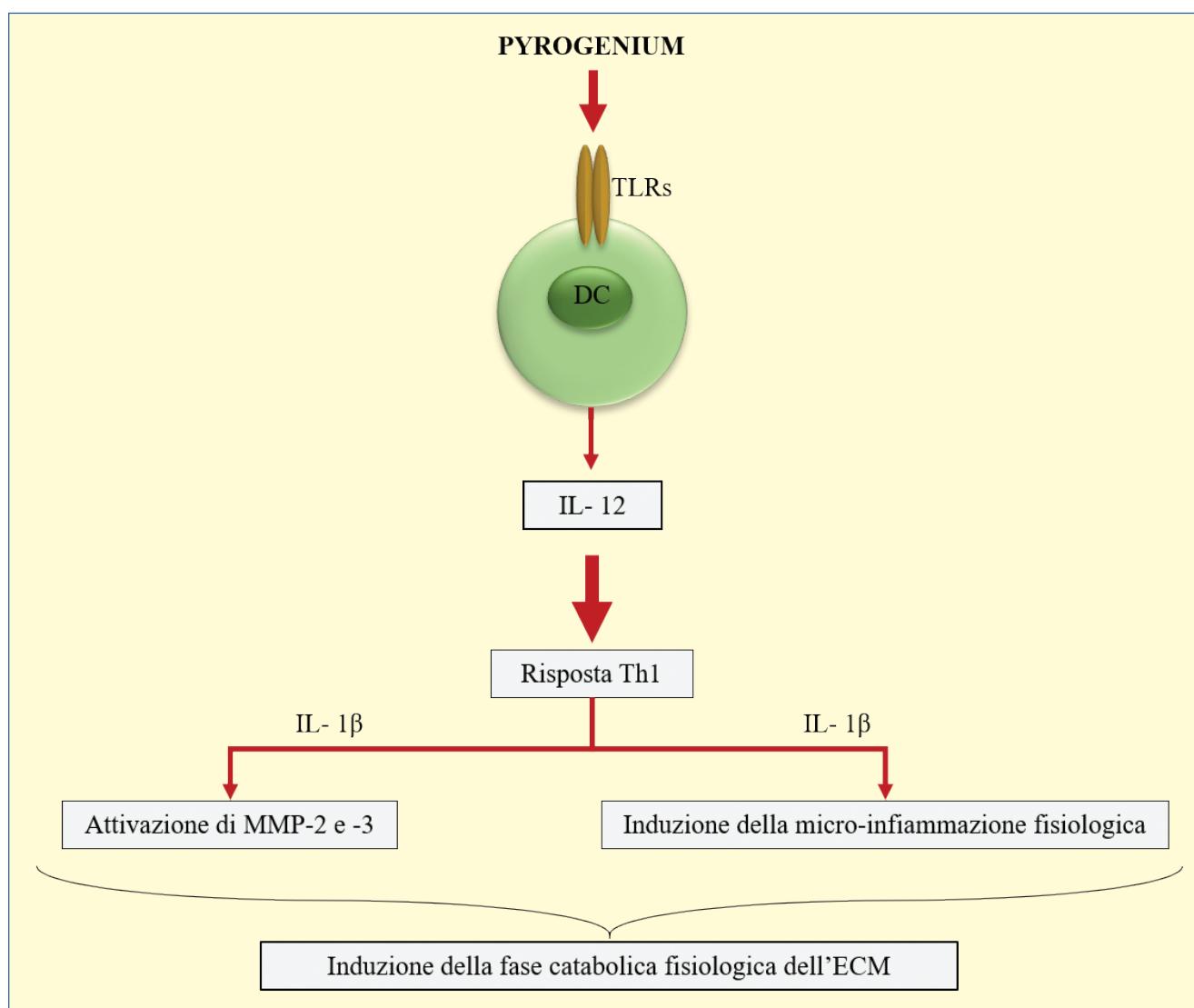


Figura 6 - Meccanismo d'azione putativo di Pyrogenium. Pyrogenium attiva le cellule dendritiche (DC) tramite i TLRs. Le DC rilasciano IL-12 che induce a sua volta la maturazione dei sub-cloni Th1 dei linfociti. La risposta immunitaria di Tipo 1 mediata da IL-1 β promuove una microinfiammazione controllata e la sintesi delle MMPs (71).

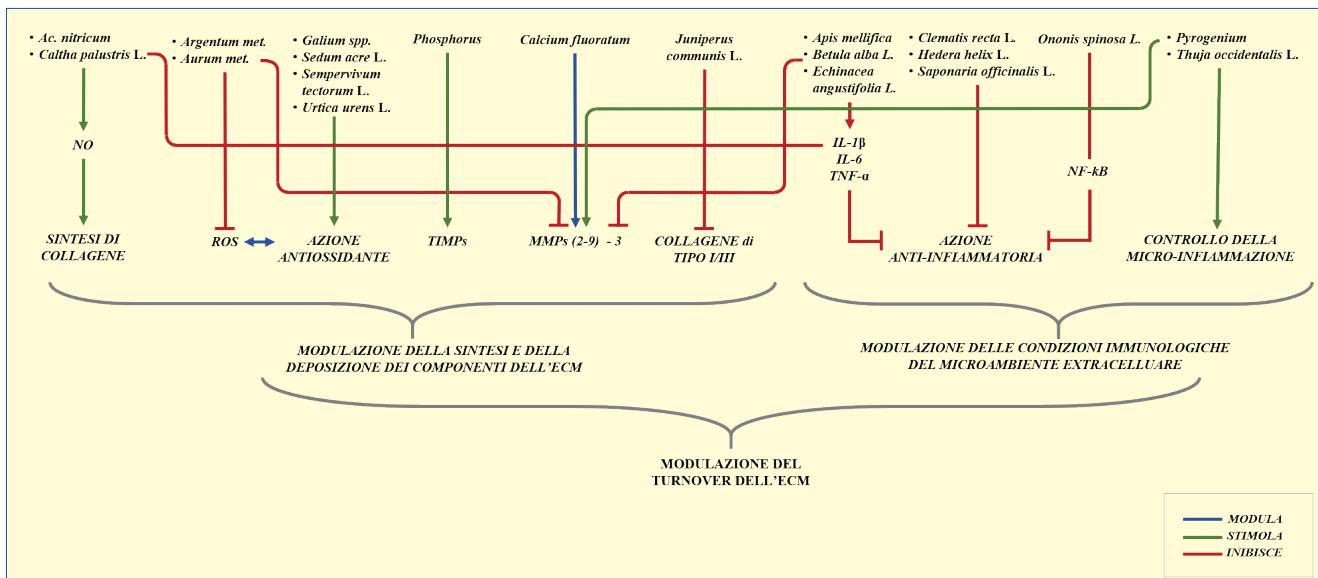


Figura 7 – Pannello sinottico delle azioni biologiche attribuibili ai singoli componenti di Galium -Heel.

(45). *Phosphorus* e *Calcium fluoratum* (fonte di fluoruro) sono coinvolti nei processi di regolazione del turnover dell'ECM essendo il fosforo coinvolto nei processi di sintesi delle TIMPs (46) e il secondo, sotto forma di fluoruro, nella regolazione della sintesi di MMP-2 e -9 (47).

- I componenti vegetali *Caltha palustris* L., *Galium aparine* L., *Galium album* L., *Sedum acre* L., *Sempervivum tectorum* L., *Urtica urens* L., *Juniperus communis* L. e *Betula alba* L. contribuiscono alla modulazione della deposizione della matrice. *C. palustris* L. promuove la sintesi del collagene mediata dall'Ossido nitrico (48). *Galium spp.*, *S. acre* L., *S. tectorum* L. e *U. urens* L. esercitano una potente azione antiossidante (49-53) contribuendo alla regolazione dei livelli di stress ossidativo. *J. communis* L. controlla la sintesi del collagene di Tipo I e III riducendo la loro espressione ed esercitando un'azione protettiva contro la tendenza alla fibrosi (54). *B. alba* L. contribuisce a ridurre l'espressione di MMP-3 in accordo con la sintesi ridotta del collagene di Tipo III (55, 56). *B. alba* L. esercita anche un'azione antinfiammatoria che riduce l'espressione di IL-1 β (56).
- Gli altri rimedi contenuti in Galium -Heel^{*} sono coinvolti nella modulazione del processo infiammatorio: *Apis mellifica*, *B. alba* L. ed *Echinacea angustifolia* L. riducono l'espressione di diverse citochine pro-infiammatorie come IL-1 β , IL-6 e TNF- α (56-62).

È riportato in letteratura come *Ononis spinosa* L. sia coinvolta nella down-regolazione diretta di NF-kB (63) mentre *Clematis recta* L., *Hedera helix* L. e *Saponaria officinalis* L. sono descritti come potenti modulatori della risposta infiammatoria (64-70).

Particolarmente importanti sono *Pyrogenium* (ricco di lipo-polisaccaridi – LPS – derivati dalle pareti di

batteri Gram) e *Thuja occidentalis* L., entrambi in grado di esercitare un effetto immunomodulante. Sono coinvolti nella regolazione della microinfiammazione fisiologica che controlla la transizione delle fasi della matrice attraverso i processi anabolici e catabolici. *Pyrogenium* e *T. occidentalis* L. possono stimolare la risposta immunitaria di tipo Th1 inducendo una microinfiammazione controllata e di conseguenza promuovendo la sintesi di MMPs (71-73) (Figure 6 e 7).

8. Conclusioni

Negli ultimi anni il ruolo dell'ECM è stato rivalutato come fattore chiave nella regolazione dei processi cellulari a livello tissutale, sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Il concetto di plasticità e rigidità della matrice è stato approfondito associando la perdita della corretta sincronizzazione tra le fasi anaboliche e cataboliche dell'ECM all'insorgenza di numerose patologie, specialmente di natura infiammatoria. L'instaurarsi di una condizione subclinica di infiammazione sistemica cronica di basso grado induce un'alterazione del turnover della matrice con una predominante fase catabolica durante l'evento infiammatorio acuto e quindi con una prevalenza di quella anabolica durante l'infiammazione cronica con conseguente degenerazione fibrotica del tessuto colpito. Sulla base di queste considerazioni, l'importanza di agire sul turnover della matrice è diventata chiara e il recupero dell'omeostasi dell'ECM può essere considerato un possibile nuovo obiettivo terapeutico.

Per raggiungere questo scopo è necessario uno strumento farmacologico in grado di modulare i meccanismi di sintesi della deposizione e di rimodellamento della matrice e di recuperare la corretta cronobiologia delle fasi anaboliche e cataboliche.

In virtù della sua composizione, il medicinale *multicomponent/multitarget* Galium-Heel® è in grado di agire da “pacemaker” su molteplici aspetti attinenti al *turnover* dell’ECM e, allo stesso tempo, contribuire al ripristino dell’omeostasi della matrice grazie alla sua “intelligenza biologica”.

Queste considerazioni teoriche richiedono valutazioni sperimentali volte a valutare, ad esempio, l’attività di Galium-Heel® come *scavenger* di radicali liberi (fattori-chiave nella regolazione del *turnover* dell’ECM e coinvolti anche nei fenomeni infiammatori) e la sua azione sul collagene di Tipo III e sull’MMP-3 tipici mediatori del fenomeno fibrotico, valutazioni che sono in corso nel momento in cui questo lavoro viene scritto e pubblicato.

Referenze bibliografiche

- Mazzarello P. A unifying concept: the history of cell theory. *Nat Cell Biol.* 1999;1(1):E13-15.
- Walter E, Scott M. The life and work of Rudolf Virchow 1821-1902: “Cell theory, thrombosis and the sausage duel”. *J Intensive Care Soc.* 2017;18(3):234-235.
- Hildebrandt S, Czarnowski G. Alfred Pischinger (1899-1983): An Austrian career in anatomy continuing through National Socialism to post-war leadership. *Ann Anat.* 2017 May;211:104-113.
- Heine H. Matrix and Matrix Regulation. Significance of the extracellular matrix (ground substance). *Biological Therapy.* 1992;10(4):311-313.
- Bianconi E, Piovesan A, Facchini F, et al. An estimation of the number of cells in the human body. *Ann Hum Biol.* 2013;40(6):463-471.
- Oschman JL. Charge transfer in the living matrix. *J Bodyw Mov Ther.* 2009;13(3):215-228.
- Thorne JT, Segal TR, Chang S, Jorge S, Segars JH, Leppert PC. Dynamic Reciprocity Between Cells and Their Microenvironment in Reproduction. *Biol Reprod.* 2015;92(1):1-10.
- Pietzner M, Kaul A, Henning AK, et al. Comprehensive metabolic profiling of chronic low-grade inflammation among generally healthy individuals. *BMC Med.* 2017;15(1):210.
- Goldman AW, Burmeister Y, Cesnulevicius K, et al. Bioregulatory systems medicine: an innovative approach to integrating the science of molecular networks, inflammation, and systems biology with the patient’s autoregulatory capacity? *Front Physiol.* 2015;6:225.
- Kotas ME, Medzhitov R. Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. *Cell.* 2015;160(5):816-827.
- Serhan CN, Levy BD. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *J Clin Invest.* 2018. pii: 97943.
- Soylemezoglu O, Wild G, Dalley AJ, et al. Urinary and serum type III collagen: markers of renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant.* 1997;12(9):1883-1889.
- Karsdal MA, Nielsen MJ, Sand JM, et al. Extracellular matrix remodeling: the common denominator in connective tissue diseases. Possibilities for evaluation and current understanding of the matrix as more than a passive architecture, but a key player in tissue failure. *Assay Drug Dev Technol.* 2013;11(2):70-92.
- Barascuk N, Vassiliadis E, Larsen L, et al. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of a specific MMP-9 mediated degradation fragment of type III collagen--A novel biomarker of atherosclerotic plaque remodeling. *Clin Biochem.* 2011;44(10-11):900-906.
- Labat-Robert J, Bihari-Varga M, Robert L. Extracellular matrix. *FEBS Lett.* 1990;268(2):386-393.
- Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;97:4-27.
- Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol.* 2003;200(4):423-428.
- Benias PC, Wells RG, Sackey-Aboagye B, et al. Structure and distribution of an unrecognized interstitium in human tissues. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-8.
- LeBleu VS, Macdonald B, Kalluri R. Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med (Maywood).* 2007;232(9):1121-1129.
- Yurchenco PD. Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(2). pii: a004911.
- Taylor KR, Gallo RL. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.* 2006;20(1):9-22.
- Varti A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J. (editors) *Essentials of Glycobiology.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1999.
- Rhodes JM, Simons M. The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. *J Cell Mol Med.* 2007;11(2):176-205.
- Sasaki T, Fässler R, Hohenester E. Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J Cell Biol.* 2004;164(7):959-963.
- Lieleg O, Baumgärtel RM, Bausch AR. Selective filtering of particles by the extracellular matrix: an electrostatic bandpass. *Biophys J.* 2009;97(6):1569-1577.
- Zámeník J, Vargová L, Homola A, Kodet R, Syková E. Extracellular matrix glycoproteins and diffusion barriers in human astrocytic tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2003;30:338-350.
- Guretzki HJ, Schleicher E, Gerbitz KD, Olgemöller B. Heparin induces endothelial extracellular matrix alterations and barrier dysfunction. *Am J Physiol.* 1994;267(4 Pt 1):C946-594.
- Yalcinkaya E, Celik M, Bugan B. Extracellular matrix turnover: a balance between MMPs and their inhibitors. *Arq Bras Cardiol.* 2014;102(5):519-520.
- Delany AM, Jeffrey JJ, Rydziel S, Canalis E. Cortisol increases interstitial collagenase expression in osteoblasts by post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem.* 1995;270(44):26607-12.
- Siwik DA, Colucci WS. Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium. *Heart Fail Rev.* 2004;9(1):43-51.
- Blair HC, Teitelbaum SL, Grossi LE, et al. Extracellular-matrix degradation at acid pH. Avian osteoclast acid collagenase isolation and characterization. *Biochem J.* 1993;290 (Pt 3):873-884.
- Goerges AL, Nugent MA. pH regulates vascular endothelial growth factor binding to fibronectin: a mechanism for control of extracellular matrix storage and release. *J Biol Chem.* 2004;279(3):2307-2315.
- Kumar A, El-Osta A, Hussain AA, Marshall J. Increased sequestration of matrix metalloproteinases in ageing human Bruch’s membrane: implications for ECM turnover. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(5):2664-2670.
- Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol.* 2015;44-46:247-254.
- Nelson CM, Bissell MJ. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:287-309.
- Bailey CJ, Hembry RM, Alexander A, Irving MH, Grant ME, Shuttleworth CA. Distribution of the matrix metalloproteinases stromelysin, gelatinases A and B, and collagenase in Crohn’s disease and normal intestine. *J Clin Pathol.* 1994;47(2):113-6.
- Maldonado M, Nam J. The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis. *Biomed Res Int.* 2013;2013:284873.
- Changotade SI, Assoumou A, Guéniche F, et al. Epigallocatechin gallate’s protective effect against MMP7 in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients. *J Invest Dermatol.* 2007;127(4):821-828.
- St Laurent G 3rd, Seilheimer B, Tackett M, et al. Deep Sequencing Transcriptome Analysis of Murine Wound Healing: Effects of a Multicomponent, Multitarget Natural Product Therapy-Tr14. *Front Mol Biosci.* 2017;4:57.
- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329(27):2002-2012.

41. Xia W, Szomor Z, Wang Y, Murrell GA. Nitric oxide enhances collagen synthesis in cultured human tendon cells. *J Orthop Res.* 2006;24(2):159-172.
42. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(2):156-167.
43. Gilkes DM, Semenza GL, Wirtz D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(6):430-439.
44. Negahdary M, Chelongar R, Zadeh SK, Ajdary M. The antioxidant effects of silver, gold, and zinc oxide nanoparticles on male mice in in vivo condition. *Adv Biomed Res.* 2015;4:69.
45. Hashimoto M, Sasaki JI, Yamaguchi S, et al. Gold Nanoparticles Inhibit Matrix Metalloproteases without Cytotoxicity. *J Dent Res.* 2015;94(8):1085-1091.
46. Veerendhar A, Reich R, Breuer E. Phosphorus based inhibitors of matrix metalloproteinases. *C. R. Chimie* 2010;13:1191-1202.
47. Slompo C, Buzalaf CP, Damante CA, et al. Fluoride modulates preosteoblasts viability and matrix metalloproteinases-2 and -9 activities. *Braz Dent J.* 2012;23(6):629-634.
48. Suszko A, Obmińska-Mrukowicz B. Effects of polysaccharide fractions isolated from *Caltha palustris* L. on the activity of phagocytic cells & humoral immune response in mice with collagen-induced arthritis: A comparison with methotrexate. *Indian J Med Res.* 2017;145(2):229-236.
49. Bokhari J, Khan MR, Shabbir M, Rashid U, Jan S, Zai JA. Evaluation of diverse antioxidant activities of *Galium aparine*. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2013;102:24-9.
50. Thring TS, Hili P, Naughton DP. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complement Altern Med.* 2009;9:27.
51. Stanković M, Radojević I, Ćurčić M, et al. Evaluation of biological activities of goldmoss stonecrop (*Sedum acre* L.). *Turk J Biol.* 2012;36:580-588.
52. Sentjurc M, Nemec M, Connor HD, Abram V. Antioxidant activity of *Sempervivum tectorum* and its components. *J Agric Food Chem.* 2003;51(9):2766-71.
53. Marrassini C, Acevedo C, Miño J, Ferraro G, Gorzalczany S. Evaluation of antinociceptive, antiinflammatory activities and phytochemical analysis of aerial parts of *Urtica urens* L. *Phytother Res.* 2010 Dec;24(12):1807-12.
54. Han X, Parker TL. Anti-inflammatory activity of Juniper (*Juniperus communis*) berry essential oil in human dermal fibroblasts. *Cogent Medicine* 2017;4:1306200.
55. Rastogi S, Pandey MM, Kumar Singh Rawat A. Medicinal plants of the genus *Betula*-traditional uses and a phytochemical-pharmacological review. *J Ethnopharmacol.* 2015;159:62-83.
56. Ra HJ, Lee HJ, Jo HS, et al. Betulin suppressed interleukin-1 β -induced gene expression, secretion and proteolytic activity of matrix metalloproteinase in cultured articular chondrocytes and production of matrix metalloproteinase in the knee joint of rat. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2017;21(1):19-26.
57. Poitevin B, Davenas E, Benveniste J. In vitro immunological degranulation of human basophils is modulated by lung histamine and *Apis mellifica*. *Br J Clin Pharmacol.* 1988;25(4):439-444.
58. Bigagli E, Luceri C, Bernardini S, Dei A, Filippini A, Dolara P. Exploring the effects of homeopathic *Apis mellifica* preparations on human gene expression profiles. *Homeopathy.* 2014;103(2):127-132.
59. Bigagli E, Luceri C, Dei A, Bernardini S, Dolara P. Effects of Extreme Dilutions of *Apis mellifica* Preparations on Gene Expression Profiles of Human Cells. *Dose Response.* 2016;14(1):1559325815626685.
60. Dei A, Bernardini S. Hormetic effects of extremely diluted solutions on gene expression. *Homeopathy.* 2015;104(2):116-122.
61. Bałan BJ, Sokolnicka I, Skopińska-Różewska E, Skopiński P. The modulatory influence of some Echinacea-based remedies on antibody production and cellular immunity in mice. *Cent Eur J Immunol.* 2016;41(1):12-18.
62. Hou CC, Chen CH, Yang NS, et al. Comparative metabolomics approach coupled with cell- and gene-based assays for species classification and anti-inflammatory bioactivity validation of Echinacea plants. *J Nutr Biochem.* 2010;21(11):1045-1059.
63. Ergene Öz B, Saltan İşcan G, Küpeli Akkol E, Süntar İ, Keleş H, Bahadir Acikara Ö. Wound healing and anti-inflammatory activity of some *Ononis* taxons. *Biomed Pharmacother.* 2017;91:1096-1105.
64. Chawla R, Kumar S, Sharma A. Pharmacognostic standardization of *clematis erecta* linn. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2012;4(1):482-487.
65. Chawla R, Kumar S, Sharma A. The genus *Clematis* (Ranunculaceae): chemical and pharmacological perspectives. *J Ethnopharmacol.* 2012;143(1):116-150.
66. Chawla R, Kumar D, Godara A, et al. Analgesic and Antiinflammatory Activities of *Clematis erecta* Aerial Parts. *Indian J Pharm Sci* 2017;79(3):474-477.
67. Süleyman H, Mshvildadze V, Gepdiremen A, Elias R. Acute and chronic antiinflammatory profile of the ivy plant, *Hedera helix*, in rats. *Phytomedicine.* 2003;10(5):370-4.
68. Rai A. The Antiinflammatory and Antiarthritic Properties of Ethanol Extract of *Hedera helix*. *Indian J Pharm Sci.* 2013;75(1):99-102.
69. Medeiros JR, Medeiros H, Mascarenhas C, Davjn LB, Lewis NG. Bioactive components of *Hedera helix*. *Arquipélago, Life and Marine Sciences.* 2002;19A:27-32.
70. Rodríguez-Díaz M, Delporte C, Cartagena C, et al. Topical anti-inflammatory activity of quillaic acid from *Quillaja saponaria* Mol. and some derivatives. *J Pharm Pharmacol.* 2011;63(5):718-24.
71. Silacci P, Dayer JM, Desgeorges A, Peter R, Manueddu C, Guerne PA. Interleukin (IL)-6 and its soluble receptor induce TIMP-1 expression in synoviocytes and chondrocytes, and block IL-1-induced collagenolytic activity. *J Biol Chem.* 1998;273(22):13625-13629.
72. Offergeld R, Reinecker C, Gumz E, et al. Mitogenic activity of high molecular polysaccharide fractions isolated from the cypressaceae *Thuja occidentalis* L. enhanced cytokine-production by thiyopolysaccharide, g-fraction (TPSg). *Leukemia.* 1992;6 Suppl 3:189S-191S.
73. Sunila ES, Hamsa TP, Kuttan G. Effect of *Thuja occidentalis* and its polysaccharide on cell-mediated immune responses and cytokine levels of metastatic tumor-bearing animals. *Pharm Biol.* 2011;49(10):1065-1073.

Autore di contatto:

Dr. Diego Cardani

Guna S.p.a.

Dipartimento Scientifico

Via Palmanova 71.

20132 Milano, Italia

Tel. +39 02.280.181

e-mail: d.cardani@guna.it