

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
**SCIENZE FARMACOLOGICHE E TOSSICOLOGICHE,
DELLO SVILUPPO E DEL MOVIMENTO UMANO**

Ciclo XXVIII

Settore Concorsuale di afferenza: 05/G1

Settore Scientifico disciplinare: BIO/14

**Caratterizzazione di un nuovo modello di NAFLD e
valutazione del potenziale effetto antisteatotico di
estratti vegetali**

Presentata da: Andrea Vornoli

Coordinatore Dottorato

Chiar.ma Prof.ssa Patrizia Hrelia

Relatore

Chiar.mo Dott. Andrea Sapone

Correlatore

Chiar.mo Dott. Vincenzo Longo

Esame finale anno 2016

INDICE

ABBREVIAZIONI	
RIASSUNTO.....	
INTRODUZIONE	
Capitolo 1 STEATOSI EPATICA E STEATOEPATITE NON ALCOLICA	
1.1 Steatosi epatica non alcolica (NAFLD).....	
1.2 Patogenesi e progressione del danno epatico.....	
1.3 Progressione del danno epatico e sviluppo di steatoepatite non alcolica (NASH).....	
Capitolo 2 MODELLO SPERIMENTALE DI NAFLD NEL RATTO	
2.1 Induzione di NAFLD con dieta iperlipidica e streptozotocina (STZ)	
Capitolo 3 ENZIMI DEL DRUG METABOLISM	
3.1 Generalità	
3.2 Fase I: sistema citocromo P450 e DT-diaforasi	
3.3 Fase II: enzimi detossificanti e antiossidanti	
3.4 Dieta iperlipidica e <i>drug metabolism</i>	
3.5 Diabete e drug metabolism	
Capitolo 4 SOSTANZE NATURALI E NAFLD	
4.1 Estratti vegetali e potenziali effetti terapeutici	
Capitolo 5 PROPRIETÀ TERAPEUTICHE DELL'EUGENOLO	
Capitolo 6 SCOPO DELLA TESI	
Capitolo 7 MATERIALI E METODI	
7.1 Sostanze utilizzate	
7.2 Modello sperimentale	
7.3 Parametri ematici	

7.4	Frazioni microsomiali e citosoliche
7.5	Proteine totali.....
7.6	Dosaggio del glutatione.....
7.7	Indici di stress ossidativo.....
7.8	Estrazione e quantificazione dei lipidi epatici.....
7.9	Quantificazione del glicogeno epatico
7.10	Dosaggio del citocromo P450 (CYP)
7.11	Attività enzimatiche.....
7.11.1	<i>p</i> -Nitrofenolo idrossilasi (P-NPH).....
7.11.2	Anilina idrossilasi (ANH)
7.11.3	Benzilossichinolina debenzilasi (BQD)
7.11.4	Etossicumarina-O-deetilasi (ECOD).....
7.11.5	Catalasi (CAT)
7.11.6	Superossido dismutasi (SOD)
7.11.7	Glutatione reduttasi (GSH-red).....
7.11.8	Glutatione perossidasi (GPX)
7.12	Estrazione dell'RNA e preparazione del cDNA
7.13	PCR <i>real-time</i>
7.14	Elettroforesi (SDS-PAGE) e Western blotting
7.15	Analisi istologica
7.16	Analisi Statistica
Capitolo 8 RISULTATI.....	
8.1	Incremento ponderale e peso relativo del fegato
8.2	Parametri ematici

8.3	Glutathione ridotto ed altri indici di stress ossidativo
8.4	Contenuto dei lipidi nel fegato.....
8.5	Quantificazione del glicogeno epatico
8.6	Attività degli enzimi microsomiali
8.7	Enzimi citosolici
8.8	Analisi di espressione genica.....
8.9	Analisi delle proteine - <i>Western blotting</i>
8.10	Analisi istologica.....
8.11	Caratterizzazione del metabolismo del colesterolo e trasporto degli BAs nel modello HFD/STZ: analisi dell'espressione genica
DISCUSSIONE.....	
BIBLIOGRAFIA.....	

ABBREVIAZIONI

ABCA1 = ATP binding cassette transporter

ABCG5 = ATP binding cassette, subfamily G, member 5

ACC = Acetyl-CoA Carboxylase

ALT = Alanine Aminotransferase

ANOVA = Analysis Of Variance

ARE = Antioxidant Responsive Element

AST = Aspartate Aminotransferase

ATGL = Adipose Triglyceride Lipase

ATP = Adenosine Triphosphate

BAs = Bile Acids

BSEP = Bile Salt Export Pump

CA = Cholic Acid

CDCA = Chenodeoxycholic Acid

cDNA = complementary DNA

CHOP = C/EBP Homologous Protein

ChoRE = Carbohydrate Responsive Element

ChREBP = Carbohydrate Responsive Element Binding Protein

CLR = C-Type Lectin Receptor

COX2 = Cyclooxygenase 2

CPT1a = Carnitine Palmitoyl-transferase 1a

CTGF = Connective Tissue Growth Factor

CYP (P450) = Cytochrome P450

CYP7A1 = Cholesterol 7 Alpha-Hydroxylase

CYP27A1 = Cytochrome P450 27A1

CYP8B1 = Cytochrome P450 8B1

CYP7B1 = Cytochrome P450 7B1

DGAT2 = Diacylglycerol-O-Acyltransferase 2

DTNB = Dithionitrobenzoic Acid

FDA = Food and Drug Administration

FAS = Fatty Acid Synthase

FFA = Free Fatty Acid

FLD = Fatty Liver Disease

FXR = Farnesoid X receptor

G6Pasi = Glucose-6-Phosphatase

GH = Growth Hormone

GPX = Glutathione Peroxidase

GSH = Reduced Glutathione

HCV = Hepatitis C Virus

HDL = High Density Lipoprotein

HMGCR = Hydroxy Methyl - Glutharyl – Coenzyme A Reductase

HNE = 4-Hydroxynonenal

HO-1 = Heme Oxygenase-1

HSL = Hormone-Sensitive Lipase

IL = Interleuchin

IKK = IkappaB Kinase

IRS = Insulin Receptor Substrate

Keap1 = Kelch-like ECH associating protein

LDL = Low Density Lipoprotein

LXR α = Liver X Receptor α

MDR3 = Multidrug Resistance Protein 3

MRP2 = Multidrug Resistance Associated Protein 2

MRP4 = Multidrug Resistance Associated Protein 4

MCD = Methionine-Choline-Deficient Diet

MDA = Malondialdehyde

NAFLD = Non Alcoholic Fatty Liver Disease

NASH = Non Alcoholic Steato Hepatitis

NF κ B = Nuclear Factor kappa B

Nfr2 = Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

NOS = Nitric oxide synthase

NTCP = Sodium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide

OATP1A1 = Organic Anion Transporting Polypeptide 1A1

OATP1B1 = Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1

PEPCK = Phosphoenolpyruvate Carboxykinase

PI3K = Phosphatidil-Inositide 3-Kinase

PPAR α = Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α

PPAR γ = Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ

PRR = Pattern Recognition Receptor

PXR = Pregnane X Receptor

SAM = S-Adenosine Methionine

SHP = Short Heterodimer Partner

SRE = Sterol Responsive Element

SREBP1c = Sterol Regulatory Element Binding Protein – 1c

SULT2A1 = Sulfotransferase 2A1

T1DM = Type 1 Diabetes Mellitus

T2DM = Type 2 Diabetes Mellitus

TG = Triglycerides

TGF β = Transforming Growth Factor- β

TLR = Toll-Like Receptor

TNF- α = Tumor Necrosis Factor- α

UCP2 = Uncoupling protein 2

VLDL = Very Low Density Lipoprotein

XBP1 =X-Box Binding Protein-1

RIASSUNTO

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) è una patologia epatica progressiva, che ha inizio con l'accumulo di lipidi negli epatociti, e progredisce nella forma più grave di steatoepatite non alcolica (NASH), a sua volta correlata ad infiammazione, fibrosi e cirrosi. Le cause dell'iniziale accumulo di lipidi epatici possono essere di diversa natura, come obesità, diabete, eccessivo consumo di alcol o malattie metaboliche. Recentemente, ha assunto sempre più importanza lo studio delle piante, al fine di identificare componenti naturali capaci di proteggere da patologie quali la steatosi o la dislipidemia. A tale scopo, nella presente tesi, abbiamo sviluppato e caratterizzato un modello di ratto trattato con dieta iperlipidica e streptozotocina, utilizzato poi per valutare i potenziali effetti anti-steatotici di una miscela contenente 5 estratti vegetali (caigua, soia, erba medica, carciofo e riso rosso fermentato). Tale modello sperimentale è stato di recente proposto per la peculiarità di riprodurre molte caratteristiche della patogenesi della NAFLD nell'uomo.

I diversi effetti sono stati valutati mediante la determinazione dei parametri ematici, l'attività di enzimi del *drug metabolism* e l'analisi dell'espressione di geni del metabolismo del colesterolo, lipidico, glucidico, del trasporto degli acidi biliari, dell'infiammazione, dello stress del reticolo endoplasmatico (RE) e dei mitocondri.

Ratti maschi *Wistar* (n=42) sono stati trattati per 8 settimane. Durante le prime 4 settimane gli animali sono stati suddivisi in 2 gruppi, uno di controllo (CTR, n=6) alimentato con dieta standard (11% di energia derivante da grassi), ed uno alimentato con dieta iperlipidica (HFD, n=36) (55% di energia derivante da grassi, 2% di colesterolo) e trattato per via intraperitoneale con streptozotocina a basso dosaggio (35 mg/kg) per indurre l'apoptosi di alcune cellule β -pancreatiche, la deplezione insulinica e lo sviluppo del diabete. I ratti con valori di glucosio >14 mmol/l sono stati ammessi al trattamento. Gli animali sono stati suddivisi in 6 gruppi di 6 ratti ciascuno e trattati, mediante sonda intragastrica, per 4 settimane. La ripartizione in gruppi è la seguente: E con 10 mg/Kg di eugenolo (controllo positivo); M con latte di soia (veicolo di somministrazione); CTR e D con soluzione fisiologica, e infine A e B, trattati rispettivamente con 0,3 mg/Kg e 1 mg/Kg di monacolina K, molecola presente nella miscela di estratti vegetali (le dosi di monacolina K equivalgono, nell'uomo, a 43 μ g/Kg e 143 μ g/Kg). Al termine della sperimentazione è stato effettuato il sacrificio degli animali e da essi prelevati campioni di sangue e fegato.

Dai parametri ematici è emerso che i valori relativi a TC, LDL, glucosio e ALT sono risultati aumentati in D, A ed M, rispetto ai CTR, e parzialmente ripristinati in B ed E, che hanno mostrato

una significativa riduzione, rispetto al D, nei valori relativi al colesterolo LDL. Anche la presenza di steatosi, verificata tramite la quantificazione dei lipidi nel tessuto epatico, è risultata significativamente aumentata rispetto al CTR, in D, A ed M e significativamente ridotta, rispetto al D, in B ed E.

Dall'analisi delle attività marcatrici del CYP2E1 (p-nitrofenolo idrossilasi ed anilina-idrossilasi) è stata osservata una significativa induzione su D, A ed M ed un parziale ripristino dei valori di controllo solo in B. Lo stesso profilo di modulazione è stato ottenuto dall'analisi di Western blotting per le proteine CYP2E1 e CYP4A.

Per quanto riguarda gli enzimi antiossidanti, è stata osservata una generale induzione dell'attività DT-diaforasi e GSH-reduttasi per tutti e cinque i gruppi iperlipidemicici, ma nessuna influenza sulla GSH-perossidasi con l'eccezione del D, la cui attività è risultata significativamente diminuita per via del forte stress ossidativo. Dal dosaggio del GSH e della carbonilazione delle proteine è stata evidenziata la presenza di stress ossidativo nei ratti iperlipidici rispetto al controllo, che tende a ridursi significativamente nel B, come si evince dalla carbonilazione.

La presenza del 2% di colesterolo nella dieta iperlipidica è stata determinante per l'induzione, nei ratti steatotici, del gene CYP7A1 (fondamentale per la conversione del colesterolo in acidi biliari) e la significativa riduzione dei geni HMGCR (*step-limiting* nella biosintesi del colesterolo), ed LDLr (implicato nel *re-uptake* epatico del colesterolo LDL plasmatico). Nel B si osserva una netta tendenza al ripristino dei valori di controllo nell'espressione del gene CYP7A1.

Dall'analisi di geni coinvolti nell'infiammazione (IL6, TNF α , TGF β) e nello stress mitocondriale (PPAR α , CPT1a, LCAD, HADH α e UCP2) si evidenzia un significativo aumento in tutti i gruppi alimentati con dieta iperlipidica rispetto al CTR, ad eccezione dell'E, che mostra un significativo decremento rispetto agli HFD e al CTR. Il gruppo B ha presentato una significativa riduzione dei geni IL6, PPAR α e CPT1a, rispetto al D.

Per estendere la caratterizzazione del nostro modello steatotico, abbiamo poi analizzato diversi geni chiave del metabolismo del colesterolo e del trasporto degli acidi biliari, ed è emersa un'induzione dei geni responsabili della formazione dell'acido colico (CA) CYP7A1 e CYP8B1, ma non di quelli della formazione dell'acido chenodeossicolico(CDCA) CYP27A1 e CYP7B1. Inoltre, abbiamo osservato una diminuita espressione di SHP (gene chiave per l'inibizione feedback del CYP7A1 e del CYP8B1, regolato da FXR) e dei geni responsabili del trasporto degli acidi biliari (NTCP, MRP2/4, OATP1A1, OATP1B2, BSEP), del colesterolo (ABCG5), e della fosfatidilcolina (MDR3).

In conclusione, questi studi hanno contribuito ad estendere la caratterizzazione del nostro modello di ratto; inoltre, dall'analisi dei dati raccolti, la miscela vegetale ha determinato un miglioramento complessivo del quadro patologico della steatosi epatica.

INTRODUZIONE

Capitolo 1

STEATOSI EPATICA E STEATOEPATITE NON ALCOLICA

1.1 Steatosi epatica non alcolica (NAFLD)

Il fegato è il più importante organo multifunzionale dell'organismo coinvolto nella detossificazione, nell'accumulo dei nutrienti e nell'omeostasi del glucosio. Un qualsiasi danno ad una di queste funzioni può implicare lo sviluppo di una patologia epatica (Hassan K. et al., 2014).

Un esempio è rappresentato dalla steatosi epatica FLD (*Fatty Liver Disease*) che, allo stato attuale, colpisce una parte consistente della popolazione mondiale tra adulti e bambini. Quando l'introito calorico supera di gran lunga le richieste energetiche dell'organismo, l'eccesso energetico viene immagazzinato sotto forma di trigliceridi (TG) nel tessuto adiposo, portando all'obesità e alle conseguenze che ne derivano. Tra queste, l'insulino-resistenza (IR), associata all'obesità, sembra costituire l'evento patologico della sindrome metabolica: una condizione generale che racchiude un'ampia gamma di disordini, tra cui il diabete mellito di tipo 2, la dislipidemia, l'aterosclerosi, l'ipertensione e la stessa steatosi epatica. La steatosi epatica può essere suddivisa, da un punto di vista clinico, in due distinte categorie: la steatosi epatica alcolica (*Alcoholic Fatty Liver Disease*, AFLD) e la steatosi epatica non alcolica (*Non-alcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD). La prima è causata da un eccessivo consumo di alcol, mentre la seconda è associata ad altre cause, tra cui l'obesità. Difatti, la prevalenza della steatosi negli individui obesi è circa pari al 75%, di cui il 35% sviluppa NAFLD, in assenza di un evidente consumo di alcol. La prerogativa primaria della steatosi è l'insolita presenza di TG negli epatociti, che produce una varietà di quadri istologici: a partire dalla steatosi epatica semplice, definita da un quantitativo di TG > 5-10% rispetto al peso del fegato, alla NAFLD, che si innesca quando l'accumulo di grassi comincia ad esplicare degli effetti tossici dannosi, alla steatoepatite infiammatoria non alcolica (NASH), che a sua volta può essere associato a fibrosi e a cirrosi, condizioni che predispongono l'organismo allo sviluppo di epatocarcinoma. Precedenti ricerche epidemiologiche hanno dimostrato che circa il 30% dei pazienti con NAFLD evolve allo stadio di NASH e di questi ultimi, il 20% sviluppa cirrosi. Una volta sviluppata, il 30-40% dei pazienti con cirrosi va incontro a morte per complicanze epatiche entro 10 anni (Pan M. H. et al., 2014).

1.2 Patogenesi e progressione del danno epatico

La patogenesi della NAFLD e NASH non è ancora completamente nota, ma negli ultimi anni sono stati fatti diversi progressi sulla comprensione dei meccanismi che determinano la progressione dalla steatosi verso l'infiammazione epatica e la fibrosi (Dowman J.K. et al., 2010).

Lo studio dello stato metabolico di pazienti affetti da NAFLD ha portato alla formulazione, nel 1998, della teoria dei due colpi (*two-hit hypothesis*), per spiegarne l'insorgenza e la patogenesi. Tale teoria presuppone l'esistenza di due eventi dannosi consecutivi, responsabili della progressione del danno epatico. Il primo evento è rappresentato dall'accumulo di trigliceridi nel fegato (steatosi), dovuto ad una serie di condizioni: l'eccessivo introito alimentare, l'aumentata sintesi di TG, l'eccessivo influsso di acidi grassi nel fegato in seguito a lipolisi del tessuto adiposo, la ridotta esportazione dei lipidi dal fegato sotto forma di VLDL o la diminuita ossidazione degli acidi grassi. Alla degenerazione grassa del fegato deve far seguito un ulteriore insulto, di tipo ossidativo (secondo colpo), in grado di attivare una consistente perossidazione lipidica che generi ROS ed aldeidi tossiche (es. malondialdeide ed idrossinonenale) in grado di innescare vari processi, inclusa la trascrizione di NF- κ B (regolatore dei geni dell'infiammazione), portando, in definitiva, a necroinfiammazione e fibrosi (Day C.P. and James O.F., 1998). Negli ultimi anni è emerso il ruolo che gli acidi grassi liberi svolgono nella promozione diretta del danno epatico, anche in assenza di un secondo colpo, portando ad una rivalutazione della teoria sopra citata. Esiste una chiara evidenza che gli acidi grassi liberi possano direttamente esercitare un'azione tossica, aumentando lo stress ossidativo e attivando la via infiammatoria. In presenza di obesità ed insulino-resistenza aumenta l'influsso di acidi grassi liberi verso il fegato. Questi ultimi possono andare incontro a β -ossidazione o ad esterificazione con glicerolo per formare trigliceridi, che se non vengono sufficientemente estrusi come VLDL ed immagazzinati negli adipociti, causano accumulo di grasso nel fegato. Pertanto, un limitato accumulo di trigliceridi epatici può essere visto come un meccanismo protettivo che previene dagli effetti tossici esercitati dagli acidi grassi liberi non esterificati (Dowman J.K. et al., 2010). La teoria iniziale dei due colpi è andata incontro ad una serie di cambiamenti, diventando nota come ipotesi dei colpi multipli (*multi-hit hypothesis*) tra i quali si annoverano obesità, insulino-resistenza, stress ossidativo e processi proinfiammatori (Pan M. H. et al., 2014).

In un fegato sano la morte cellulare stimola la replicazione degli epatociti maturi, che vanno a rimpiazzare le cellule morte e a ricostituire le normali funzioni tissutali. D'altra parte, nel fegato di pazienti con NAFLD, lo stress ossidativo inibisce la replicazione degli epatociti maturi (mediante

attivazione di inibitori del ciclo cellulare da parte del perossido di idrogeno), determinando un'espansione compensatoria delle cellule progenitrici epatiche (*oval cells*). Queste possono poi differenziare in cellule intermedie, simili agli epatociti (*hepatocyte-like*), per favorire la rigenerazione del fegato danneggiato. Entrambi questi tipi cellulari risultano fortemente correlati con lo stadio di fibrosi, e sembra che siano associati anche all'insorgenza dell'epatocarcinoma (Roskams T. et al., 2003). Quindi, in caso di danno epatico cronico, lo sviluppo di fibrosi o cirrosi dipende dalle capacità rigenerative degli epatociti. Pertanto, l'alterata proliferazione dei progenitori epatici rappresenta il terzo colpo proposto in altri modelli per spiegare la patogenesi della NAFLD (Dowman J.K. et al., 2010).

- **Accumulo di lipidi e steatosi**

Il fegato è uno dei principali regolatori lipidici dell'organismo. La NAFLD è caratterizzata dall'accumulo di TG, prodotti per esterificazione di acidi grassi liberi e glicerolo all'interno degli epatociti. Gli acidi grassi epatici, impiegati per la sintesi dei TG, derivano dalla dieta, dalla lipolisi del tessuto adiposo o dalla lipogenesi *de novo* in presenza di glucosio in eccesso (Hassan K. et al., 2014).

Dieta – Gli acidi grassi assunti con la dieta vengono assorbiti dal piccolo intestino, assemblati in particelle ricche di lipoproteine (chilomicroni) e secreti nel sangue e nella linfa. Gran parte dei chilomicroni viene recapitata al tessuto adiposo, mentre la restante parte raggiunge il fegato.

Lipogenesi de novo – La lipogenesi epatica è regolata principalmente dall'insulina, secreta dal pancreas, in seguito ad un pasto ricco di zuccheri. I fattori trascrizionali SREBP-1c (*sterol regulatory element binding protein – 1c*) e ChREBP (*carbohydrate-responsive element-binding protein*) controllano i geni chiave della lipogenesi garantendo la conversione dell'acetil-CoA in acidi grassi (Nassir F. and Ibdah J.A., 2014). Nei pazienti con NAFLD è frequente ritrovare una sovraespressione dei geni coinvolti nella sintesi *de novo* degli acidi grassi, acetil-CoA carbossilasi 1 e 2 (ACC1, ACC2) ed acido grasso sintasi (FAS). Da analisi di mappatura dei promotori è emerso che le sequenze di tali geni contengono elementi di regolazione in cis (ChoRE e SRE) riconosciuti da ChREBP e SREBP-1c, il primo attivato in presenza di glucosio ed il secondo di insulina. SREBP-1c è un'isoforma esclusiva del fegato che viene regolata positivamente, oltre che dall'insulina, anche dal recettore nucleare LXR α (i ligandi di questo recettore sono gli ossidi del colesterolo), che insieme ad RXR, formando un eterodimero, riconosce ed attiva la sequenza del promotore in cis di

SREBP-1c. Nel caso specifico della NAFLD, l'induzione della lipogenesi è dovuta a SREBP-1c e non a ChREBP (Higuchi N. et al., 2008).

Gli acidi grassi negli epatociti vengono metabolizzati da due vie distinte: l'ossidazione per generare ATP (es. β -ossidazione nel mitocondrio) e l'esterificazione per produrre TG. Questi ultimi si associano a proteine epatiche (tra cui apoB) per formare lipoproteine ed essere esportati nel plasma come particelle VLDL (*very low density lipoprotein*), oppure si accumulano nell'epatocita sotto forma di goccioline lipidiche. L'alterazione di una delle suddette vie può portare alla steatosi epatica (Kohjima M. et al., 2007).

Uno studio ha evidenziato, tramite la tecnica dell'isotopo stabile multiplo, la relativa sede di provenienza dei trigliceridi epatici in pazienti affetti da NAFLD. Ne è derivato che il 59% provenisse dalla lipolisi, il 26% dalla lipogenesi *de novo* e soltanto il 15% dalla dieta (Tamura S. et al., 2005).

Considerato il ruolo dannoso degli acidi grassi liberi, la loro conversione in trigliceridi può rappresentare un meccanismo di protezione contro la tossicità epatica.

Gli acidi grassi liberi e i loro metaboliti causano lipotossicità: destabilizzano lisosomi e mitocondri, inattivano i recettori di segnalazione e provocano stress del reticolo endoplasmatico.

Insulino-resistenza e steatosi

La via di segnalazione dell'insulina è essenziale per il metabolismo lipidico e glucidico in vari organi e tessuti e regola l'omeostasi del glucosio ematico. L'insulina agisce attraverso specifici recettori presenti sulla membrana plasmatica delle cellule. In condizioni fisiologiche, in seguito ad un pasto, le cellule β -pancreatiche secernono insulina in risposta agli aumentati livelli ematici di glucosio. Il legame dell'insulina al suo recettore avvia una serie di reazioni a cascata e attiva diverse proteine bersaglio (Figura1).

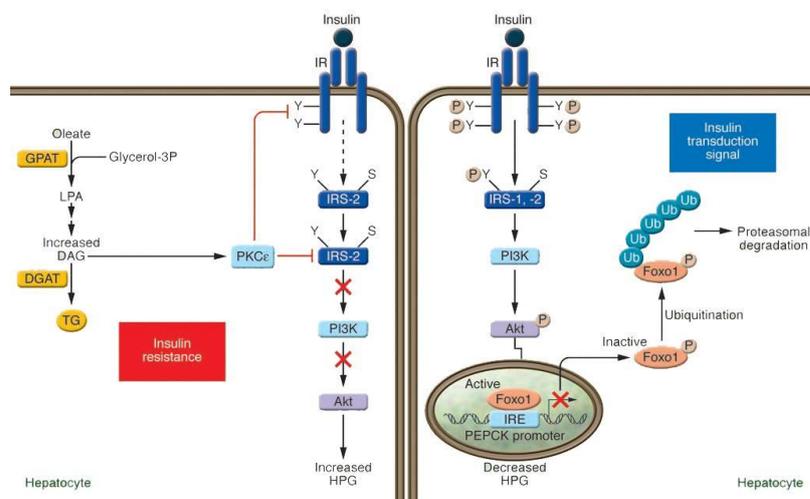


FIGURA 1. REGOLAZIONE DI FOXO DA PARTE DELL'INSULINA
POSTIC C. AND GIRARD J., 2008

L'insulina è anche responsabile della lipogenesi *de novo* nel fegato, come già detto in precedenza. Ulteriore funzione ascrivibile all'insulina è l'inibizione della lipolisi nel tessuto adiposo. I fattori che principalmente concorrono alla resistenza insulinica sono: l'aumentato apporto di FFAs (*free fatty acids*), l'iperglicemia che media la produzione di radicali liberi (glicotossicità) e le citochine infiammatorie secrete dagli adipociti (Berg A.H. et al., 2005).

In caso di IR, la mancata risposta del tessuto adiposo all'insulina, porta all'attivazione della lipolisi con un aumentato rilascio di acidi grassi liberi dal tessuto adiposo che, tramite arteria epatica e vena portale, vengono poi indirizzati al fegato, aumentando così l'influsso di acidi grassi epatici. Questa maggiore disponibilità di FFAs nel tessuto epatico potrebbe essere ulteriore causa di IR. Gli acidi grassi liberi e le adipochine pro-infiammatorie, come IL-6 e TNF- α , prodotte dal tessuto adiposo in presenza di un segnale dell'insulina danneggiato, portano ad inattivazione o degradazione di IRS. L'iper-insulinemia, indotta da alti valori di glucosio nel sangue (in presenza di IR), causa attivazione di SREBP-1c, promuovendo la lipogenesi epatica *de novo* (tramite le vie malonil-CoA ed acetil-CoA) ed inibendo l'ossidazione degli acidi grassi liberi mediante sovrapproduzione di *malonil-CoA*, inibitore primario di CPT1a (Pan M. H. et al., 2014).

Molti fattori caratteristici della NAFLD interferiscono con la cascata di segnalazione dell'insulina, inducendo IR. Tra questi fattori si annoverano gli acidi grassi liberi, TNF- α (*Tumor Necrosis Factor-Alpha*), NF-kB (*Nuclear Factor Kappa B*), ceramide, JNK1 (*Jun N-terminal Kinase 1*), SOCS (*Suppressors Of Cytokine Signaling*) e CYP2E1.

1.3 Progressione del danno epatico e sviluppo di steatoepatite non alcolica (NASH)

La steatosi epatica, nella sua forma più lieve, può essere reversibile e non progressiva se si eliminano le cause che la determinano (obesità e diabete). Pertanto la progressione della NAFLD in steatoepatite, sia essa associata al consumo eccessivo di alcol (ASH) che non (NASH), è determinata dalla persistenza di suddette cause. NASH ed ASH sono indistinguibili da un punto di vista istologico. Entrambe le forme di steatoepatite, in aggiunta alla steatosi macrovescicolare, presentano proprietà necroinfiammatorie: epatociti rigonfi, cellule in apoptosi, presenza di corpi di Mallory (inclusioni citoplasmatiche costituite da proteine fibrillari), mitocondri ingrossati, infiltrazione di cellule infiammatorie e cellule macrofagiche. L'entità della risposta infiammatoria è variabile e non sempre correla con il grado di steatosi. La risposta infiammatoria lobulare è caratterizzata da linfociti sparsi e leucociti polimorfonucleati insieme a lipogranulomi di varie dimensioni distribuiti casualmente (Reddy J.K. and Rao M. S., 2006).

- **Citochine infiammatorie**

Le citochine sono prodotte da buona parte delle cellule epatiche ed hanno un ruolo cruciale per la funzionalità e rigenerazione del fegato. Esse sono i principali mediatori di infiammazione, morte cellulare, fibrosi e rigenerazione epatica in seguito a danno. Molti di questi fattori sono in grado di regolare funzioni molto diverse che includono infiammazione e processi immunitari e metabolici, come l'IR. La produzione di citochine viene indotta dalle cellule stellate epatiche e dalle cellule di *Kupffer* in risposta all'accumulo di lipidi epatici, portando all'infiammazione portale, ad una lieve condizione di necrosi o apoptosi e ad eventuale fibrosi (Giby V. G. and Ajith T. A., 2014).

- **Stress ossidativo e disfunzione mitocondriale**

Un potenziale meccanismo biochimico responsabile della NASH è rappresentato dallo stress ossidativo, dovuto allo sbilanciamento tra le specie chimiche ossidanti e quelle antiossidanti, con conseguente alterazione delle biomolecole: lipidi, proteine, carboidrati e DNA (Robertson G. et al., 2001). Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) possono derivare da diverse sorgenti, endogene ed esogene. Tra quelle endogene si annoverano i vari organelli cellulari: mitocondri, perossisomi e reticolo endoplasmatico, in cui il consumo di ossigeno è elevato (Phaniendra A. et al., 2015). La principale alterazione mediata dalle specie reattive dell'ossigeno nella NASH è rappresentata dalla perossidazione lipidica, che è responsabile delle caratteristiche istologiche già descritte in precedenza (Mansouri A. et al., 2001). Gli FFA inducono l'espressione delle monossigenasi microsomiali CYP4A e CYP2E1, responsabili della produzione di ROS mediante disaccoppiamento del ciclo ossidativo (Robertson G. et al., 2001). Il CYP2E1 è inibito dall'insulina, quindi i suoi livelli di espressione sono più elevati in caso di resistenza insulinica periferica (Weltman M. D. et al., 1998).

- **Meccanismi di ossidazione degli acidi grassi e steatosi**

L'eccessivo accumulo di lipidi nel fegato è anche causa di uno squilibrio del processo di ossidazione degli acidi grassi. Tale processo è di norma proporzionale alle concentrazioni di acidi grassi rilasciate dal tessuto adiposo, in seguito allo stimolo fornito dal glucagone. L'ossidazione ha luogo nei tre principali organelli subcellulari dell'organismo: il mitocondrio ed i perossisomi, che svolgono β -ossidazione ed il reticolo endoplasmatico che attua l' ω -ossidazione, catalizzata dal CYP4A. Alcuni degli enzimi chiave di questi tre sistemi di ossidazione sono regolati dall'azione di PPAR α (Hardwick J.P. et al., 2009).

La β -ossidazione mitocondriale è implicata primariamente nell'ossidazione di acidi grassi a catena corta ($< C_8$), media (C_8-C_{12}) e lunga ($C_{12}-C_{20}$). Tale processo porta all'accorciamento graduale degli acidi grassi in unità minori di acetil-CoA, che possono essere condensate per formare corpi chetonici (substrati ossidabili come energia alternativa per i tessuti extraepatici) oppure entrare nel ciclo degli acidi tricarbossilici per subire ulteriore ossidazione in acqua (H_2O) ed anidride carbonica (CO_2). I principali regolatori della β -ossidazione sono CPT1a, responsabile della traslocazione degli acidi grassi dal citosol al mitocondrio, la concentrazione di carnitina ed il substrato malonil-CoA (prodotto dall'attività dell'enzima ACC1 nella via della lipogenesi), che va ad inibire CPT1a. Quest'ultimo viene anche regolato da acidi grassi, unità di Acil-CoA e da diversi altri composti che attivano PPAR α . La prima tappa della β -ossidazione mitocondriale è catalizzata da quattro distinte deidrogenasi, specifiche per la lunghezza delle catene di acidi grassi (Es. acil-CoA a lunga catena deidrogenasi, LCAD ed HADH α). La seconda, la terza e la quarta tappa sono catalizzate da un'unica proteina mitocondriale trifunzionale (MTP), che catalizza tre differenti reazioni enzimatiche (2-enoil-CoA idratasi, 3-idrossiacil-CoA deidrogenasi e 3-chetoacil-CoA tiolasi). La β -ossidazione che ha luogo nei perossisomi è specifica per gli acidi grassi a catena lunga ($>C_{20}$) che subiscono un processo di accorciamento per poi essere indirizzati al mitocondrio, dove completeranno il processo di ossidazione, che altrimenti non avrebbe potuto aver luogo. Gli acidi bicarbossilici a lunga catena (altamente tossici per il mitocondrio), generati dall' ω -ossidazione microsomiale, vengono metabolizzati dal sistema di β -ossidazione perossisomiale. Sebbene l' ω -ossidazione sia la via di metabolizzazione di minore importanza, in condizioni di sovraccarico di acidi grassi, come obesità o diabete, si viene a formare un'ingente quantità di acidi bicarbossilici, inducendo una maggiore attivazione di tale via metabolica. Oltre a fungere da substrati per il sistema di β -ossidazione perossisomiale, gli acidi bicarbossilici fungono anche da ligandi per PPAR α , inducendo i tre sistemi di ossidazione degli acidi grassi, inclusi i geni della famiglia CYP4A e l'isoforma CYP2E1 nel fegato.

In pazienti con NAFLD l'espressione di CPT1a è ridotta del 50% , mentre gli enzimi LCAD ed HADH α risultano maggiormente espressi. Un importante enzima implicato nella regolazione mitocondriale dei ROS è UCP2 (*Uncoupling protein 2*), che media la perdita di protoni lungo la membrana interna e disaccoppia l'energia di ossidazione dalla sintesi di ATP. I livelli di tale enzima risultano più elevati in pazienti con NAFLD (Reddy J. K and Rao M. S., 2006; Kohjima M. et al., 2007).

- **Funzioni dei PPARs nel metabolismo lipidico**

I PPARs appartengono alla sottofamiglia dei recettori nucleari degli steroli e dei retinoidi ed agiscono sia da trans-attivatori che da trans-repressori. Si conoscono tre varianti di PPARs: PPAR α , PPAR γ , PPAR β/δ . PPAR- α è espresso in fegato, reni, cuore, muscoli, tessuto adiposo e altri organi. PPAR β è espresso in molti tessuti, ma principalmente nel tessuto adiposo e nella pelle. Infine, PPAR γ ($\gamma 2$ e $\gamma 3$) è espresso principalmente nel tessuto adiposo. Quest'ultimo è attivato dagli acidi grassi e dai suoi derivati e riveste un ruolo nella sensibilità all'insulina, nell'adipogenesi ed in altre funzioni. Il mantenimento dell'equilibrio tra ossidazione e sintesi degli acidi grassi viene garantito dall'azione coordinata di PPAR α e PPAR γ (Figura 2). PPAR α funziona come sensore lipidico nel fegato, e risponde all'influsso di acidi grassi regolando l'espressione dei geni coinvolti nei tre sistemi di ossidazione degli acidi grassi.

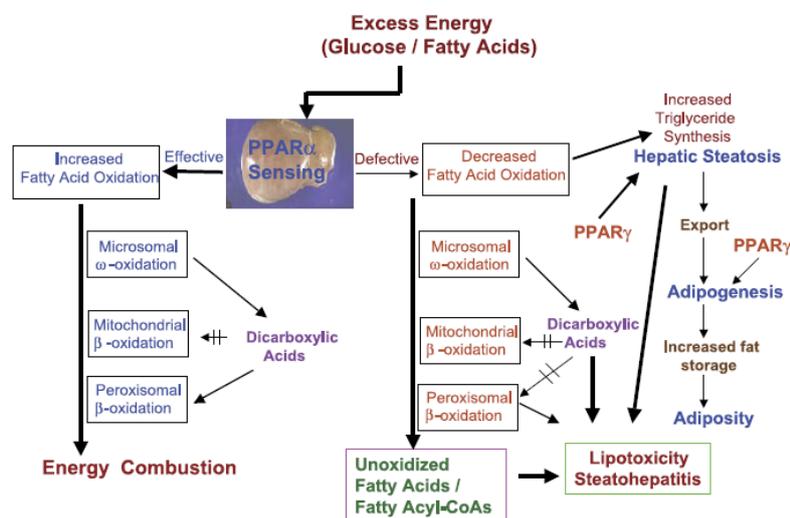


Figura 2. Cross-talk tra i sistemi di ossidazione degli acidi grassi e PPAR α nel metabolismo energetico epatico.

- **Stress del reticolo endoplasmatico**

Il reticolo endoplasmatico è l'organello nel quale le proteine secretorie e quelle di membrana raggiungono il corretto *fold*ing, grazie alla presenza degli *chaperones*. Fattori come stress (mancanza di nutrienti, infezioni virali), incremento della sintesi di proteine non ripiegate correttamente, provocano una risposta cellulare nota come stress del reticolo endoplasmatico, che promuove l'attivazione di vari fattori di trascrizione e chinasi, e che è coinvolto nella patogenesi della NASH (Ron D., 2002). I fattori di trascrizione che vengono attivati portano ad un

aumento della sintesi lipidica (attraverso la via di SREBP) e alla trascrizione di geni proapoptotici. L'attivazione delle chinasi del RE (IRE1 α , PERK) comporta a sua volta l'induzione delle chinasi da stress, come JNK1, che possono contribuire all'induzione di fenomeni apoptotici.

Capitolo 2

MODELLO SPERIMENTALE DI NAFLD NEL RATTO

2.1 Induzione di NAFLD con dieta iperlipidica e streptozotocina (STZ)

Lo sviluppo di appropriati modelli animali di NAFLD è ritenuto fondamentale sia per la comprensione dei meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza e della progressione della patologia, che per testare nuove potenziali terapie. Un modello ideale di NAFLD è quello che riflette fedelmente tutti gli aspetti clinici, istologici, eziologici e patologici della malattia nell'uomo, inclusi i singoli stadi che la contraddistinguono. I modelli animali ad oggi utilizzati non riproducono perfettamente tutti gli aspetti della patologia, ma soltanto alcune principali caratteristiche. Gli animali impiegati per lo studio della NAFLD sono principalmente topi e ratti, essendo modelli riproducibili, affidabili, semplici ed economicamente reperibili. I modelli più ampiamente utilizzati sono quelli nutrizionali che possono prevedere l'impiego di una dieta iperlipidica (High Fat Diet, HFD), con distinte modalità di somministrazione, di una dieta priva di metionina e colina (Methionin and Cholin Deficient Diet, MCDD), di una dieta ricca di colesterolo o di una ad alto contenuto di saccarosio e fruttosio. Lo sviluppo della steatosi epatica è comune a tutti i modelli sopra citati, alcuni mostrano anche caratteristiche istologiche di steatoepatite e soltanto una piccola minoranza progredisce nello stadio di fibrosi. Esistono anche modelli genetici di NAFLD che però risultano meno disponibili e più costosi. Per quanto gli animali possano riprodurre al meglio la patogenesi della malattia, bisogna tener conto di alcuni limiti che ostacolano l'interpretazione dei dati sperimentali, tra cui l'omogeneità della popolazione animale, frutto di un'accurata selezione in base specifici parametri, rispetto alla vasta eterogeneità della popolazione umana, legata al *background* genetico individuale, alla composizione della dieta, ai farmaci assunti, all'attività fisica e più in generale allo stile di vita. Un ulteriore limite all'interpretazione dei dati è posto dalla presenza di caratteristiche proprie dei roditori nello sviluppo della NAFLD e della sindrome metabolica, che invece risultano differenti nell'uomo. Ciò implica che ad ogni risultato

riscontrato nel modello animale dovrà necessariamente seguire una corrispondente verifica clinica sull'uomo (Kucera O. et al., 2014).

Un altro modello è quello che vede la combinazione di una dieta HFD con un trattamento che induce il diabete di tipo 2 mediante iniezione intraperitoneale (i.p.) di STZ (HFD/STZ). Questo nuovo modello di NAFLD è stato introdotto all'inizio del nuovo millennio da Reed et al. (2000) al fine di sviluppare, in tempi ridotti, un modello di ratto che fosse in grado di simulare la naturale progressione patologica del diabete, dallo stato prediabetico e/o di insulino-resistenza (IR) al diabete di tipo 2 conclamato. Lo stato prediabetico viene ottenuto tramite l'alimentazione iperlipidica, che induce l'IR, mentre lo stadio successivo della patologia viene ottenuto tramite induzione apoptotica di una parte delle cellule β -pancreatiche da parte della STZ (Reed et al., 2000). È noto da tempo che il diabete di tipo 2 sia strettamente correlato alla NAFLD e, pur non conoscendo la relazione temporale ed eziologica tra di esse, è evidente che le due condizioni si alimentino a vicenda (Figura 3). Pertanto, si ritiene che l'induzione del diabete di tipo 2 in un modello animale di NAFLD possa riprodurre un quadro patologico meglio confrontabile con quello umano (Larter C. Z. et al., 2010).

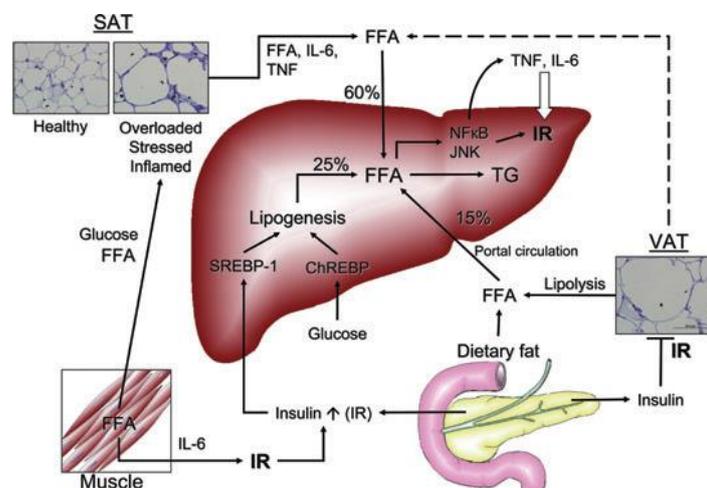


FIGURA 3. INTERAZIONE TRA STEATOSI ED INSULINO-RESISTENZA
LARTER C. Z. ET AL., 2010.

Sono svariate le modalità tramite cui vengono prodotti modelli animali di diabete mellito; l'approccio per la generazione del modello può essere di tipo genetico o chimico e può essere specifico per T1DM (*Type 1 Diabetes Mellitus*) o per T2DM (*Type 2 Diabetes Mellitus*). Tra gli approcci chimici, il più utilizzato è il trattamento con streptozotocina (STZ), un agente tossico per le cellule β -pancreatiche. Trattando l'animale con una dose più o meno elevata è possibile indurre

apoptosi completa o parziale della popolazione di cellule β , provocando rispettivamente diabete di tipo 1 o di tipo 2 (Qinna N.A. and Badwan A.A., 2015). Nel 2009 sono stati definiti gli effetti della sola dieta iperlipidica sulla steatosi epatica nei ratti: tale regime alimentare ha comportato una steatosi microvescicolare uniforme associata a foci periportalici di steatosi macrovescicolare, nessuna evidenza di infiltrazioni di cellule infiammatorie o deposizioni di collagene, ma è risultato significativo l'aumento dei parametri epatici relativi a trigliceridi, colesterolo ed idrossinonenale (HNE). Nessuna differenza rispetto ai controlli è stata osservata per quanto riguarda malondialdeide (MDA), eme-ossigenasi (HO-1), stress del reticolo endoplasmatico ed apoptosi (Ahmed U. et al., 2009). Tuttavia, il solo trattamento con dieta iperlipidica è in grado di riprodurre lo stato prediabete caratterizzato da presenza di insulino-resistenza e successiva produzione di alti livelli di insulina (iperinsulinemia compensatoria). A tal proposito, Reed et al. (2000) hanno confrontato le principali caratteristiche basali (peso, glucosio, insulina, acidi grassi e trigliceridi) degli animali alimentati con dieta ricca di grassi, prima e dopo il trattamento con STZ. Dai risultati è emerso che in presenza di STZ il glucosio restava invariato rispetto al controllo, a causa degli alti livelli di insulina (indice di IR). Tuttavia, il trattamento con STZ, dopo due settimane, ha causato negli stessi ratti una deplezione dell'insulina (equiparabile al valore di controllo), rispetto a quella registrata prima dell'iniezione con STZ. Il glucosio ematico risultava invece significativamente aumentato rispetto ai ratti di controllo. Tali risultati dimostrano che per riprodurre l'intero quadro patologico del diabete di tipo 2 umano nel ratto è fondamentale la combinazione delle seguenti condizioni: la dieta ricca di grassi induce lo stato prediabete di insulino-resistenza in cui le cellule β -pancreatiche sono al massimo della loro funzionalità secretoria, mentre la successiva iniezione con STZ riproduce la naturale disfunzione e la conseguente morte di quelle stesse cellule β -pancreatiche in precedenza iperattive (Reed M.J. et al., 2000).

- **Effetti della streptozotocina su cellule β -pancreatiche di ratto**

La streptozotocina (STZ, 2-deossi-2-3-metil-3-nitrosoureido-D-glucopiranosio) è una delle principali sostanze utilizzate per indurre nel ratto entrambe le forme di diabete mellito, insulino-dipendente (IDDM) e non insulino-dipendente (NIDDM). La STZ è un derivato della nitrosurea isolato dal fungo *Streptomyces achromogenes* capace di distruggere selettivamente le cellule β -pancreatiche. Viene generalmente utilizzata a differenti dosaggi a seconda che si voglia indurre la forma IDDM o NIDDM di diabete mellito. L'induzione dell'IDDM può essere ottenuta per somministrazione di una

singola e consistente dose di STZ (60-75 mg/Kg), oppure per somministrazione di più dosaggi minori (es. 40 mg/Kg per cinque giorni consecutivi). Tali dosaggi comportano una marcata distruzione delle cellule β -pancreatiche a cui segue un consistente deficit di insulina. Una dose di STZ corrispondente a 35 mg/Kg produce iperglicemia e ridotti livelli plasmatici di insulina a causa della morte di alcune delle cellule β -pancreatiche. È stato osservato che la mancata risposta al glucosio da parte delle cellule β del pancreas rappresenta il primo effetto indotto dalla STZ. Infatti quest'ultima viene captata da tali cellule mediante il trasportatore del glucosio GLUT2 che riconosce specificamente la porzione 2-deossi-D-glucosio presente nella struttura chimica della streptozotocina. Tramite la porzione N-nitrosometilurea, la STZ induce alchilazione del DNA e mediante la stessa porzione rilascia monossido di azoto (NO) che va ad interferire sulla produzione di ATP mitocondriale. Un'altra azione mediata dalla STZ è la diretta inibizione del ciclo di Krebs, che comporta la riduzione del consumo di O_2 da parte del mitocondrio, con conseguente deplezione dell'ATP. L'aumentata defosforilazione dell'ATP fornisce substrati all'enzima xantina ossidasi che a sua volta catalizza reazioni in cui viene generato l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$) da cui derivano le altre specie radicaliche, perossido di idrogeno (H_2O_2) e radicale idrossile (OH^{\cdot}). L'azione dell'NO e delle specie reattive dell'ossigeno può anche contribuire alla frammentazione del DNA. L'NO e i ROS possono agire separatamente o formare la specie altamente tossica perossinitrato (ONOO); Figura 4). Tuttavia l'azione predominante della streptozotocina è rappresentata dalla poli-ADP ribosilazione, che viene indotta dall'alchilazione del DNA. Tale processo porta alla deplezione di NAD^+ e all'ulteriore riduzione dell'ATP con conseguente inibizione della sintesi e della secrezione di insulina. A tal proposito è stato dimostrato che l'inibizione della poli-ADP ribosilazione previene l'iperglicemia ed il danno indotto sulle cellule β -pancreatiche dalla STZ (Szkudelski T., 2001; Srinivasan K. et al, 2005).

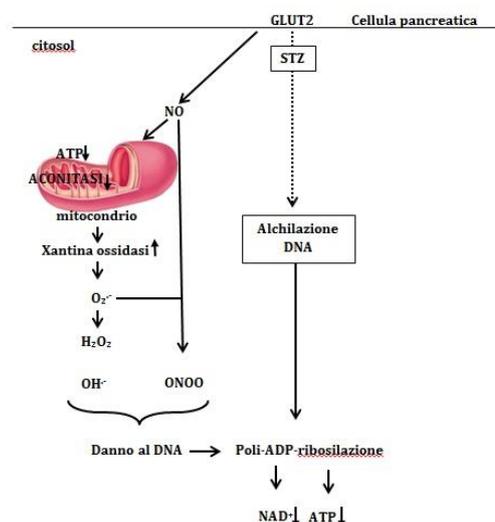


Figura 4. Modello del meccanismo di azione della streptozotocina. Modificato da Szkudelski T., 2001.

Capitolo 3

ENZIMI DEL *DRUG METABOLISM*

3.1 Generalità

Gli organismi viventi sono continuamente esposti all'azione di molte sostanze chimiche, caratterizzate da un'estrema varietà strutturale (Ioannides, 2006). Tali composti, detti xenobiotici, sono dotati di proprietà lipofile sufficienti a permetterne il passaggio di barriere anatomiche e membrane cellulari e il conseguente raggiungimento di plasma e tessuti. Nel corso dell'evoluzione, al fine di facilitare l'eliminazione di questi composti potenzialmente dannosi, si è sviluppato un sistema di reazioni metaboliche di biotrasformazione che tramuta gli xenobiotici in composti maggiormente polari, e quindi più facilmente smaltibili da parte dell'organismo. Si è quindi sviluppata una serie di enzimi implicati nella biotrasformazione (o metabolismo degli xenobiotici o *drug metabolism*) che svolgono un ruolo di primaria importanza nel favorire la detossificazione o l'eliminazione di sostanze potenzialmente pericolose. Tali sistemi enzimatici risiedono nel reticolo endoplasmatico e nella frazione citosolica di molti tessuti quali reni, polmoni, intestino e cute, ma sono principalmente abbondanti nel fegato, dove confluisce la maggior parte della circolazione sanguigna derivante dal tratto gastrointestinale, il principale punto di ingresso per le sostanze esogene (Raunio H. et al., 2015). Le reazioni di biotrasformazione che possono riguardare tali sostanze liposolubili si suddividono in tre classi: 1. *Reazioni di fase I o di funzionalizzazione* che comprendono principalmente reazioni di ossidazione, riduzione, idrolisi, 2. *Reazioni di fase II* che comprendono reazioni di coniugazione con sostanze endogene polari, 3. *Reazioni di fase III* che sono realizzate da un gruppo di enzimi il cui ruolo è quello di trasportare i composti coniugati al di fuori della cellula (Zimmiak et al., 1993).

3.2 Fase I: sistema citocromo P450 e DT-diaforasi

- **Citocromo P450**

Un gran numero di sistemi enzimatici è coinvolto nelle reazioni di fase I, ma il principale è quello delle monossigenasi a funzione mista, che a sua volta comprende il sistema multienzimatico del citocromo P450 (CYP), che ha un ruolo determinante nella detossificazione e bioattivazione di sostanze endogene ed esogene.

Negli animali il sistema citocromo P450 è particolarmente abbondante a livello epatico , dove ad oggi sono state identificate più di 200 isoforme diverse che, pur appartenendo ad un'unica superfamiglia genica, differiscono per alcune caratteristiche quali struttura primaria, peso molecolare, proprietà spettrali, specificità di substrato, chimica e stechiometrica dei prodotti. Queste isoforme possono essere espresse costitutivamente o essere indotte da varie molecole naturali o di sintesi; possono essere specie-specifiche, sesso-specifiche o tessuto specifiche e possono anche essere sovraespresse in condizioni fisiologiche o patologiche (es. digiuno o diabete). Ulteriori differenze si notano nella regolazione della loro espressione, che può avvenire a vari livelli: per modulazione trascrizionale o traduzionale, a livello post-trascrizionale o post-traduzionale, per processi di stabilizzazione dell'mRNA (es. CYP1B1) o della stessa proteina (es. CYP2E1) (Totah R.A., 2013; Waxman D.J. and Holloway M.G., 2009).

I diversi isoenzimi del P450 catalizzano reazioni di ossidazione in cui un atomo di una molecola di ossigeno viene inserito nel substrato, ossidandolo, mentre l'altro viene ridotto ad acqua, come schematizzato nella formula seguente, in cui RH è il substrato (endogeno o esogeno) ed ROH è il corrispondente metabolita idrossilato (Figura 5).



In particolare, l'atomo di ferro (Fe^{3+}) del gruppo eme funziona da accettore di elettroni nelle reazioni di ossidazione, mentre l'apoproteina è responsabile della diversa affinità di legame e specificità di substrato dei diversi isoenzimi (Yan Z. and Caldwell G.W., 2001).

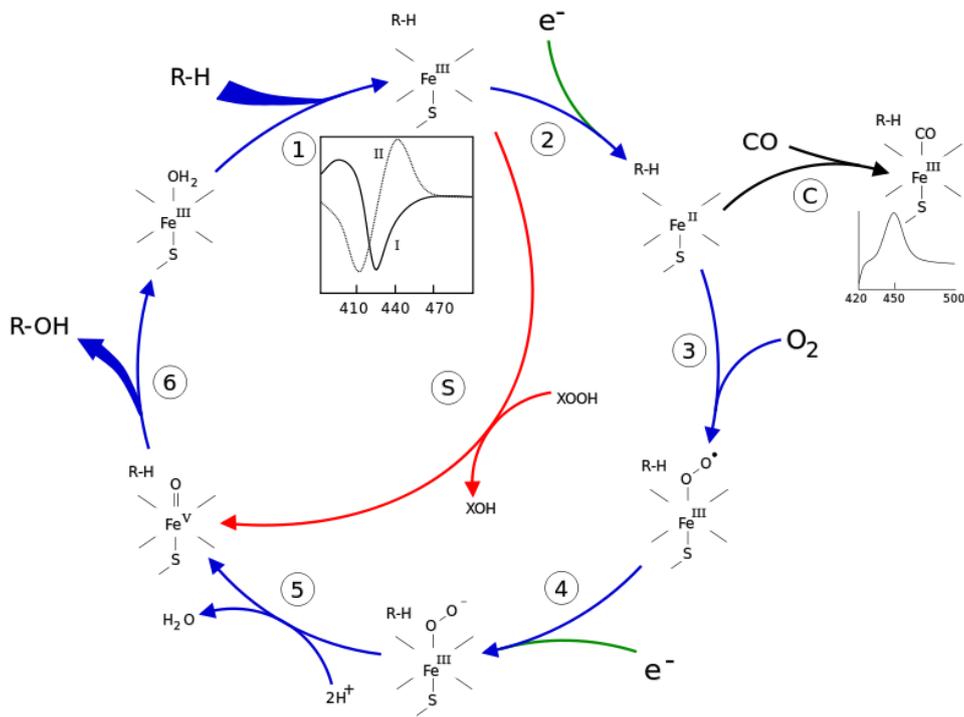


Figura 5. Ciclo catalitico del CYP.
<http://it.wikipedia.org>

- **Regolazione del citocromo P450 nei mammiferi**

Le isoforme P450 possono essere regolate a 3 livelli: trascrizionale, traduzionale e post-traduzionale. Il meccanismo di regolazione trascrizionale consiste in una modulazione della velocità di trascrizione del gene codificante per l'isoforma P450, con conseguente aumento o diminuzione di mRNA di tale gene. Un aumento dell'mRNA si verifica anche in seguito ad una stabilizzazione di quest'ultimo tramite un meccanismo post-trascrizionale. Ci sono meccanismi di regolazione post-trascrizionale che influenzano soltanto l'espressione della proteina senza alterare quelli dell'mRNA come quando si verifica un aumento della traduzione dell'mRNA o una stabilizzazione della proteina. Le isoforme di citocromo P450 più studiate, anche dal punto di vista della regolazione, sono quelle appartenenti alle prime quattro famiglie, responsabili del metabolismo degli xenobiotici. Alcuni di questi CYP evidenziano complessi profili di espressione, che possono dipendere da diversi fattori, quali tessuto, sesso, grado di sviluppo e stato fisiopatologico. La regolazione trascrizionale dei geni codificanti per i CYP appartenenti alle prime quattro famiglie è sottoposta a regolazione da xenobiotici, in genere mediante recettori: Il recettore degli idrocarburi arilici (AhR), il recettore costitutivamente attivo (CAR), il recettore del pregnano X (PXR) ed il recettore attivato dai proliferatori dei perossisomi (PPAR α). Suddetti recettori, ad eccezione dell'ultimo, vengono denominati "orfani" in quanto non sono stati definiti

con certezza i loro specifici ligandi endogeni. Questi ultimi presentano una struttura di base comune costituita da più domini aventi funzioni diverse nello stesso recettore (Figura 8) (Handishin C. and Meyer U. A., 2003; Banerjee M. et al., 2015).

I recettori, oltre ad interagire con il ligando e con altri recettori per formare eterodimeri, sono in grado di interagire con diversi co-regolatori, che modulano l'espressione genica interagendo direttamente con il recettore (Pascussi J. M. et al., 2004).

- **DT-diaforasi o NAD(P)H-chinone ossidoreduttasi 1 (NQO1)**

La DT-diaforasi, come il citocromo P450, fa parte degli enzimi di fase I. Per quanto riguarda l'attività catalitica, la DT-diaforasi è in grado di ridurre i chinoni ad idrossichinoni attraverso un processo NAD(P)H dipendente (Ross D. et al., 1994), e per tale motivo viene anche denominata NAD(P)H-chinone ossidoreduttasi (NQO). La NQO1 è un enzima modulabile da induttori del recettore nucleare AhR: infatti la sua *up*-regolazione è indotta da sostanze quali 3-metilcolantrene ed antiossidanti come il 3-tert-butil-4-idrossinisolo (BHA). Tale modulazione è tessuto-specifica, sesso-specifica e specie-specifica.

3.3 Fase II: enzimi detossificanti e antiossidanti

Gli organismi sono continuamente esposti ad agenti proossidanti (specie radicaliche) e non, sia di origine esogena che endogena, capaci di ossidare le macromolecole biologiche. Gli agenti proossidanti più comuni per le cellule sono le specie reattive dell'ossigeno (ROS) che si possono originare, ad esempio, per disaccoppiamento delle catene di trasporto degli elettroni (Lee W.L. et al., 2013).

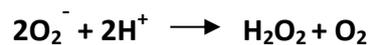
- **Catalasi (CAT)**

La catalasi è un tetramero di 25 KDa. Ciascuna delle 4 subunità contiene un gruppo eminico con ferro trivalente, a livello del quale avviene l'interazione col perossido di idrogeno. Questo enzima catalizza la decomposizione del perossido di idrogeno in ossigeno molecolare ed acqua ed è, insieme alla superossido dismutasi, uno degli enzimi con la maggiore velocità di conversione del substrato (ogni molecola di CAT può decomporre milioni di molecole di perossido di idrogeno al

secondo). Questo enzima è presente ad alti livelli nei perossisomi ed è espresso in maniera ubiquitaria in tutti gli organi, ma il contenuto più rilevante è nel fegato (Góth L. et al., 1987).

- **Superossido dismutasi (SOD)**

Le superossido dismutasi costituiscono una famiglia di enzimi che catalizzano la dismutazione di due molecole di anione superossido per formare perossido di idrogeno ed ossigeno molecolare e rappresentano quindi la prima linea di difesa nei confronti di questo radicale.



L'anione superossido tende ad andare incontro ad una dismutazione spontanea, che però avviene ad una velocità molto bassa e di per sé porterebbe alla formazione di ossigeno molecolare allo stato di singoletto. La presenza della superossido dismutasi ha dunque un duplice ruolo: rende il processo di dismutazione molto più rapido ed efficiente ed impedisce la formazione della specie reattiva $^1\text{O}_2$, prediligendo la formazione di ossigeno molecolare.

- **Glutatione perossidasi (GPX)**

La glutazione perossidasi è un enzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi in grado di eliminare perossido di idrogeno ed altri perossidi utilizzando il glutatione ridotto. Sono presenti quattro isoforme enzimatiche, ognuna delle quali ha una precisa localizzazione sub-cellulare ed una propria specificità di substrato. La GPx1 è la più abbondante, è presente nel citoplasma, ha come substrato preferenziale il perossido di idrogeno e catalizza la seguente reazione:



La GPx4 è invece più attiva sugli idroperossidi dei lipidi, per cui la reazione può essere schematizzata come segue, intendendo con ROOH un generico idroperossido lipidico:



- **Glutatione reduttasi (GSH-red)**

La glutazione reduttasi è una flavoproteina dimerica di 105 KDa NAD(P)H-dipendente, costituita da due subunità identiche e contiene due molecole di FAD come gruppi prostetici. In ogni subunità è possibile distinguere quattro domini differenti: il sito di legame per il substrato, quello per il

legame per il NAD(P)H, il sito contenente il FAD ed un dominio di interfaccia. La sua attività dipende dalla presenza di un disolfuro presente nel sito attivo, in grado di cambiare il suo stato di ossidazione.

L'attività di tale enzima è fondamentale affinché il glutatione, il più potente antiossidante prodotto nell'organismo, venga portato da uno stato ossidato (inattivo) ad uno ridotto (attivo). La reazione catalizzata è la seguente:



- **Modulazione degli enzimi antiossidanti**

Per quanto riguarda la modulazione degli enzimi antiossidanti, sembra che la dieta iperlipidica comporti una riduzione dell'attività di superossido dismutasi, catalasi e glutatione perossidasi. Da un lavoro di Pan e collaboratori (2006), condotto in ratti sottoposti a dieta iperlipidica, emerge una riduzione significativa dell'attività di SOD e GPX nel fegato dei trattati rispetto ai controlli. Un risultato equiparabile è scaturito da un lavoro di Kanagasabapathy (2013) su topi sottoposti a dieta iperlipidica, nei quali si riscontra una significativa riduzione delle medesime attività enzimatiche in relazione alla dieta (Kanagasabapathy et al., 2013; Pan M.H. et al., 2014).

Lo stress ossidativo è un processo che è coinvolto nel diabete e nelle complicazioni che ne derivano. In presenza di diabete mellito è possibile riscontrare un'inibizione degli enzimi deputati allo *scavenging* delle specie reattive dell'ossigeno, come superossido dismutasi e catalasi (Kanter M. et al., 2004). I dati riportati in letteratura a tal proposito risultano piuttosto discordanti: in alcuni lavori ne viene riportata una diminuzione, mentre in altri un aumento. Tale discordanza potrebbe essere dovuta ad un effetto più complesso dipendente da svariati parametri, comprese le caratteristiche individuali degli animali utilizzati. Per citare alcuni dati: in un lavoro di Kakkar e collaboratori emerge un aumento dell'attività epatica di SOD, CAT e GPx in ratti trattati con STZ (Kakkar R. et al., 1998). Da un altro lavoro, invece, SOD e CAT risultano *down-regolate* (Schmatz R. et al., 2012). Si riscontra una maggiore uniformità dei risultati se analizziamo le stesse attività sul pancreas, dove solitamente si ha una riduzione delle stesse (Kanter M. et al., 2004; Coskun O. et al., 2005).

3.4 Dieta iperlipidica e *drug metabolism*

Secondo diversi studi, il trattamento con dieta iperlipidica influisce sull'attività e sull'espressione di diversi enzimi epatici (Do G. M. et al., 2011; Nishikawa S. et al., 2012). Un eccessivo consumo di lipidi è correlato ad un accumulo di grassi a livello epatico, un aumento della concentrazione di acidi grassi liberi circolanti ed un aumentato rischio di insorgenza di diabete. Nelle varie condizioni può giocare un ruolo rilevante la modulazione degli enzimi del *drug metabolism*, che risulta avere luogo in animali trattati con dieta iperlipidica, sebbene i dati in letteratura non siano numerosi (Abdelmegeed M. A. et al., 2012; Tajima M. et al., 2013; Vornoli A. et al., 2014).

Il citocromo P450 è maggiormente espresso nel fegato ed il CYP3A rappresenta la sottofamiglia più importante di questo organo. Il CYP3A risulta essere modulato da sostanze sia endogene che esogene (Tajima M. et al., 2013) e anche in risposta all'*intake* di acidi grassi (Brunner L.J. and Bai S., 2000). Una prerogativa del trattamento con dieta iperlipidica è l'induzione del CYP2E1 (Lieber C.S. et al., 2004; Abdelmegeed M. A. et al., 2012). L'aumento di tale isoforma sembra essere la causa degli effetti della dieta iperlipidica sul fegato, tra cui il danno ossidativo, la steatosi e la steatoepatite. In particolare, gli acidi grassi promuovono sia la trascrizione che la sintesi del CYP2E1 (Aubert J. et al., 2011) e le condizioni di chetosi indotte dalla dieta iperlipidica sembrano promuovere un'attivazione pre-traduzionale di questa isoforma (Yun Y. P. et al., 1992). L'induzione del CYP2E1 è importante perché questo CYP è coinvolto sia nella produzione di ROS, in particolare di superossido, tramite disaccoppiamento del sistema monossigenasico (Caro A.A. et al., 2004), sia nell'insorgenza dell'insulino-resistenza. Quest'ultimo aspetto è dovuto alla parziale attivazione, da parte del CYP2E1, della chinasi JNK che contribuisce all'inibizione del segnale innescato dall'insulina, mediante fosforilazione dei residui serinici a livello del substrato del recettore (Kathirvel E. et al., 2009). È plausibile che l'attivazione metabolica di alcuni substrati di tale citocromo possa determinare un diretto danneggiamento delle macromolecole cellulari. Sarebbe pertanto ragionevole un intervento terapeutico incentrato sull'inibizione dell'attività del CYP2E1, dal momento che, in alcuni studi, la deprivazione di tale attività enzimatica ha determinato una reversione della condizione patologica. Si pensa che uno dei fattori chiave nella transizione dallo stadio di NAFLD a quello di NASH sia proprio l'aumentata espressione di tale isoforma e lo stress ossidativo ad essa correlato. I ROS prodotti dal CYP2E1 possono indurre perossidazione lipidica degli acidi grassi polinsaturi (PUFA), che a loro volta sono in grado di reagire con le macromolecole dell'organismo, provocando tossicità e morte cellulare. L'espressione del 2E1 è anche indotta dalla

presenza di corpi chetonici derivanti dall'aumentata β -ossidazione nei mitocondri e nei perossisomi dovuta agli acidi grassi epatici. L'implicazione del CYP2E1 nella tossicit  epatica   riportata di seguito (Figura 6).

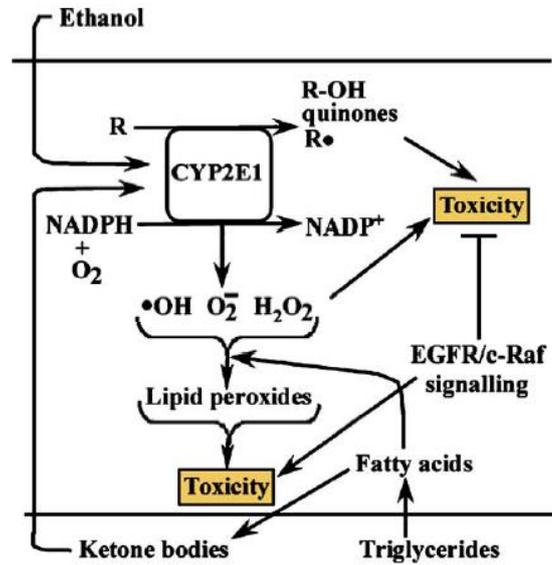


Figura 6. Modello schematico del coinvolgimento di CYP2E1 nella generazione di ROS ed induzione di citotossicit .

Gonzalez F. J., 2004.

3.5 Diabete e drug metabolism

Il diabete mellito è una malattia metabolica molto complessa caratterizzata da iperglicemia e alterazione del metabolismo di lipidi, proteine e carboidrati. Tale patologia esercita la sua influenza sugli enzimi del *drug metabolism*, modulando le attività relative agli enzimi di fase I e detossificanti. Le varie alterazioni sono dovute allo squilibrio ormonale e metabolico che conseguono alla condizione di diabete (nel diabete di tipo 2: carenza di insulina) (Shimojo N., 1994). Una caratteristica dei ratti con diabete indotto da STZ è proprio l'induzione del CYP totale a livello epatico, misurato nei microsomi mediante metodi spettrofotometrici (Reinke L.A. et al., 1978). L'induzione generalizzata del CYP è specificamente dovuta ad alcune isoforme come dimostrato da alcuni lavori, condotti su ratti trattati con STZ, per il CYP3A e il CYP2E1 (Barnett C.R. et al., 1990; Shimojo N. et al., 1994). Inoltre è rilevante un decremento dell'attività del CYP2C11 (Donahue B.S. et al., 1991; Shimojo N. et al., 1994). Gran parte delle informazioni disponibili riguardano l'induzione del CYP2E1, che viene riscontrata anche in ratti modello di diabete spontaneo (Dong Z. et al., 1988). Secondo Shimojo (1994) tale *up*-regolazione sarebbe dovuta all'aumento di chetoni, caratteristico del diabete, in seguito all'osservazione che il solo trattamento con chetoni induce l'attività epatica del 2E1 (Imaoka S. and Funae Y., 1991) e che condizioni di chetosi sono responsabili dell'aumento dell'mRNA di tale isoforma (Yun Y.P. et al., 1992). Da un lavoro di Song e collaboratori (1987) si deduce che, in condizioni di diabete, l'aumento dell'attività del CYP2E1 è legato ad una stabilizzazione del trascritto e non ad un incremento della frequenza di trascrizione, come accade invece in condizioni di chetosi dovuta a digiuno (Song BJ et al., 1987; Johansson I. et al., 1990).

La ridotta attività del CYP2C11 sembrerebbe dovuta ai disordini ormonali, caratteristici del diabete, tra cui la ridotta secrezione di GH (*grow hormone*) (Tannenbaum G.S., 1979) e la ridotta concentrazione di testosterone circolante, riscontrata in ratti diabetici (Thummel K.E. and Schenkman J.B., 1990; Yamazoe Y. et al., 1986).

Capitolo 4

SOSTANZE NATURALI E NAFLD

4.1 Estratti vegetali e potenziali effetti terapeutici

L'utilizzo delle piante come agenti terapeutici ha origini antichissime e ricopre ancora oggi un notevole interesse (Bora K.S. and Sharma A., 2011). Alcune valide alternative al trattamento della NAFLD e della sua progressione in NASH, possono essere rappresentate dall'utilizzo di specifici composti chimici, prodotti naturalmente da alcune piante. È noto che diverse sostanze di natura vegetale sono in grado di migliorare allo stesso tempo condizioni diverse che coesistono in una stessa malattia (come nel caso della steatosi epatica), tra cui l'iperglicemia, l'iperlipidemia, l'infiammazione e lo stress ossidativo (Jo H.K. et al., 2014; Andrade J.M. et al., 2014; Um M.Y. et al., 2013). In seguito all'evidenza che le singole specie vegetali fossero in grado di ridurre alcuni disordini metabolici, Liu J. e collaboratori (2014) provarono a testare i benefici derivanti dalla combinazione di quattro diverse specie vegetali, creando una nuova formula a base di erbe. Quest'ultima, testata sia *in vivo* (topi alimentati con dieta ricca di grassi o di fruttosio) che *in vitro* (cellule HepG2 con IR o accumulo di TG), ha mostrato un'attività ipoglicemizzante ed ha migliorato la condizione di iperlipidemia e di NAFLD (Liu J. et al., 2014). Successivamente un altro gruppo di ricerca ha sperimentato *in vivo* (su topi alimentati con dieta iperlipidica) una nuova combinazione di erbe costituita da cinque componenti bioattivi (*Cyclanthera pedata*, *Glycine max*, *Oryza sativa fermentata*, *Cynara scolymus* e *Medicago sativa*), derivanti da piante già note in parte per i loro effetti positivi sul metabolismo lipidico e glucidico. Tali componenti bioattivi, somministrati giornalmente (addizionati al pane bianco di grano), a topi a cui era stata indotta steatosi epatica, avevano determinato un miglioramento complessivo del quadro iperlipidico (Pozzo L. et al., 2014). Alla luce dei risultati ottenuti, nel presente progetto di tesi è stata utilizzata la medesima combinazione di componenti bioattivi (addizionati al latte di soia), per valutarne gli effetti su ratti steatotici. Qui di seguito sono riportate le caratteristiche generali dei singoli componenti della miscela in questione.

- **Riso rosso fermentato, *Oryza sativa***

Il riso (*Oryza sativa* L., dal greco antico òryzha, óρυζα) è una pianta erbacea annuale della famiglia delle Gramineae, di origine asiatica. Quest'ultima, insieme alla *Oryza glaberrima*, è una delle due

specie di piante da cui si produce il riso. *L'Oryza sativa* è coltivata su circa il 95% della superficie mondiale di riso. Anche se le origini di tale alimento risalgono al VI millennio a.C., in Asia ed anche in Cina. Da uno studio *in vivo*, effettuato su ratti maschi *Wistar* alimentati con dieta iperlipidica (HFD), trattati con un estratto acquoso di crusca di riso, è emerso il ruolo antiossidante ed ipolipidemico di tale alimento. Inoltre i parametri antiossidanti (catalasi e proteine carbonilate) sono risultati notevolmente migliorati nel gruppo trattato con l'estratto, rispetto al gruppo a sola dieta iperlipidica. L'estratto ha determinato anche una riduzione dei parametri ematici (colesterolo totale e trigliceridi), un decremento dell'attività dell'HMGCoA reduttasi ed infine un aumento del contenuto fecale di colesterolo e lipidi, rispetto ai ratti HFD (Wang Y.X. et al., 2014; Chung S.I. et al., 2014). In altri lavori sono state anche riportate le proprietà ipoglicemizzanti di questo alimento (Choi W.H. et al., 2014; Senadheera S.P. et al., 2014).

Il riso rosso fermentato deriva dalla fermentazione dell'*Oryza sativa* ad opera del lievito *Monascus purpureus* (Figura 11). È un componente tradizionale della cucina e della medicina popolare cinese il cui primo utilizzo risale all'800 a.C., quando veniva impiegato primariamente come conservante, colorante ed aromatizzante in preparazioni alimentari, tra cui carne, pesce, vino di riso o formaggio. Il caratteristico colore rosso del riso è dovuto ad una serie di pigmenti prodotti in seguito alla fermentazione, che conferiscono al riso la proprietà di agente colorante. Anche se dal 1990, diverse compagnie produttrici di integratori alimentari cominciarono a commercializzare e pubblicizzare l'utilizzo del riso rosso fermentato per le sue proprietà ipocolesterolemiche, negli Stati Uniti non è stato commercializzato prima del 2001 (Burke F.M., 2015; Gerards M.C. et al., 2015). L'azione ipocolesterolemica del riso rosso fermentato è principalmente dovuta alla presenza di una molecola avente la medesima struttura chimica della Lovastatina, composto chimico sintetico noto con il nome di monacolina K che agisce inibendo l'enzima chiave del metabolismo del colesterolo (l'HMGCoA reduttasi). Comunque nel riso rosso, oltre alla monacolina K, sono presenti altre sostanze, tra cui steroli, isoflavoni e acidi grassi monoinsaturi, che non solo regolano le concentrazioni di colesterolo, ma si pensa che esercitino un'azione protettiva anche su patologie quali diabete, cancro, osteoporosi e Alzheimer. L'azione sinergica delle suddette componenti si evince dal fatto che la quantità di monacolina K contenuta in una porzione di riso rosso corrisponda a 1,02 - 7,2 mg, di gran lunga inferiori ai 20 o ai 40 mg di Lovastatina richiesti per ottenere il medesimo effetto farmacologico (Yang C.W. and Mousa S.A., 2012).

In uno studio di tipo chimico-analitico sono stati analizzati nove differenti tipi di riso rosso fermentato ed è emerso che le concentrazioni di monacolina K sono molto variabili. Inoltre, sette dei campioni testati contenevano citrinina, una micotossina prodotta da un'ampia varietà di funghi, che è risultata nefrotossica in tutte le specie animali testate e citotossica ad alte concentrazioni su colture di linfociti umani. Pertanto, le concentrazioni di citrinina negli integratori dovrebbero essere ridotte al minimo. Secondo diversi *trials* clinici controllati e a doppio cieco, il riso rosso fermentato è risultato efficace e ben tollerato per un ampio spettro di pazienti. Tuttavia, sono stati documentati anche alcuni casi di miopatia muscolare e di rhabdomiolisi in pazienti che oltre ad aver subito un trapianto renale assumevano ciclosporina. Questi risultati hanno indotto la FDA a definire il riso rosso fermentato non sicuro per alcune categorie di pazienti (Klimek M. et al., 2009; Childress L. et al., 2013). Dopo aver stabilito un evidente rapporto di causa ed effetto tra l'assunzione di monacolina K, derivante da preparati a base di riso rosso fermentato ed il mantenimento dei livelli ematici normali di colesterolo LDL, il gruppo di esperti scientifici sui prodotti dietetici, l'alimentazione e le allergie (NDA) ha dichiarato che la dose giornaliera di monacolina K per un uomo di circa 70 Kg corrisponde a 10 mg (Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 6 marzo 2014; Gerards M.C. et al., 2015).

- **Carciofo, *Cynara scolymus***

Il carciofo (*Cynara scolymus* L.) (Figura 12) è una pianta erbacea perenne alta fino a 1,5 metri, provvista di un rizoma sotterraneo dalle cui gemme si sviluppano più fusti, che al momento della fioritura crescono in altezza con una ramificazione dicotomica. Appartiene alla famiglia delle Asteraceae; coltivato in Italia e in altri Paesi per uso alimentare e curativo. Le foglie presentano uno spiccato polimorfismo anche nell'ambito della stessa pianta (eterofillia), sono grandi, oblungo-lanceolate, con lamina intera nelle piante giovani e in quelle prossime ai capolini, pennatosetta e più o meno incisa in quelle basali. I fiori sono riuniti in un capolino (detto anche calatide) di forma sferoidale, conica o cilindrica e di 5–15 cm di diametro, con un ricettacolo carnoso e concavo nella parte superiore. Sul ricettacolo sono inseriti i fiori (flosculi), tutti con corolla tubulosa e azzurro-violacea e calice trasformato in un pappo setoloso, utile alla dispersione degli acheni tramite il vento (Wikipedia).

Dopo l'acqua, il componente principale dei carciofi sono i carboidrati, tra i quali si distinguono l'inulina e le fibre. I principali minerali sono il sodio, il potassio, il fosforo e il calcio. Tra le vitamine prevale la presenza di B1, B3, e piccole quantità di vitamina C. Più importante per spiegare le

attività farmacologiche degli estratti di carciofo è la presenza di un complesso di metaboliti secondari caratteristici come i derivati dell'acido caffeico (tra cui acido clorogenico, acido neoclorogenico, acido criptoclorogenico, cinarina), flavonoidi (in particolare rutina), lattoni sesquiterpenici (tra cui cinaropicrina, deidrocinaropicrina, grosseimina, cinaratriolo) (Wikipedia).

Tra le innumerevoli attività farmacologiche esercitate dai fenoli di questa pianta, quelle maggiormente documentate sono: protezione epatica, antitumorale, antiossidante, antibatterica, coleretica e diuretica. Da esperimenti *in vitro* è stato dimostrato il ruolo antiossidante, esercitato da estratti di foglie di carciofo, su epatociti di ratto (D'Antuono I. et al., 2015). Tuttavia, è stato evidenziato che, *in vivo*, la biodisponibilità dei polifenoli rimane limitata (non supera le concentrazioni ematiche di 10 μ M) e ciò potrebbe dipendere dalla glucuronidazione o dalla solfatazione dei gruppi idrossilici nelle strutture chimiche di tali composti. Ciò nonostante, al di là della ridotta biodisponibilità, i polifenoli assunti con la dieta sono presenti ad elevate concentrazioni nel lume gastrointestinale, dove possono svolgere un importante ruolo nella protezione da danno ossidativo e ritardare lo sviluppo del cancro al colon, all'intestino o al retto (Halliwell B. et al., 2000). Tale effetto antiossidante è stato osservato a livello generale da Magielse J. e collaboratori (2014), mediante esperimenti *in vivo*. Questi ultimi hanno analizzato l'azione esercitata da un estratto acquoso di foglie di carciofo su differenti biomarcatori di stress ossidativo e sulle difese antiossidanti: i valori ematici di malondialdeide (MDA), ed urinari di 8-deossiguanosina (indicatori rispettivamente di perossidazione lipidica e danno ossidativo del DNA), ed infine di coenzima Q₉ (CoQ₉) e glutazione ridotto (GSH) negli eritrociti, come biomarcatori dei sistemi di difesa antiossidante. Nel suddetto esperimento erano state considerate due differenti concentrazioni di estratto di carciofo: 0,2 g/Kg e 1 g/Kg di peso corporeo, somministrati oralmente per 3 settimane a ratti sottoposti a stress ossidativo indotto da STZ (ratti diabetici). È emerso che l'estratto di foglie di carciofo ha determinato una riduzione dei livelli di MDA, di 8-deossiguanosina, di CoQ₉, del GSH soltanto ad un dosaggio di 0,2 g/Kg, confermando, anche *in vivo*, le proprietà antiossidanti di questa pianta. Tuttavia la somministrazione della dose superiore (1 g/Kg) ha determinato un aumento significativo della malondialdeide (Magielse J. et al., 2014; Küçükgergin C. et al., 2010). Infatti, recenti studi hanno dimostrato che la somministrazione di un alto dosaggio di miscele con proprietà antiossidanti non necessariamente esercita un effetto benefico, ma al contrario, provoca effetti genotossici (Jacociunas L.V. et al., 2013; Pereira C. et al., 2014). Pertanto, gli studi sulle proprietà salutari di questa pianta sono ancora da validare.

- **Caigua, *Cyclanthera pedata***

La *Cyclanthera pedata* è una pianta rampicante da frutto, molto simile alla vite ed appartiene alla famiglia delle Cucurbitaceae. È una pianta monoica, ovvero produce sia i fiori maschili che femminili, ma in posizioni diverse. Le foglie sono lobate ed il suo frutto è una zucca allungata di colore verde, contenente semi neri ed una polpa bianca dal sapore simile a quello dei cetrioli (Figura 13). La *Cyclanthera pedata* è una pianta originaria della Cordigliera delle Ande (sud America) e viene coltivata come pianta da frutto (<http://www.erbe.altervista.org>). Il frutto maturo contiene sostanze fitochimiche quali peptine, acido galatturonico, resine, lipoproteine e vari composti steroidei. Il suo utilizzo ha origini molto remote, come testimoniano antiche ceramiche provenienti dal Perù raffiguranti i frutti di tale pianta (Wikipedia).

La Caigua può essere consumata sia cotta che cruda, anche se il suo utilizzo alimentare è ancora molto limitato. In un lavoro del 2013 è riportata la composizione minerale di tale frutto (espressa in mg su 100 g di prodotto): calcio (11,9), magnesio (8,4), sodio (0,91), potassio (152), fosforo (19,4), manganese (0,074), ferro (0,21), zinco (0,13), rame (0,013) e vanadio (0,015) (Oliveira A.C. et al., 2014). In altri due lavori sono stati identificati e caratterizzati i principali flavonoidi glucosidici (contenuti sia nelle foglie che nei frutti di Caigua), tramite varie metodiche di separazione e caratterizzazione molecolare, tra cui HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), spettrometria di massa ed NMR (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) (Carbone V. et al., 2004; Montoro P. et al., 2005). Esistono pochi lavori riguardanti le proprietà medicamentose del frutto di questa pianta: Ranilla L.G. e collaboratori (2010) hanno documentato la forte attività antiossidante ed inibitoria del fattore ACE (*Angiotensin I-Converting Enzyme*). Nella Caigua, oltre ai flavoni, ci sono altri componenti indrosolubili, oltre ai flavoni, recanti attività anti-ipertensiva (Ranilla L.G. et al., 2010). Infine, in un altro studio di carattere analitico in semi maturi di Caigua sono state identificate proteine inibitrici della tripsina, determinate mediante cromatografia di affinità (Kowalska J. et al., 2006). Data l'esigua quantità di lavori riguardanti gli effetti della *Cyclanthera pedata* sulla salute umana o animale, sono necessari ulteriori studi *in vitro* ed *in vivo* per chiarire l'effetto di questa pianta.

- **Soia, *Glycine max***

La soia (*Glycine max*, L.) è una pianta erbacea annuale appartenente alla famiglia delle Leguminose, originaria dell'Asia orientale e coltivata per scopi alimentari. Una caratteristica della soia è la peluria brunastra che ricopre molte parti della pianta (legume, fusti, foglie). Le foglie sono trifogliate, con singole foglioline piuttosto grandi. I fiori sono bianchi, rosa o viola, riuniti in piccoli grappoli (racemi) e sono generalmente autofertili. I frutti sono legumi corti (3–8 cm) e contengono pochi semi (di solito da 2 a 4) con un diametro compreso tra 5 ed 11 mm (Figura 14). Le radici, analogamente ad altre leguminose, ospitano un batterio simbiote, *Bradyrhizobium japonicum* che opera la fissazione dell'azoto atmosferico. Essa viene largamente utilizzata per l'alimentazione degli animali da allevamento e rappresenta al momento uno degli alimenti più coltivati nel mondo. La produzione mondiale si attesta attualmente a poco più di 220 milioni di tonnellate (FAO, 2009). Una parte importante della produzione mondiale della soia è destinata all'alimentazione degli animali d'allevamento sotto forma di farine. Una parte è usata anche come fertilizzante, nonché per usi industriali (cosmetici ecc.). Normalmente, per l'alimentazione umana si usano i semi o i germogli. I primi possono essere consumati interi (spesso fermentati) o anche macinati e da questi ultimi viene anche estratto l'olio, mentre i secondi possono essere consumati sia cotti che crudi. È opportuno ricordare, inoltre, che l'industria alimentare moderna fa un ampio uso di lecitina estratta dalla soia, un emulsionante naturale che mantiene in sospensione il colesterolo presente nel sangue, impedendo che si depositi sulle pareti delle arterie (Oh H.G. et al., 2014; Wilson T.A. et al., 1998)

La teoria più accreditata circa la coltivazione della soia, è che sia iniziata nella Cina nord-occidentale nell'XI secolo o nel XVII secolo a.C. La sua coltivazione si diffuse dalla Cina alla Corea, fino alla regione Himalayana e, parallelamente a questa espansione, aumentò anche la diversificazione dei prodotti da essa derivati (latte e tofu). Al di fuori dell'Asia, la coltivazione della soia è documentata soltanto a partire dall'800. Secondo i dati forniti dalla FAO nel 2009, i massimi produttori di soia sono gli Stati Uniti, il Brasile e l'Argentina, che producono complessivamente l'80% della produzione mondiale. La soia coltivata in Occidente resta però destinata all'alimentazione degli animali o all'esportazione verso l'Asia, oltre che agli usi industriali (Wikipedia).

Tale leguminosa ha assunto sempre più importanza per le sue proprietà salutari. Nella soia sono presenti diversi componenti bioattivi capaci di esercitare effetti benefici sulla salute umana, tra cui gli isoflavoni. Gli altri componenti della soia (es. saponine, soiacistatina, lecitina, raffinose,

stachiosio e 2-pentil-piridina) presentano attività biologiche diverse dagli isoflavoni, che includono effetti ormonali, immunologici, batteriologici e digestivi (Imai S., 2015). Gli isoflavoni sono presenti nella forma biologicamente inattiva di glucoside, dei quali i principali sono la genisteina e la daizeina, che sono presenti nella soia in una forma inattiva di β -D-glucosidi, genistina e daizina. Tali glucosidi vengono idrolizzati nella corrispondente forma attiva di agliconi ad opera della β -glucosidasi intestinale. Gli isoflavoni (fenoli eterociclici in grado di donare un atomo di idrogeno ad un radicale libero, fungendo così da scavenging di questi ultimi) esercitano un effetto inibitorio sull'accumulo di grasso corporeo e mostrano importanti proprietà antiossidanti. Essi riducono la formazione di specie radicaliche e di ROS, favorendo la decomposizione del perossido di idrogeno. Da esperimenti condotti su topi sottoposti a severo stress ossidativo è emerso che il trattamento con gli isoflavoni estratti dalla soia è stato in grado di ripristinare le difese antiossidanti, SOD e CAT, che in risposta alle elevate concentrazioni di ROS avevano subito una drastica riduzione (Yoon G.A. and Park S., 2014). Secondo alcune evidenze sperimentali, la fermentazione *in vitro* tramite probiotici aumenta la biodisponibilità degli isoflavoni rimuovendo le porzioni glucosidiche e convertendole in agliconi (strutture funzionali). Da studi su ratti alimentati con una dieta contenente l'1% di colesterolo e successivamente trattati con soia fermentata, è emerso un miglioramento complessivo del metabolismo lipidico, ed un ridotto assorbimento intestinale del colesterolo (Kim Y. et al., 2014; Oh H.G. et al., 2014).

- **Erba medica, *Medicago sativa***

L'erba medica o alfa-alfa (*Medicago sativa* L.) (Figura 15) è una pianta erbacea perenne appartenente alla specie delle Leguminose. Il nome "erba medica" non è dovuto alle sue proprietà curative e ai suoi benefici, bensì alle sue origini persiane, e precisamente della regione della Media, per cui "erba medica" sta per "erba della Media". Quest'ultima è una pianta principalmente utilizzata per nutrire il bestiame, ma è anche diffusa nell'alimentazione umana. L'*alfa-alfa* è ricca di molte componenti: un alto contenuto di proteine, superiore a quello nelle uova, vitamine A, E, C, D, K, B1, B2, sali minerali quali calcio, selenio, potassio, fosforo, zinco, rame, fibre, antiossidanti, β -carotene, saponine e clorofilla. Le saponine (o saponosidi), glicosidi terpenici di origine vegetale che prendono il nome dalla *Saponaria officinalis*, che veniva coltivata un tempo per il lavaggio della lana, possono essere così abbondanti da raggiungere anche il 30% del peso secco della pianta (Wikipedia).

Diversi studi indicano che il consumo di questa pianta riduce l'assorbimento intestinale del colesterolo, aumenta l'escrezione fecale degli steroidi endogeni ed esogeni e riduce la formazione di placche aterosclerotiche. Oltre alla regolazione del metabolismo lipidico è interessante l'azione sul metabolismo glucidico: gli estratti acquosi di questa pianta stimolano il trasporto del 2-deossi-glucosio, la formazione del glicogeno nel muscolo addominale di topi e stimola la produzione dell'insulina in linee di cellule β -pancreatiche. È stato dimostrato che gli estratti fogliari di *M. sativa* possono essere utilizzati nel trattamento di sintomi neurovegetativi dovuti alla menopausa. Tra le innumerevoli proprietà esercitate da questa pianta si ricordino quella ipolipidemica, immunopotenziante, antibiotica (soprattutto gram-positivi: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ed *Enterococcus faecalis*), antifungina (soprattutto contro *Saccharomyces cerevisiae*), antiossidante, digestiva, oltre che nutritiva (Bora K.S. and Sharma A., 2011). In uno studio volto alla determinazione degli effetti ipocolesterolemici di un estratto di saponina dall'*alfa-alfa* su ratti a dieta iperlipidica, è emerso che l'estratto ha un ruolo cruciale nella riduzione del colesterolo ematico. Tale effetto è dovuto alla modulazione di diversi geni, tra cui l'induzione del CYP7A1, implicato nella conversione del colesterolo in acidi biliari; l'induzione di LDLr, responsabile dell'*up-take* del colesterolo-LDL dal circolo sanguigno ed infine la *down*-regolazione dei geni HMGCoA reduttasi ed ACAT2, il primo responsabile della biosintesi del colesterolo e il secondo coinvolto nella via di sintesi dei trigliceridi. In definitiva, gli effetti ipocolesterolemici dell'estratto di saponina potrebbero essere attribuiti oltre che alla modulazione di tali geni, anche all'aumentata escrezione del colesterolo (Shi Y. et al., 2014).

Capitolo 5

PROPRIETÀ TERAPEUTICHE DELL'EUGENOLO

L'eugenolo (4-allil-2-metossifenolo $C_{10}H_{12}O_2$) è un composto aromatico idrossilato, un guaiacolo con catena modificata, e appartiene alla classe chimica degli allilbenzeni. L'eugenolo si presenta come un liquido oleoso, quasi incolore o giallo chiaro, che viene estratto da alcuni oli essenziali, specialmente dall'olio della pianta *Eugenia caryophyllata* (appartenente alla famiglia delle *Myrtaceae* originaria dell'Indonesia), da cui derivano i chiodi di garofano: l'olio viene estratto dai boccioli fiorali, dalle foglie o dai rametti della pianta tramite un processo di idrodistillazione (Jo H.K. et al., 2014). Si tratta di un albero sempreverde (non supera i 10-15 m di altezza), che presenta foglie ricche di ghiandole oleifere, di un colore rosato quando sono ancora giovani e che diventa verde brillante e lucido con la maturità. Subito dopo la stagione delle piogge iniziano a comparire i boccioli fiorali, all'inizio di colore giallo-verde e successivamente di colore rosa per diventare rosso vivo a maturità. Appena il colore inizia a virare verso il rosa i boccioli fiorali vengono raccolti per essere essiccati ed ottenere la spezia "chiodi di garofano". L'eugenolo è presente anche nella cannella, nel basilico, nella noce moscata, nel sassofrasso e nella mirra. È poco solubile in acqua e solubile nei solventi organici ed ha un odore gradevole e speziato. Viene impiegato in profumeria, come aroma, olio essenziale, e in medicina come antisettico e anestetico. Un tempo era utilizzato come base per la produzione di isoeugenolo per la sintesi della vanillina, che oggi viene in gran parte prodotta per sintesi diretta. Esercita un'azione antidolorifica contro il mal di denti ed ha inoltre attività disinfettante e leggere proprietà anestetiche locali ed anti-infiammatorie (Wikipedia). L'eugenolo è una molecola estremamente versatile che trova innumerevoli applicazioni nell'industria farmaceutica, alimentare, oltre che in ambito agricolo (Jo H.K. et al., 2014).

L'olio di chiodi di garofano veniva già impiegato, nella medicina tradizionale cinese, come agente carminativo, antispasmodico, antibatterico ed antiparassitario. Negli ultimi anni, l'eugenolo ha attirato l'attenzione di molti ricercatori per le sue proprietà antinfiammatorie (Koh T. et al, 2013) e per la notevole attività antiossidante (D'Avila Farias M. et al., 2014) ed anti-proliferativa nella cirrosi epatica (Ali S. et al., 2014). In uno studio di Jo H.K. e collaboratori (2014) sono state documentate le proprietà ipolipidemiche di tale composto su colture cellulari umane HepG2 e su linee primarie di epatociti di ratto, in cui l'accumulo lipidico era stato indotto mediante trattamento rispettivamente con acido palmitico e dieta iperlipidica. Nello specifico, l'eugenolo

aveva determinato una ridotta espressione genica dei fattori trascrizionali LXR α e SREBP1c (geni chiave del metabolismo lipidico) e delle relative proteine target, FAS, SCD1 e GPAT. Aveva inoltre mostrato una concomitante induzione dei geni della β -ossidazione degli acidi grassi e riduzione di quelli coinvolti nella produzione del collagene (Jo H.K. et al., 2014). Un'ulteriore proprietà dell'eugenolo è quella di aumentare l'assorbimento intestinale dei farmaci, come dimostrato da esperimenti farmacologici su ratti che evidenziano un migliore assorbimento della colchicina in presenza di eugenolo (Shen Q. et al., 2011).

Da altri studi emerge che tale composto è in grado di ridurre lo stress ossidativo in presenza di danno epatico indotto da epatotossine e di prevenire la formazione di ROS, agendo in maniera specifica sull'espressione del CYP2E1 e ostacolando la produzione dei metaboliti tossici. Il ruolo antinfiammatorio si esplicherebbe con l'inibizione del gene della ciclossigenasi-2 (COX2), coinvolta anche in processi come la fibrogenesi e la carcinogenesi (Yogalakshmi B. et al, 2010; Bachiega T.F. et al., 2012). Inoltre, l'eugenolo è risultato determinante anche per il trattamento dell'artrite reumatoide umana, come evidenziato da studi condotti su modelli murini di tale patologia (Grespan R. et al., 2012).

Recentemente, in uno studio su ratti diabetici, sono state dimostrate le sorprendenti proprietà ipoglicemizzanti di tale composto. Si ipotizza che la ridotta concentrazione del glucosio ematico in ratti diabetici trattati con tale composto sia dovuta alla capacità dell'eugenolo di stimolare la secrezione di insulina nelle cellule β -pancreatiche rimanenti (in seguito al danno indotto da STZ), aumentando così l'utilizzo del glucosio da parte dei tessuti. Tali osservazioni sono supportate dall'evidente aumento di insulina plasmatica in ratti trattati con eugenolo, e dall'aumentata immuno-reattività a tale ormone nelle cellule del pancreas, come dimostrato dalle analisi istopatologiche. Tra le altre azioni, l'eugenolo previene la perdita di peso dovuta al diabete e riduce il contenuto di emoglobina glicata, la cui formazione viene favorita dalle alte concentrazioni di glucosio nel sangue. Inoltre, Srinivasan S. e collaboratori (2014) sono andati ad analizzare la modulazione di alcuni geni chiave del metabolismo glucidico, la cui espressione è tipicamente alterata in condizioni di diabete, ed hanno riscontrato un importante ruolo esercitato dall'eugenolo su questi geni. Nello specifico, il trattamento con tale componente ha determinato un'attivazione della glicolisi e della sintesi del glicogeno, le due principali vie di smaltimento del glucosio, ed una inibizione della gluconeogenesi, responsabile invece della produzione endogena di glucosio (Srinivasan S. et al., 2014). Tutti questi studi confermano le svariate proprietà nutraceutiche esercitate dall'eugenolo e la validità del suo utilizzo come agente terapeutico per il

trattamento di patologie complesse come la NAFLD e la sindrome metabolica (Jo H.K. et al., 2014; Al-Okbi S.Y. et al., 2014). Per tutte le proprietà sopra citate l'eugenolo è stato scelto come controllo positivo nel lavoro di questa tesi.

Capitolo 6

SCOPO DELLA TESI

Appropriati modelli animali sono indispensabili per lo studio dei meccanismi di sviluppo della NAFLD e per l'identificazione di specifici *target* farmacologici che ne promuovano il trattamento terapeutico. Un recente modello, utilizzato in letteratura per studiare gli effetti protettivi di farmaci e sostanze naturali nei confronti della steatosi, in presenza di diabete, prevede il trattamento di ratti con dieta iperlipidica ed iniezione di una bassa dose di streptozotocina (35 mg/Kg). In questo progetto, abbiamo caratterizzato tale modello per quel che concerne la modulazione degli enzimi del *drug metabolism* e quelli coinvolti nella risposta antiossidante (Vornoli A. et al., 2014) e valutato gli effetti antisteatotici di una miscela di cinque estratti vegetali (riso rosso fermentato, caigua, carciofo, soia ed erba medica). Abbiamo inoltre investigato gli effetti di questa miscela vegetale a livello genico sul metabolismo lipidico, glucidico e sui geni correlati allo stress mitocondriale e del R.E. Inoltre, al fine di estendere la caratterizzazione del ratto HFD/STZ ad analisi di trascritti non precedentemente presi in considerazione in modelli steatotici, abbiamo analizzato a livello epatico l'espressione dei geni chiave del metabolismo del colesterolo e del trasporto degli acidi biliari.

MATERIALI E METODI

Capitolo 7

MATERIALI E METODI

7.1 Sostanze utilizzate

I vari reagenti (anilina, p-nitrofenolo, benzilossichinolina, etossicumarina anilina, p-nitrofenolo, benzilossichinolina, etossicumarina, glutatione, SOD, ed altri), la streptozotocina, l'eugenolo, solventi di comune uso e *primers* sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich (Milano, Italia).

Gli anticorpi primari anti-ratto, prodotti in capra, sono stati acquistati dalla *Daichi Pure Chemical Co.* (Tokyo, Japan) e dalla *Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany)*, l'anticorpo secondario, anti-capra, è stato fornito dalla Sigma Aldrich (Milano, Italia), i reagenti specifici per elettroforesi e blotting dalla *Biorad Laboratories s.r.l.* (Milano, Italia) o dalla *Amersham* (NJ, USA).

7.2 Modello sperimentale

Lo studio è stato articolato su due trattamenti condotti a distanza di un anno, su 42 ratti maschi *Wistar* (2 mesi di età) nel primo esperimento e 15 nel secondo. Gli animali, stabulati in gabbie a temperatura ambiente, con cicli luce/buio di 12 ore e il 55% di umidità relativa (tabella 1), hanno ricevuto cibo ed acqua *ad libitum*. Tutti gli esperimenti sono stati condotti secondo le Linee Guida del Decreto Legislativo 27 gennaio 1992, n. 116 "Attuazione della Direttiva n. 86/609/CEE relativa alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici" (S.O. alla G.U. 18 Febbraio 1992, n.40).

Tabella 1. Condizioni sperimentali.

caratteristiche ambientali	dati
Ore di luce al giorno (h)	12
Ore di buio al giorno (h)	12
Temperatura (°C)	22 ± 1
Umidità (%)	55

Il trattamento *in vivo* (Figura 7), con durata complessiva di 8 settimane, si è articolato in due fasi. Dopo i primi dieci giorni di stabulazione, gli animali sono stati suddivisi in due gruppi (Figura 8).
FASE I: Induzione di steatosi epatica e diabete mellito (durata: 4 settimane):

CTR: alimentato con dieta standard (n = 6) contenente l'11% di energia derivante dai grassi (4% della composizione) (Figura 10).

HFD/STZ: alimentato con dieta iperlipidica (n= 42), contenente il 55% di energia derivante dai grassi (28% della composizione) (Figura 11) e trattato per via intraperitoneale (i.p) con una bassa dose di STZ (35 mg/Kg): la prima somministrazione dopo 14 giorni dall'inizio dell'alimentazione iperlipidica e la seconda dopo ulteriori 7 giorni.

Nel primo esperimento, al termine della prima fase, sono stati selezionati soltanto i ratti con glucosio >14 mmol/l (n=30), che sono stati suddivisi in 5 gruppi di 6 animali ciascuno e sottoposti ad una seconda fase di trattamento, sempre associata all'alimentazione iperlipidica.

I sei gruppi risultanti (Figura 8), sono stati così suddivisi:

- **CTR:** alimentato con dieta standard (n =6), contenente l'11% di energia derivante dai grassi (Figura 10);
- **D:** alimentato con dieta iperlipidica (n =6), contenente il 55% di energia derivante dai grassi (Figura 11);
- **A:** alimentato con dieta iperlipidica (n =6), contenente il 55% di energia derivante dai grassi (Figura 11) e simultaneamente sottoposto a trattamento quotidiano, mediante sonda intragastrica, con latte di soia arricchito con miscela di estratti vegetali (0,3 mg/Kg di monacolina K)*.
- **B:** alimentato con dieta iperlipidica (n =6), contenente il 55% di energia derivante dai grassi (Figura 10) e simultaneamente sottoposto a trattamento quotidiano, mediante sonda intragastrica, con latte di soia arricchito con miscela di estratti vegetali (1 mg/Kg di monacolina K)*;
- **E:** alimentato con dieta iperlipidica (n =6), contenente il 55% di energia derivante dai grassi (Figura 11) e simultaneamente sottoposto a trattamento quotidiano, mediante sonda intragastrica con eugenolo (10 mg/Kg) disciolto in olio (controllo positivo);
- **M:** alimentato con dieta iperlipidica (n=6), contenente il 55% di energia derivante dai grassi (Figura 11) e simultaneamente sottoposto a trattamento quotidiano, mediante sonda intragastrica, con latte di soia.

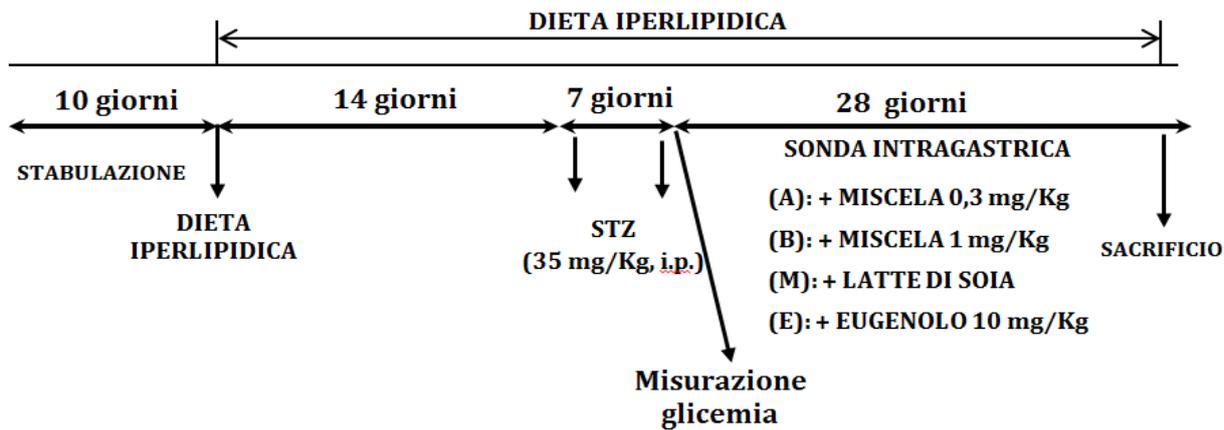


Figura 7. disegno sperimentale

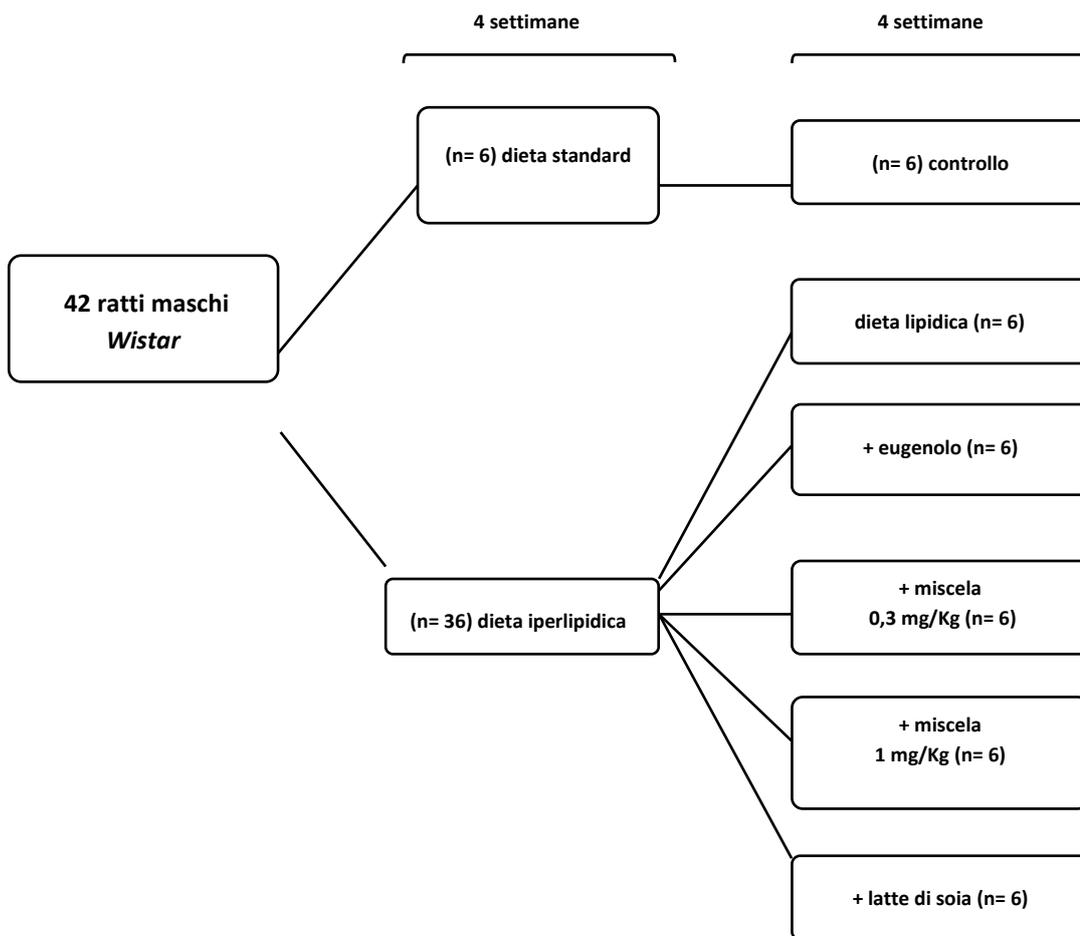


Figura 8. gruppi di trattamento

*Secondo un Decreto Legislativo, il gruppo NDA, dopo aver stabilito un rapporto di causa ed effetto tra l'assunzione di monacolina K contenuta nel riso rosso fermentato ed il mantenimento dei livelli ematici di colesterolo LDL, ha stabilito che la dose di monacolina K da assumere, per ottenere l'effetto desiderato, deve essere pari a 10 mg al giorno per un uomo con un peso medio di 70 Kg (143 µg/Kg). Dal momento che la miscela di estratti vegetali conteneva riso rosso fermentato (con nota concentrazione di monacolina K), le dosi di miscela da somministrare ai ratti sono state calcolate in funzione della monacolinaK (0,3 mg/Kg e 1 mg/Kg). Tali dosi corrispondono nell'uomo a 43 µg/Kg e 143 µg/Kg di monacolina, calcolati mediante la formula di Shennon (Reagan-Shaw S. et al., 2008), che permette di convertire le dosi animali nelle corrispondenti dosi umane, in base al parametro BSA (area di superficie corporea) (Figura 9).

Formula for Dose Translation Based on BSA			
HED (mg/kg) = Animal dose (mg/kg) multiplied by			$\frac{\text{Animal } K_m}{\text{Human } K_m}$
Species	Weight (kg)	BSA (m ²)	K _m factor
Human			
Adult	60	1.6	37
Child	20	0.8	25
Baboon	12	0.6	20
Dog	10	0.5	20
Monkey	3	0.24	12
Rabbit	1.8	0.15	12
Guinea pig	0.4	0.05	8
Rat	0.15	0.025	6
Hamster	0.08	0.02	5
Mouse	0.02	0.007	3

Figura 9. Formula di conversione in base al parametro BSA.

Reagan-Shaw S. et al., 2008

Il secondo esperimento è stato condotto secondo le modalità prima descritte con 12 ratti suddivisi in due gruppi: uno di controllo (n° 6) ed uno trattato HFD/STZ (n° 6), per approfondire la caratterizzazione del modello sul metabolismo del colesterolo, formazione degli acidi biliari e loro trasporto.



A. Rieper S.p.A.

Via B.-v.-Guggenberg, 6 · 39030 Vandoies / BZ

Numero di riconoscimento: α IT 0 BZ

Tel. (0472) 867900 · Fax (0472) 869221

info@rieper.com http://www.altromin.de



ALTROMIN - R

**Mangime completo per ratti e topi
Dieta Standard di mantenimento**

Complete feed for Rats and Mice – Maintenance Diet

Composizione: farinetta di frumento, crusca di frumento, farina di estrazione di soia tostata*, granturco, guscio di soia*, carbonato di calcio. Contiene prodotti di soia geneticamente modificati (*).

Composition: wheat middlings, wheat bran, soya extracted, toasted*, maize, soya hulls*, calcium carbonate.

It contains soya products genetically modified (*).

Componenti analitici / Analytical constituents:

Proteina grezza	19,0%	Crude protein
Fibra grezza	6,0%	Crude fibres
Oli e grassi grezzi	4,0%	Crude oils and fats
Ceneri grezze	7,0%	Crude ash

Il prodotto contiene cereali e/o relative farine e/o zucchero.

Additivi per kg / Additives per kg

Vitamine, provitamine e sostanze analoghe:	Vit. B ₆	mg 15	Composti di oligoelementi / Trace elements: mg/kg
Vitamins, provitamins and similar substances:	Vit. B ₁₂	mg 0,04	E 1 - Ferro - Fe (Carbonato ferroso) / Iron .. 165
E 672 - Vit. A	E 300 - Vit. C	mg 58	E 2 - Iodio - I (Ioduro di potassio) / Iodine .. 1,5
E 671 - Vit. D ₃	Acido pantotenico / Pantothenic acid	mg 35	E 3 - Cobalto - Co (Carbonato di cobalto) / Cobalt .. 0,3
3a700 - Vit. E (all-rac-alpha-Toc.ac.)	Acido nicotinico / Nicotinic acid	mg 60	E 4 - Rame - Cu (Solfato rameico) / Copper .. 13
Vit. K	Acido folico / Folic acid	mg 3	E 5 - Manganese - Mn (Ossido manganoso) .. 75
Vit. B ₁	Biotina / Biotin	mg 0,1	E 6 - Zinco - Zn (Ossido di zinco) / Zinc .. 70
Vit. B ₂	Colina / Choline	mg 1.000	E 8 - Selenio - Se (Selenito di sodio) / Selenium .. 0,4

Istruzioni per l'uso:

La dieta deve essere somministrata a volontà.
Assicurare la continua disponibilità di acqua da bere ad libitum. Pellets da 10 mm di diametro.

Use and Dose:

The diet must be administered at will.
Drinking water "ad libitum".
Pellets of 10 mm diameter

Produttore: / Producer: Altromin GmbH, Im Seelenkamp 20, D-32791 Lage, numero di riconoscimento α-DE-NW-1-00057

Quantitativo netto / net quantity: **12,5 kg**

Figura 10. Composizione dieta standard



A. Rieper S.p.A.

Via B.-v.-Guggenberg, 6 · 39030 Vandoies / BZ

Numero di riconoscimento: α IT 0 BZ

Tel. (0472) 867900 · Fax (0472) 869221

info@rieper.com http://www.altromin.de



ALTROMIN – R mod.

High Fat Diet

con 25% olio di cocco e 2% colesterolo

Mangime completo per ratti e topi

Dieta Standard di mantenimento

Complete feed for Rats and Mice – Maintenance Diet

Composizione: olio di cocco (25%), farinetta di frumento, crusca di frumento, farina di estrazione di soia tostata*, granturco, guscio di soia*, colesterolo (2%), carbonato di calcio.

Contiene prodotti di soia geneticamente modificati (*).

Composition: coconut oil (25%), wheat middlings, wheat bran, soya extracted, toasted*, maize, soya hulls*, cholesterol (2%), calcium carbonate.

It contains soya products genetically modified (*).

Componenti analitici / Analytical constituents:

Proteina grezza	13,8%	Crude protein
Fibra grezza	4,4%	Crude fibres
Oli e grassi grezzi	28,0%	Crude oils and fats
Ceneri grezze	5,1%	Crude ash

Il prodotto contiene cereali e/o relative farine e/o zucchero.

Additivi per kg / Additives per kg:

Vitamine / Vitamins:

E 672 – Vit. A	U.I.	18.250	Vit. B ₁₂	mg	0,029
E 671 – Vit. D ₃	U.I.	730	E 300 – Acido L-ascorbico /		
3a700 – Vit. E tutto- α -alfa-			L-Ascorbic acid	mg	42
tocofeile acetato	mg	91	Acido pantotenico / Pantothenic acid	mg	25,5
Vit. K	mg	3,6	3a314 - Niacina / Niacin	mg	43,8
Vit. B ₁	mg	21,9	3a316 - Acido folico / Folic acid	mg	2
Vit. B ₂	mg	14,6	Biotina / Biotin	mg	0,07
3a831 – Vit. B ₆	mg	11	3a890 - Cloruro di colina /		
			Choline chloride	mg	730

Composti di oligoelementi / Trace elements:

E 1 Carbonato ferroso / Ferrous carb.	mg	249
E 2 Ioduro di potassio / Pot. iodide	mg	1,40
3b302 Carbonato di cobalto (II) /		
Cobalt(II) carbonate	mg	0,39
E 4 Solfato rameico pentaidrato /		
Cupric sulphate, pentahydrate	mg	37,2
E 5 Ossido manganeseo / Mang. oxide	mg	70,5
E 6 Ossido di zinco / Zinc oxide	mg	63,3
E 8 Selenito di sodio / Sodium selenite	mg	0,63

Istruzioni per l'uso:

La dieta deve essere somministrata a volontà. Assicurare la continua disponibilità di acqua da bere ad libitum. Pellets da 10 mm di diametro.

Use and Dose:

The diet must be administered at will. Drinking water "ad libitum". Pellets of 10 mm diameter

Produttore: / Producer: Altromin GmbH, Im Seelenkamp 20, D-32791 Lage, numero di riconoscimento α-DE-NW-1-00057

Quantitativo netto / net quantity: **5 kg**

Da consumarsi preferibilmente entro / Best before:

GG/MM/AAA

Numero di lotto: / Batch number:

XXXX

Figura 11. Composizione dieta iperlipidica

Gli animali sono stati pesati all'inizio e alla fine della sperimentazione; è stato poi calcolato l'incremento ponderale (differenza tra peso finale e peso iniziale) (Tabella 2) e la quantità di cibo assunta da ciascun animale (Tabella 3). Tutti i ratti sono stati mantenuti a digiuno e i gruppi A, B, E, M sono stati privati del trattamento 24 ore prima del sacrificio. Al momento del sacrificio, per ciascun animale, è stato effettuato un prelievo di sangue (con una puntura cardiaca), su cui è stata immediatamente eseguita la determinazione dei parametri ematici. In seguito al sacrificio, il fegato di ciascun animale è stato asportato e pesato, da cui si è poi calcolato il peso relativo (peso del fegato rapportato al peso dell'animale). I campioni di tessuto epatico, prelevati in sterilità, sono stati suddivisi in aliquote, congelati in azoto liquido e conservati a -80°C fino al momento del loro utilizzo. Una piccola porzione di tessuto epatico, destinata all'analisi istologica, è stata fissata in formalina al 10%.

Tabella 2. Peso degli animali

	peso medio iniziale (g)	peso medio finale (g)
CTR	128,1 ± 7,2	354,9 ± 13,5
D	139,8 ± 13,9	322,0 ± 36,9
A	128,1 ± 8,3	289,4 ± 21,0
B	141,0 ± 10,6	300,8 ± 30,5
E	146,1 ± 8,2	311,5 ± 47,8
M	140,0 ± 2,4	295,5 ± 27,7

Tabella 3. Assunzione dieta durante il trattamento

	assunzione media dieta settimanale	
	inizio trattamento	fine trattamento
CTR	22,8 ± 0,8	23,5 ± 0,3
D	21,0 ± 3,5	21,8 ± 1,9
A	21,3 ± 1,0	21,0 ± 0,8
B	20,4 ± 2,9	20,9 ± 3,7
E	20,8 ± 3,8	21,3 ± 2,5
M	18,4 ± 1,5	22,8 ± 3,5

7.3 Parametri ematici

L'analisi dei parametri ematici (ALT, AST, trigliceridi, colesterolo totale, LDL, HDL, glucosio) è stata eseguita mediante l'utilizzo di kit commerciali presso i laboratori della Fondazione Toscana Gabriele Monasterio (CNR – Pisa) della dott.ssa Maristella Maltinti.

7.4 Frazioni microsomiali e citosoliche

Il tessuto epatico, conservato a - 80°C, è stato lavato con KCl freddo 1,15% (p/v), pesato e successivamente omogenizzato in 4 volumi di tampone di omogenizzazione (K_2HPO_4 100 mM pH 7,4 + KCl 1,15% (p/v) + EDTA 1 mM) rispetto al peso del tessuto. L'omogenato è stato centrifugato a 10000 g per 25 minuti a 4°C, al fine di ottenere la precipitazione di nuclei e mitocondri. Il sovranatante, contenente la frazione microsomiale e citosolica, è stato recuperato e ulteriormente centrifugato a 105'000 g per 1 ora e 10 minuti a 4°C, separando così il citosol dalla frazione microsomiale. Il sovrinatante, contenente la frazione citosolica, è stato recuperato, suddiviso in aliquote e conservato a -20°C. Il pellet, contenente la frazione microsomiale, è stato risospeso in tampone di omogenizzazione e ulteriormente centrifugato per 1 ora a 105000 g a 4°C, al fine di eliminare le proteine contaminanti non microsomiali. Quest'ultimo precipitato ottenuto è stato risospeso in 2 volumi di tampone di risospensione (K_2HPO_4 100 mM + EDTA 0,1 mM pH 7,4) rispetto al peso iniziale del tessuto. Infine, la frazione microsomiale è stata suddivisa in aliquote, a loro volta congelate in azoto liquido e conservate a -80°C fino al loro utilizzo (Longo V. et al., 1991).

7.5 Proteine totali

Il contenuto proteico totale è stato determinato secondo il metodo descritto da Lowry (1951), utilizzando come standard l'albumina sierica bovina.

7.6 Dosaggio del glutatione

L'analisi quantitativa del glutatione è stata effettuata tramite la reazione enzimatica di Ellman, attraverso una misurazione spettrofotometrica (Ellman G.L., 1959).

Il contenuto viene Calcolato come mg di glutatione /mg di proteine oppure su g di tessuto utilizzando il coefficiente di estinzione molare $\epsilon = 14,15 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

7.7 Indici di stress ossidativo

- **Perossidazione lipidica (saggio dei TBARS)**

La perossidazione lipidica è un processo che si verifica in presenza di stress ossidativo, di cui rappresenta un ottimo indicatore in cellule e tessuti. Il saggio per il monitoraggio della perossidazione lipidica è stato quello dei TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances), come descritto in Mihara M. and Uchiyama M., 1978.

- **Carbonilazione delle proteine**

Il contenuto delle proteine carbonilate rappresenta uno degli indicatori più comunemente utilizzati per stabilire il danno proteico dovuto allo stress ossidativo. Rispetto alle aldeidi (es. MDA), provenienti dalla perossidazione lipidica, le proteine carbonilate dosate con il saggio della DNPH (Mercier Y. et al., 2004; Terevinto A. et al., 2010) risultano più stabili e rendono tale metodica più affidabile per la determinazione di stress ossidativo.

7.8 Estrazione e quantificazione dei lipidi epatici

L'estrazione dei lipidi è stata effettuata direttamente a partire dal tessuto epatico, seguendo il metodo di Folch et al. (1957), opportunamente adattato al nostro sistema sperimentale.

7.9 Quantificazione del glicogeno epatico

La quantificazione del glicogeno rappresenta una metodica utile per la determinazione indiretta della presenza di insulino-resistenza, dal momento che l'insulina è il regolatore primario della produzione del glicogeno. Sono stati pesati ed omogenizzati 0,3 g di tessuto in 10 volumi di acido tricloroacetico (TCA) al 5%, rispetto al volume iniziale del tessuto (3 ml). L'omogenato è stato centrifugato a 4000 rpm per 7 minuti ed il sovrinatante è stato filtrato, tramite carta da filtro acidificata con TCA, in un cilindro graduato. Il pellet rimanente è stato accuratamente risospeso ed omogenizzato in 3 ml di TCA e, dopo centrifugazione a 4000 rpm per 7 minuti, è stato filtrato come in precedenza ed aggiunto alla prima frazione. Il filtrato ottenuto per ogni campione è stato portato ad un volume di 50 ml con TCA al 5%. Dopo aver prelevato 1 ml di questa soluzione, sono

stati aggiunti 3 ml di etanolo al 95% e poi tenuti a 37°C in agitazione per 3 ore, al fine di permettere la precipitazione del glicogeno. Nel periodo successivo all'incubazione, i campioni sono stati centrifugati per 15 minuti a 3000 rpm e delicatamente è stato rimosso il sovrnatante da ogni provetta. Il glicogeno precipitato è stato solubizzato in 1 ml di acqua bidistillata. Lo standard è costituito da 0,25 mg/ml di glucosio (concentrazione ottimale derivante da una curva standard), mentre il bianco è rappresentato da acqua bidistillata. Dopo aver aggiunto 5 ml di reagente antrone le provette sono state raffreddate in acqua fredda per 10 minuti, trasferite in acqua bollente per 15 minuti e riportate a temperatura ambiente. Questo processo idrolizza il glicogeno in monomeri di glucosio, favorendone la reazione con l'antrone e lo sviluppo di un prodotto, misurabile spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 620 nm (Roe J.H. and Dailey E.R., 1966).

7.10 Dosaggio del citocromo P450 (CYP)

Il dosaggio del citocromo P450 viene eseguito su frazioni microsomiali epatiche tramite una misurazione spettrofotometrica (Omura T. and Sato R., 1964).

7.11 Attività enzimatiche

- ***p*-Nitrofenolo idrossilasi (*p*-NPH)**

Si tratta di un saggio enzimatico ampiamente utilizzato per la determinazione dei livelli di CYP2E1 presenti nei microsomi epatici (Reinke L. A. and Moyer M. J., 1985).

- **Anilina idrossilasi (ANH)**

L'anilina è un substrato utilizzato per la determinazione dei livelli microsomiali epatici di CYP2E1 ed in misura minore di CYP1A2 (Ko I. Y. et al., 1987).

- **Benzilossichinolina debenzilasi (BQD)**

La reazione di debenzilazione della benzilossichinolina viene catalizzata dai CYP3A portando alla produzione di 7-idrossichinolina, che può essere quantificata mediante lettura fluorimetrica (Stresser D.M. et al., 2000).

- **Etossicumarina-O-deetilasi (ECOD)**

Questo saggio permette di determinare l'attività di diverse isoforme di citocromo P450 in frazioni microsomiali epatiche, fornendo una visione complessiva del livello di attività dei citocromi. (Aitio A., 1978).

- **Catalasi (CAT)**

La catalasi è uno dei principali enzimi antiossidanti presenti nella cellula. La reazione da essa catalizzata è la decomposizione di due molecole di perossido di idrogeno in ossigeno molecolare ed acqua. La sua attività viene determinata nel compartimento citosolico epatico (Aebi H., 1984).

- **Superossido dismutasi (SOD)**

La SOD costituisce un importante sistema antiossidante che protegge la cellula dalla tossicità dell'anione superossido. In questo saggio enzimatico l'attività della superossido dismutasi viene monitorata seguendo l'inibizione che l'enzima esercita sull'autossidazione del pirogallolo (Marklund S. and Marklund G., 1974).

- **Glutazione reduttasi (GSH-red)**

Il glutatione è un tripeptide antiossidante che si comporta da donatore di elettroni. Nella forma ridotta è capace di donare equivalenti riducenti alle specie reattive dell'ossigeno. L'attività della glutazione reduttasi viene monitorata allo spettrofotometro a 340 nm valutando il consumo di NADPH (Wheeler C. R. et al., 1990).

- **Glutazione perossidasi (GPX)**

La glutazione perossidasi (GPX) neutralizza il perossido di idrogeno o altri perossidi, trasformandoli in acqua o nell'alcol corrispondente mediante l'ossidazione di molecole organiche riducenti, come il glutatione (GSH). L'attività della GPx è monitorata spettrofotometricamente valutando il consumo del NADPH da parte della GSSG reduttasi, la quale ripristina il GSH che la GPx ha consumato per ridurre il perossido (Badary O.A. et al., 2005).

7.12 Estrazione dell'RNA e preparazione del cDNA

- **Estrazione dell'RNA totale**

I tessuti destinati all'estrazione dell'RNA sono stati prelevati in condizioni di sterilità e conservati a -80°C fino al loro utilizzo. La procedura di estrazione è stata effettuata utilizzando il kit commerciale *RNeasy® Mini kit* (Quiagen), che consente di ottenere una resa elevata lavorando a temperatura ambiente. Sono stati pesati circa 25 mg di fegato ed omogenizzati, mediante *Tissue Lyser* (Quiagen). La soluzione di lisi in cui è stato immerso il campione è costituita da 600 µl di "buffer RLT" e 6 µl di "β-mercaptoetanol", un agente riducente che inattiva le RNasi liberate durante la lisi cellulare e responsabili della degradazione dell'RNA. Dopo la lisi cellulare sono stati eseguiti passaggi standard di purificazione seguendo il protocollo descritto nel kit. L'eluato finale, contenente l'RNA totale, è stato conservato a -80°C fino al successivo utilizzo.

- **Dosaggio e determinazione della purezza dell'RNA**

La quantificazione dell'RNA totale di ciascun campione è stata eseguita mediante apposito spettrofotometro *BioPhotometer® D30*, che permette sia la determinazione della concentrazione di RNA sia la valutazione del suo grado di purezza. La concentrazione (espressa in ng/µl) viene misurata ad una lunghezza d'onda di 260 nm, corrispondente al picco massimo di assorbimento degli acidi nucleici. La purezza dell'RNA estratto viene determinata sulla base di parametri forniti dallo strumento, in particolare definisce i rapporti di assorbimento tra A260/A280 nm e A260/A230 nm. Il rapporto A260/A280 nm viene impiegato per stimare il grado di purezza degli acidi nucleici rispetto a contaminazioni proteiche, mentre il rapporto A260/A230 viene utilizzato per verificare la contaminazione del campione dovuta a carboidrati, fenoli, peptidi o composti aromatici. Rapporti molto vicini a 2 indicano un ottimo grado di purezza degli acidi nucleici (principalmente RNA) rispetto al contenuto di proteine. Per poter procedere alla retrotrascrizione a cDNA è indispensabile che l'RNA abbia una concentrazione superiore ad 80 ng/µl.

- **Trattamento con DNasi e retrotrascrizione dell'RNA**

L'eliminazione di eventuale DNA genomico contaminante e la retrotrascrizione dell'RNA sono stati effettuati in un singolo passaggio, mediante l'utilizzo del kit commerciale "iScript™ cDNA

Synthesis kit" (Bio-Rad). Per ciascun campione è stata preparata una miscela di reazione con un volume complessivo di 20 µl contenente 4 µl di *5x iScript reaction mix*, 1 µl di *iScript reverse transcriptase* e 15 µl distribuiti tra *nuclease-free water* ed *RNA template* (1 µg di RNA totale). Quindi, tutti i campioni sono stati incubati con i seguenti tempi e temperature: 5 minuti a 25°C, 30 minuti a 42°C, 5 minuti ad 85°C con *holding* di 10 minuti a 4°C. I campioni di cDNA così ottenuti sono stati conservati a -20°C fino al loro utilizzo.

7.13 PCR *real-time*

La PCR *real-time* è una tecnica di amplificazione del DNA in grado di misurare, in tempo reale, la formazione dei prodotti di PCR. Tale metodica consente anche la determinazione della quantità iniziale di DNA *target* presente all'interno di un campione biologico. La quantificazione in *real-time* viene effettuata grazie alla presenza della molecola fluorescente *SoFastTM EvaGreen[®] Supermix* (BioRad) che, intercalandosi al DNA a doppio filamento (dsDNA), emette una fluorescenza proporzionale all'incremento del numero di copie, a sua volta rilevata da un detector ed analizzata da uno specifico software. Tale metodica permette dunque di risalire all'esatto contenuto di DNA espresso in un tessuto in tempi e condizioni definite. In questo caso la metodica è stata applicata per analizzare l'espressione di geni coinvolti nel metabolismo lipidico, glucidico, del colesterolo, nel trasporto degli acidi biliari, e di quelli coinvolti nell'infiammazione e nello stress del RE e del mitocondrio. La miscela di reazione è stata allestita aggiungendo:

- 10 µl di *SoFastTM EvaGreen[®] Supermix* (Bio-Rad),
- 2 µl di primer senso (da soluzione 300 µM),
- 2 µl di primer antisenso (da soluzione 300 µM),
- 2 µl di cDNA (diluito 1:10) derivante da reazione di retrotrascrizione,
- µl di H₂O bidistillata sterile per ottenere un volume finale di 20 µl.

L'amplificazione è stata condotta utilizzando il programma suggerito dai produttori della miscela *SoFastTM EvaGreen[®] Supermix* (Bio-Rad) e la reazione è stata fatta avvenire in un termocicizzatore *Rotor-Gene[®] RG 3000* (Diatech). La quantificazione dei geni in esame è stata effettuata applicando un metodo relativo, che consiste nell'utilizzo di un gene endogeno (*housekeeping*), al fine di normalizzare il dato, in relazione ad eventuali variazioni dell'efficienza di reazione. Il gene *housekeeping* preso come riferimento in questo caso è stato quello della β-actina.

- **Primers**

I primer utilizzati sono riportati in tabella 3, con le relative sequenze e temperature di *annealing*. Questi ultimi sono stati disegnati secondo la seguente procedura:

- La sequenza nucleotidica relativa ai trascritti dei geni da analizzare è stata ricercata nella banca dati "Gene Bank" e quindi acquisita.
- Le varie sequenze nucleotidiche acquisite sono state allineate ed analizzate tramite il software CLUSTALW 1.61.
- Sono stati infine selezionati *primer* della lunghezza di circa 20 nucleotidi, mediante il software OLIGO (disponibile in rete). Nella scelta dei primer è inoltre importante che vengano osservati dei parametri fondamentali, tra cui il mantenimento del contenuto di guanina e citosina $\geq 50\%$ e l'assenza di sequenze complementari tra i due *primer* selezionati, per evitare la formazione di strutture stabili al 3' (loops). La non curanza di tali aspetti potrebbe essere causa di inefficienza della reazione di amplificazione.

Tabella 4. Primer utilizzati e relativa temperatura di *annealing*

Gene	Primer senso (5'...3')	Primer antisenso (5'...3')	Ta (°C)
SREBP-1c	CTGTCGTCTACCATAAGCTGCAC	ATAGCATCTCCTGCACACTCAGC	62
FAS	CACGGCGGCAGCAGGAACAG	AGCACTCTCAGACAGGCACTCAG	62
CPT1a	AGGTCTGGCTCTACCACGAT	CACTCTGTCTGCAGCAGTGA	58
SREBP-2	GCAACAACAGCAGTGGCAGAG	TGAGGGAGAGAAGGTAGACAATGG	62
HMGCR	CGACAGCACGAGCAGATTG	TGGACTGGAGACGGATGTAGAG	60
LXR α	TCCGCCGAGTGCATCAAGG	TTCCGCCGATGTAGCTGTCC	58
LDLr	AGATCTACAGCGCCGTGATG	CATCGATCCAGTCTACCGCC	58
PPAR α	CCATCTGTCTCTCTCCCA	CCTCTCCGAGGGACTGAGAA	58
ABCG5	GCACGCTTTTGCTCAGTGAA	GTTTCCACTCTCCAGCCGAA	62
PEPCK	GCTCACCTCTGGCCAAGATT	AGGCCCAGTTGTTGACCAA	58
G6Pase	GCTGGAGTCTTGTACGGCAT	GCCCCTTAGCAGCAGGTAA	64
GLUT2	TCACACCAGCACATACGACACC	GGACACAGACAGAGACCAGAGC	58
IRS1	GCCGCTCACTCTTCTTG	GCACTCTGGTTATGGTTGG	58
UPC2	CGTCTGCACTCTGTGTTCT	GCTATCATGGCCTGATCCCC	60
BIP	AGGAGGAGGACAAGAAGGAGGATG	TGAATACACCGACGCAGGAATAGG	60
CHOP	CGGGTGGCAGCGACAGAG	CAGGTGTGGTGTATGAAGATG	58
TGF β 1	ATTCTGGCGTTACCTTGG	CCTGTATCCGTCTCCTTGG	60
TNF α	AAAGCATGATCCGAGATGTG	AGCAGGAATGAGAAGAGGCT	56
IL6	TCCTACCCAACTCCAATGCTC	TTGGATGGTCTTGGCTTAGCC	62
β -actina	CCCCATTGAACACGGATT	CATCTTTTACGGTTGGCCTTA	60
LCAD	ATCGGTGGGGACTTGTGTGTC	TGTGGGAGCTCTTGCATGAG	58
HADH α	GCTCCATGTCTCTCTTCTCTG	CAGCCCGCCCGATGAC	58
XBP1	TCCGCAGCACTCAGACTAC	GGCAACAGCGTCAGAATCC	58
ACC1	GTCTACATCCGCTTGGCTGAG	CGCTCCTCAACTTGTCTCC	60
ChREBP	AGTTGGCGACAATAGTGG	GTATCCGAGTCCGAATCC	60
CYP2E1	TCCCCAAGTCTTTCACCAAGTT	GAGCCAAGGTGCAGTGTGAAC	58
CYP3A2	TCCTGGTGCTTCTTACCGA	GATGGCAAACACAGGCGTTT	58
CYP2C11	AGGAGGCTCAGTGCCTTGTG	CCAGGATAAAGGTGGGATCAAA	60
CYP27A1	TCACCGATGGCTGAGGAAGAG	CCCAGGCAGGACCGAACC	58
CYP7B1	ACTACAGAGCCGCCAGAG	GGTGACCGCAAAGAGAAGG	58
CYP8B1	CCAAGGACAAGGAGCAGGAC	CCAGCAGGGAGTAGACAAACC	58

MDR2	CCAATGTGCCAGTGCTTCAG	TGGACCACGGTGCTCTTC	58
MRP2	GGTCAGAAGCAGCGAGTCAGC	GAGCATCCACAGCCGACAGG	60
MRP4	TTCAGAGGCTTGGTTCTTGTCC	CCGAAGGCAACGACGATGAC	58
NTCP	GGCAAGGAAGGACAGCAGCAGAG	AGGCGGCAGGGAGAAATTGAAAGG	58
OATP1A1	GGCTTTTTGGTCTGTGCAGG	CACCTTGTGTTGCAGTCAGC	58
OATP1B2	CAGCTGTGAAAACGTGGTG	TGTCCATCCTTGCCCCATTC	58
SHP	GGCACTATCCTCTCAACCCA	TCCAGGACTTCACACAATGCC	60
SULT2A1	GTCCATGCGAGAATGGGACAA	TCATGAGGCCAATTCAGTAAA	60

7.14 Elettroforesi (SDS-PAGE) e Western blotting

- **Elettroforesi**

L' SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodiododecil solfato) è una tecnica elettroforetica che permette l'analisi di estratti proteici che vengono separati in base al loro peso molecolare. Nel nostro caso è stata fatta un' elettroforesi verticale su minigel di acrilammide al 10% di soluzione proteica seguendo la procedura precedentemente descritta (Laemli U.K., 1970).

- **Western blotting**

Le proteine, separate con l' elettroforesi in base al loro peso molecolare, sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa e rilevate con specifici anticorpi secondo il metodo descritto da Towbin H. et al., 1979.

L'analisi densitometrica delle bande è stata eseguita con il software *Image J*.

- **Dosaggio dei P450 2E1, 2C11 e 4A mediante Western blotting**

Sono stati caricati 2,5 µg di proteine microsomiali epatiche per il blotting relativo ai citocromi 2E1 e 4A, e 5 µg per quello del 2C11. Gli anticorpi primari policlonali anti-ratto, prodotti in capra (*goat anti-rat*) sono stati diluiti in TTBS 1:500 (anticorpo anti-2E1), 1:250 (anticorpo anti-4A) e 1:3000 (anticorpo anti-2C11) e lasciati in incubazione con la membrana per tutta la notte (circa 16 ore) in agitazione, a 4°C. Gli anticorpi secondari anti-capra, coniugati con la perossidasi, sono stati diluiti 1:8000 e incubati per 60 minuti a temperatura ambiente.

7.15 Analisi istologica

A seguito del sacrificio degli animali, è stata estratta una piccola porzione di fegato da ciascuno di essi. Una volta asportati dall'organismo di provenienza, i tessuti sono stati rapidamente fissati in formalina 10% ed analizzati con il metodo colorimetrico ematossilina-eosina.

7.16 Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata condotta mediante il metodo ANOVA ad una via, seguito dal post-test di Bonferroni, utilizzando il software *GraphPad PRISM 5*. L'intervallo di confidenza (IC) considerato è 0,95 ed i valori di significatività sono i seguenti:

- significativamente differente rispetto al gruppo di controllo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.
- significativamente differente rispetto al gruppo dieta iperlipidica ° $p < 0,05$; °° $p < 0,01$; °°° $p < 0,001$.

RISULTATI

Capitolo 8

RISULTATI

L' effetto della miscela degli estratti vegetali è stata valutata nel primo esperimento, come descritto nei materiali e metodi.

8.1 Incremento ponderale e peso relativo del fegato

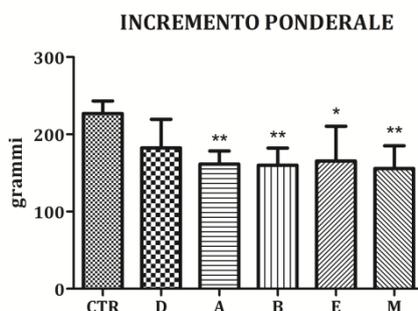


Figura 12. Incremento ponderale. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ rispetto al controllo.

I ratti sono stati pesati all'inizio e al termine del trattamento (vedi materiali e metodi) e per ciascun gruppo è stato calcolato l'incremento ponderale. Dai dati ottenuti (Figura 12) emerge un decremento significativo del peso corporeo tra i vari gruppi di trattamento, rispetto al controllo, ad eccezione del D.

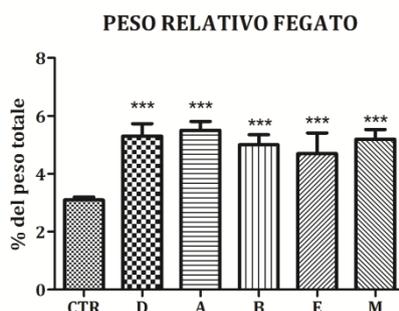


Figura 13. Peso relativo del fegato. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. *** $p < 0,001$ rispetto al controllo.

In seguito al sacrificio, sono stati effettuati espianto e determinazione del peso di ciascun fegato e, sulla base del peso dell'animale, è stato calcolato il peso relativo dell'organo. Come si può osservare dalla Figura 13, è evidente un incremento significativo del parametro in tutti gli HFD/STZ, rispetto al controllo.

8.2 Parametri ematici

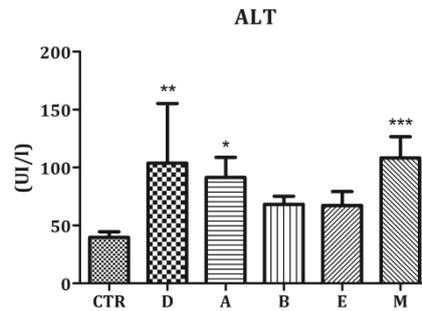


Figura 14. Dosaggio delle ALT ematiche. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ rispetto al controllo.

Nelle figure 14 e 15 sono riportati i valori delle transaminasi, alanina aminotransferasi (ALT) e aspartato aminotransferasi (AST) determinati su campioni ematici. Il primo parametro risulta significativamente indotto, primariamente in D, oltre che in A ed M, rispetto al controllo.

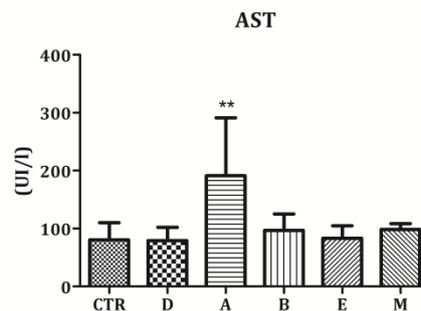


Figura 15. Dosaggio delle AST ematiche. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. ** $p < 0,01$ rispetto al controllo.

Per quanto concerne il dosaggio di AST (Figura 15), non si osservano particolari significatività tra i vari gruppi, fatta eccezione per A, nel quale tale enzima risulta significativamente indotto.

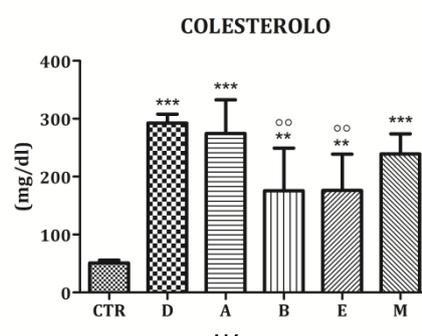


Figura 16. Dosaggio del colesterolo ematico. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ rispetto al controllo. ° $p < 0,01$ rispetto a D.

Per il dosaggio della componente lipidica sono stati determinati i valori di colesterolo totale, HDL, LDL e trigliceridi. In Figura 16 si può osservare un incremento simile e significativo del colesterolo ematico in D, A ed M, oltre che in B ed E. Tuttavia, questi ultimi evidenziano un significativo decremento di tale parametro rispetto ai ratti steatotici (D).

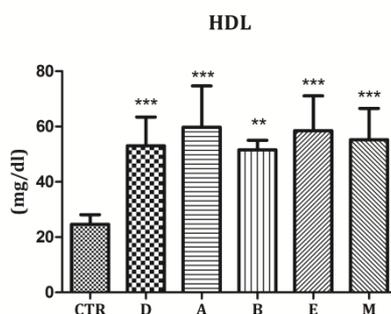


Figura 17. Dosaggio delle HDL ematiche. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ rispetto al controllo.

Il colesterolo HDL è risultato significativamente indotto in tutti i gruppi rispetto al controllo (Figura 17).

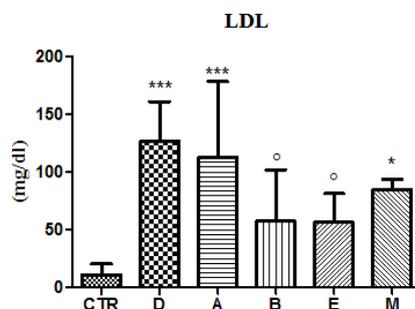


Figura 18. Dosaggio delle LDL ematiche. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ rispetto al controllo. ° $p < 0,01$ rispetto a D.

In Figura 18 sono riportati i valori del colesterolo LDL, che risultano ugualmente e significativamente indotti in D, A ed M., mentre è evidente una riduzione significativa in B ed E rispetto ai ratti steatotici.

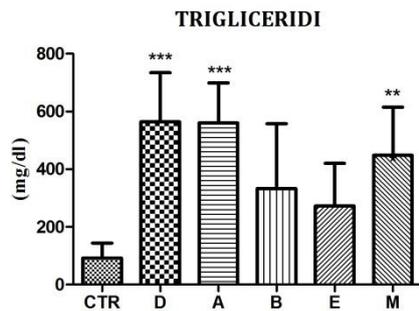


Figura 19. Dosaggio dei trigliceridi ematici. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo.

p<0,01; *p<0,001 rispetto al controllo.

I trigliceridi ematici risultano significativamente aumentati in D, A ed M rispetto al controllo. I gruppi B ed E non mostrano differenze significative rispetto al controllo. (Figura 19).

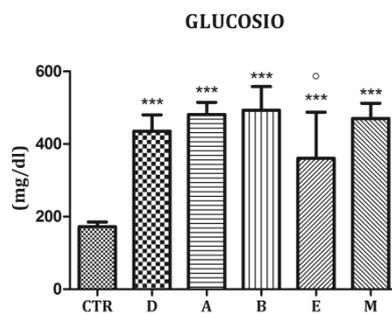


Figura 20. Dosaggio del glucosio ematico. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. ***p<0,001 rispetto al controllo. °p<0,05 rispetto al gruppo D.

Infine, in Figura 20 sono riportati i dati del glucosio ematico, in cui si osserva una significativa induzione in tutti i gruppi trattati rispetto al controllo. Soltanto il trattamento con l'eugenolo ha determinato un decremento significativo di tale parametro, rispetto al D.

8.3 Glutathione ridotto ed altri indici di stress ossidativo

Sui campioni di fegato è stato effettuato il dosaggio del glutathione ridotto (Figura 21) e la verifica della presenza di stress ossidativo mediante i saggi di perossidazione lipidica (Figura 22) e di carbonilazione delle proteine (Figura 23).

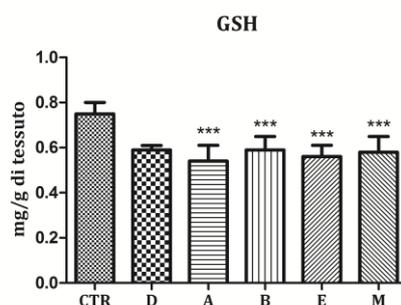


Figura 21. Dosaggio del glutathione ridotto nell'omogenato epatico in relazione ai g di tessuto. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. *** $p < 0,001$ rispetto al controllo.

I valori di GSH rapportati al tessuto evidenziano una significativa deplezione di tale molecola antiossidante in tutti i gruppi rispetto al controllo.

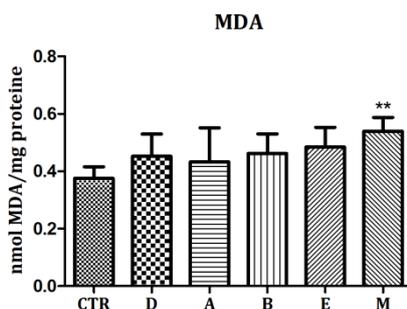


Figura 22. Perossidazione lipidica determinata nell'omogenato epatico. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. ** $p < 0,01$ rispetto al controllo.

Gli stessi trattamenti non hanno un simile effetto sulla perossidazione lipidica (Figura 22), determinata col saggio dei TBARS, che non rivela significative differenze tra i vari gruppi, rispetto al controllo.

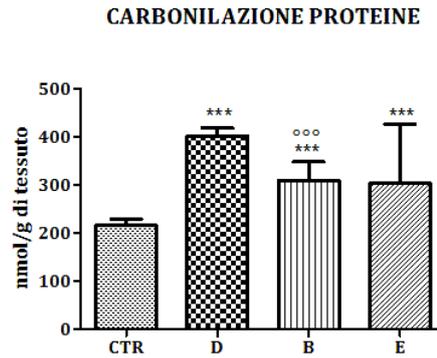


Figura 23. Carbonilazione delle proteine. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo.
 *** $p < 0,001$ rispetto al controllo. °°° $p < 0,001$ rispetto al gruppo D.

Di particolare interesse risultano i dati relativi alla carbonilazione delle proteine (Figura 23), dove si osserva una significativa induzione in tutti i gruppi di trattamento rispetto al controllo. Tuttavia i ratti che hanno ricevuto la miscela (1 mg/Kg di monocolina K) mostrano una significativa diminuzione delle proteine carbonilate, rispetto al D. Per questo saggio sono stati riportati solo i dati relativi a D, B ed E, dopo aver osservato la totale mancanza di un effetto in A ed M rispetto ai ratti steatotici.

8.4 Contenuto dei lipidi nel fegato

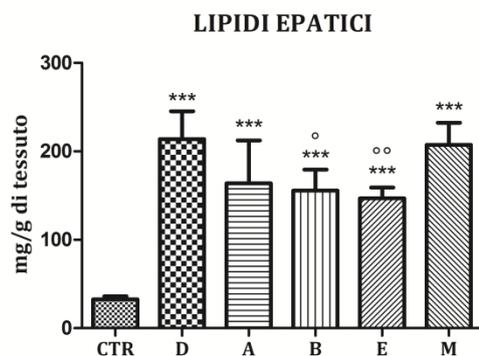


Figura 24. Lipidi determinati nel tessuto epatico.. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. ***p<0,001 rispetto al controllo; °p < 0,05; °°p < 0,01 rispetto al gruppo D.

In Figura 24 sono riportati i dati del contenuto di lipidi epatici, che risultano significativamente aumentati in tutti i gruppi, rispetto al controllo. È interessante notare come i valori di B ed E risultino significativamente ridotti rispetto al D.

8.5 Quantificazione del glicogeno epatico

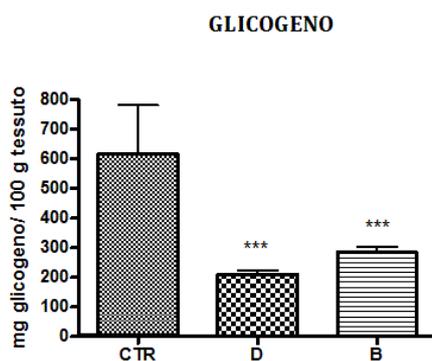


Figura 25. Quantificazione del glicogeno nel tessuto epatico. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. ***p<0,001 rispetto al controllo.

Al fine di valutare la sensibilità delle cellule epatiche al segnale dell'insulina, è stata effettuata, in CTR, D e B, la quantificazione del glicogeno epatico (Figura 25) Dai risultati ottenuti emerge una significativa riduzione del glicogeno in D e B, rispetto al controllo.

8.6 Attività degli enzimi microsomiali

Per quanto riguarda gli enzimi microsomiali, sono state prese in esame diverse attività enzimatiche dipendenti dal citocromo P450. È stato inoltre eseguito il dosaggio del citocromo P450 nelle varie frazioni microsomiali in CTR, D, B ed E.

- **Citocromo P450**

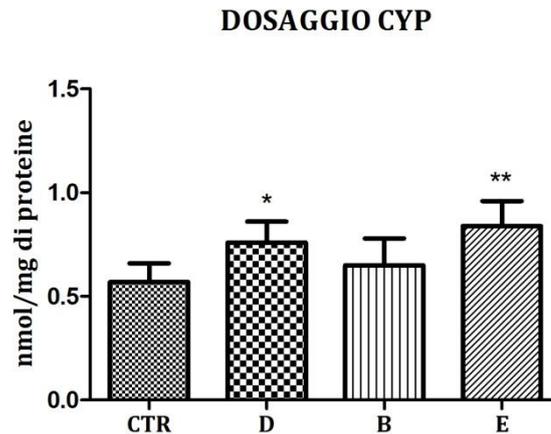


Figura 26. Dosaggio del CYP nelle frazioni microsomiali epatiche. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ rispetto al controllo.

Dal dosaggio del P450 si evince un'induzione significativa in D ed E, rispetto al controllo (Figura 26). Mentre il B non risulta significativamente diverso dal controllo.

Le differenze osservate nel contenuto di P450 ha richiesto un'analisi delle attività enzimatiche P450-dipendenti non solo in relazione al contenuto proteico microsomiale, ma anche in rapporto alle relative concentrazioni di P450.

- **ECOD**

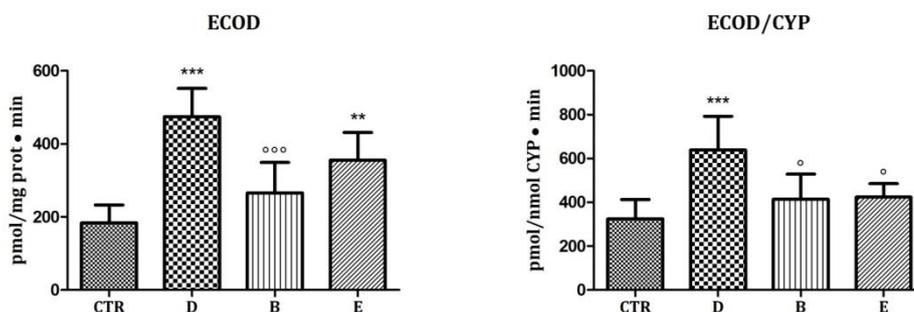


Figura 27. Attività ECOD nelle frazioni microsomiali epatiche. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ rispetto al controllo. ° $p < 0,05$; °° $p < 0,001$ rispetto al gruppo D.

Nella Figura 27 è riportata l'attività ECOD, dipendente da diverse isoforme di CYP, ed è stata calcolata sia rispetto alle proteine che ai citocromi, e in entrambi i casi i profili di attività sono pressochè sovrapponibili. Pertanto si osserva una significativa induzione di tale attività in D rispetto al controllo, ed una equivalente riduzione in B ed E, rispetto ai ratti steatotici.

- **Anilina idrossilasi e p-nitrofenolo idrossilasi**

Come attività marcatrici dell'isoforma CYP2E1, sono state determinate anilina idrossilasi (AnH) e p-nitrofenolo idrossilasi (p-NPH).

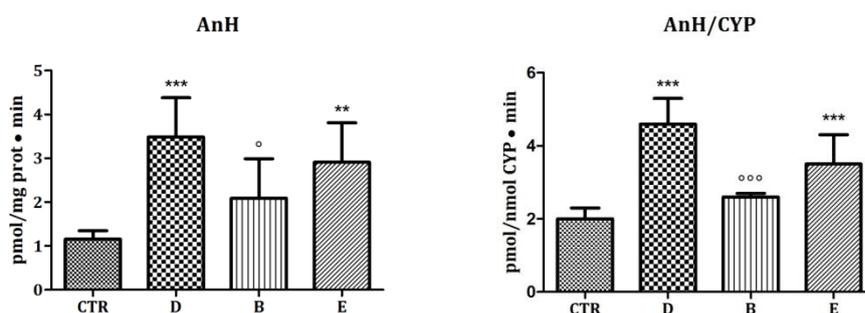


Figura 28. Attività AnH nelle frazioni microsomiali epatiche. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ rispetto al controllo. ° $p < 0,05$; °° $p < 0,001$ rispetto al gruppo D.

L'anilina idrossilasi, dipendente in minima parte anche dalle isoforme 1A1 e 1A2, risulta significativamente indotta, in modo analogo, sia in D che in E, rispetto al controllo. I ratti trattati con la miscela (B) presentano invece una riduzione significativa, rispetto al D (Figura 28), sia in relazione alle proteine che ai CYP.

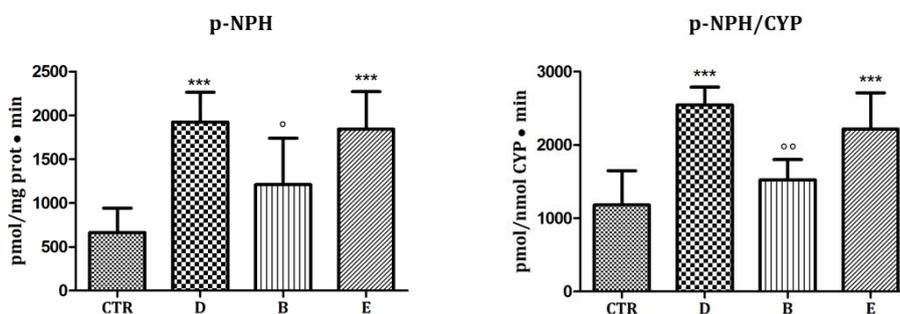


Figura 29. Attività p-NPH nelle frazioni microsomiali epatiche. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. *** $p < 0,001$ rispetto al controllo. ° $p < 0,05$; °° $p < 0,01$ rispetto al gruppo D.

Per quanto riguarda l'attività della *p*-NPH (Figura 29), più specifica per il 2E1, la situazione è pressoché paragonabile alla precedente. Tale quadro sta ad indicare che CYP2E1 rappresenta una rilevante porzione della popolazione di citocromi indotto nei ratti HFD/STZ, giustificando effetti più marcati di induzione e riduzione.

- **Benzilossichinolina debenzilasi (BQD)**

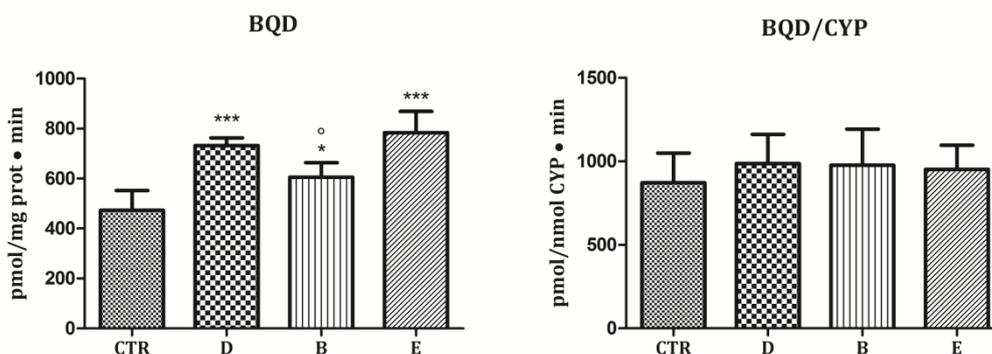


Figura 30. Attività BQD nelle frazioni microsomiali epatiche. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ rispetto al controllo. ° $p < 0,05$ rispetto al gruppo D.

Dalla Figura 30 è evidente che l'attività della benzilossichinolina debenzilasi (BQD), marcatrice delle isoforme della sottofamiglia dei CYP3A, aumenta significativamente in D ed E e in maniera meno rilevante in B, rispetto al controllo. Tuttavia, il B, oltre a risultare indotto rispetto al controllo, è anche significativamente diminuito rispetto al D (Figura 30). La stessa attività sembra non mostrare significative variazioni se calcolata in relazione al contenuto di citocromi (Figura 30). Ciò sta a significare che l'attività dei CYP3A è presente, nelle popolazioni delle varie isoforme di CYP, in proporzioni analoghe nel controllo e nei trattati.

8.7 Enzimi citosolici

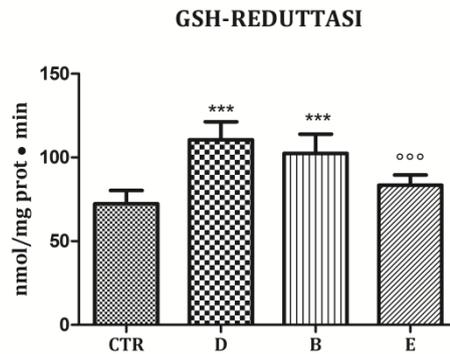


Figura 21. Attività glutazione reduttasi nelle frazioni citosoliche epatiche. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. ***p < 0,001 rispetto al controllo. °°°p < 0,001 rispetto al gruppo D.

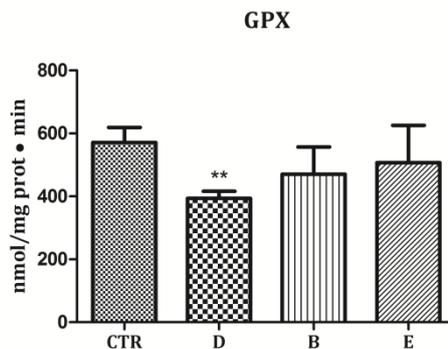


Figura 32. Attività glutazione perossidasi nelle frazioni citosoliche epatiche. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. **p < 0,01 rispetto al controllo.

Nelle figure 31 e 32 sono riportati i risultati riguardanti il dosaggio enzimatico di glutazione reduttasi e glutazione perossidasi. L'attività della glutazione reduttasi risulta aumentata in modo simile e significativo sia nei ratti trattati con dieta iperlipidica (D) che in quelli trattati con la miscela (B), rispetto al controllo. Una riduzione significativa di tale attività enzimatica si osserva, invece, nei ratti trattati con eugenolo (E), rispetto al D. L'attività della glutazione perossidasi (Figura 32) va incontro ad una riduzione significativa soltanto nel D, rispetto al controllo.

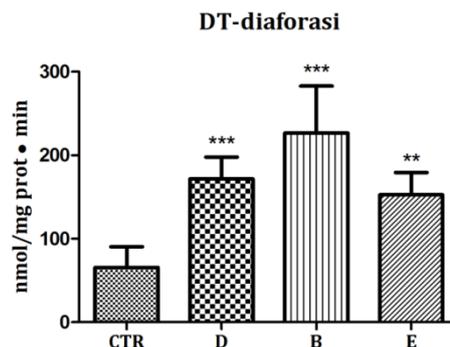


Figura 33. Attività DT-diaforasi nelle frazioni citosoliche epatiche. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. **p < 0,01; ***p < 0,001 rispetto al controllo.

L'attività della DT-diaforasi risulta indotta, in maniera significativa, in D, B ed E, rispetto al controllo (Figura 33).

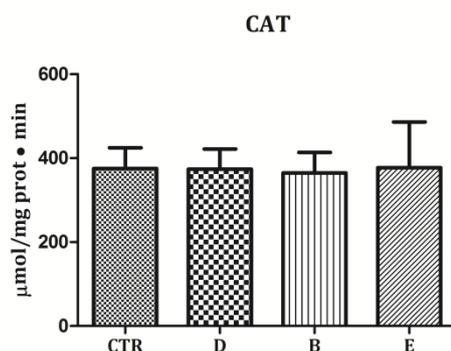


Figura 34. Attività catalasi nelle frazioni citosoliche epatiche. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo.

L'attività della catalasi (Figura 34) non rivela significative differenze tra i vari gruppi.

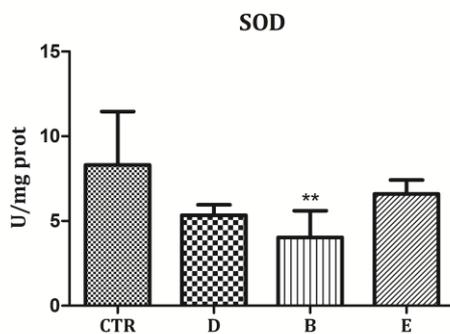


Figura 35. Attività superossido dismutasi nelle frazioni citosoliche epatiche. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. **p < 0,01; rispetto al controllo.

Per quanto riguarda la superossido dismutasi, non si osservano significative differenze rispetto al controllo, ad eccezione di B, che è significativamente ridotto (Figura 35).

8.8 Analisi di espressione genica

Sulla base dei risultati relativi all'effetto della miscela sulla steatosi epatica, si è ritenuto opportuno effettuare una serie di PCR *real-time* (specificatamente su tessuto epatico), al fine di analizzare l'espressione genica di fattori chiave del metabolismo lipidico. L'analisi è stata poi estesa anche ad alcuni dei geni implicati nel metabolismo del colesterolo e del trasporto degli acidi biliari, del metabolismo glucidico (trattandosi di ratti con diabete mellito), oltre che ai geni dell'infiammazione e dello stress del reticolo endoplasmatico.

- **Geni del metabolismo lipidico**

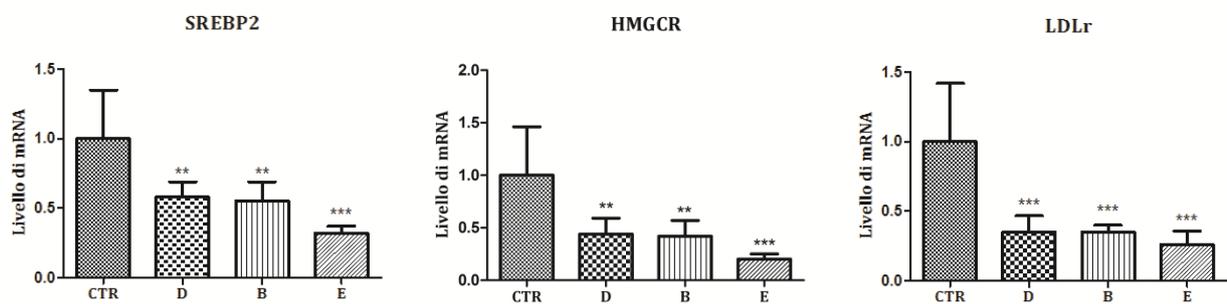


Figura 36. RT-PCR quantitativa per l'espressione dei geni SREBP2, HMGCR ed LDLr. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. **p < 0,01; ***p < 0,001 rispetto al controllo.

In Figura 36 è riportata l'espressione dei geni SREBP2, HMGCR ed LDLr, coinvolti nell'omeostasi del colesterolo. L'espressione di SREBP2 è significativamente ridotta in tutti i gruppi di trattamento rispetto al controllo. Un decremento simile e significativo si ripresenta anche per i geni HMGCR che LDLr.

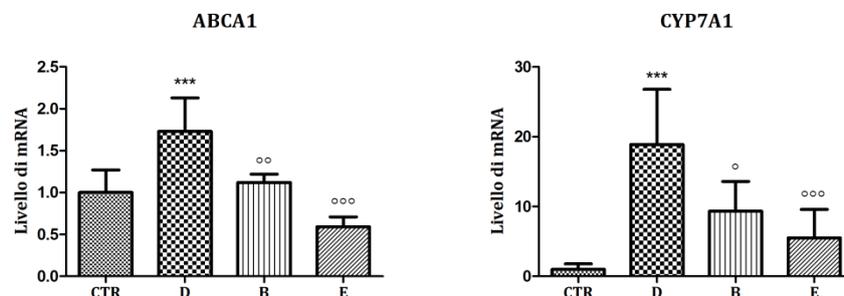


Figura 37. RT-PCR quantitativa per l'espressione dei geni ABCA1 e CYP7A1. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. ***p < 0,001 rispetto al controllo. °p < 0,05; °°p < 0,01; °°°p < 0,001 rispetto al gruppo D.

ABCA1, gene implicato nella formazione del colesterolo HDL, risulta significativamente indotto in D rispetto al controllo. Appare invece significativamente ridotto in B ed E rispetto al D. L'espressione di CYP7A1, gene chiave nella sintesi degli acidi biliari, è significativamente indotta soltanto nel D rispetto al controllo. Inoltre, sia i ratti trattati con l'eugenolo che quelli con la miscela mostrano un decremento significativo rispetto ai ratti steatotici (D) (Figura 37).

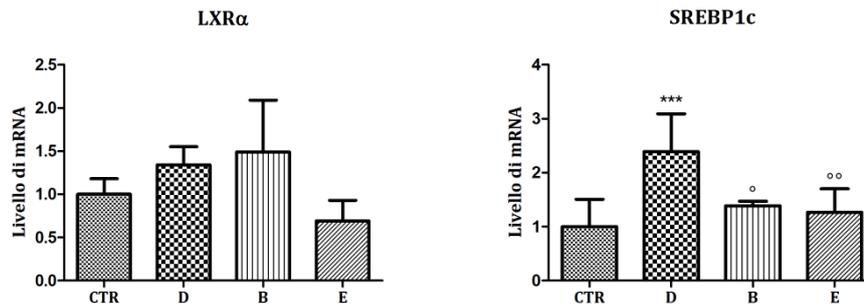


Figura 38. RT-PCR quantitativa per l'espressione dei geni LXRα e SREBP1c. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. ***p < 0,001 rispetto al controllo. °p < 0,05; °°p < 0,01 rispetto al gruppo D.

Nella Figura 38 è riportata l'espressione dei geni LXRα e a SREBP1c, fattori di trascrizione implicati nella lipogenesi. Per quanto riguarda LXRα, non si osservano differenze significative tra i vari gruppi. Diversamente, l'espressione di SREBP1c risulta significativamente indotta in D rispetto al controllo. B ed E mostrano invece una significativa riduzione, rispetto al D.

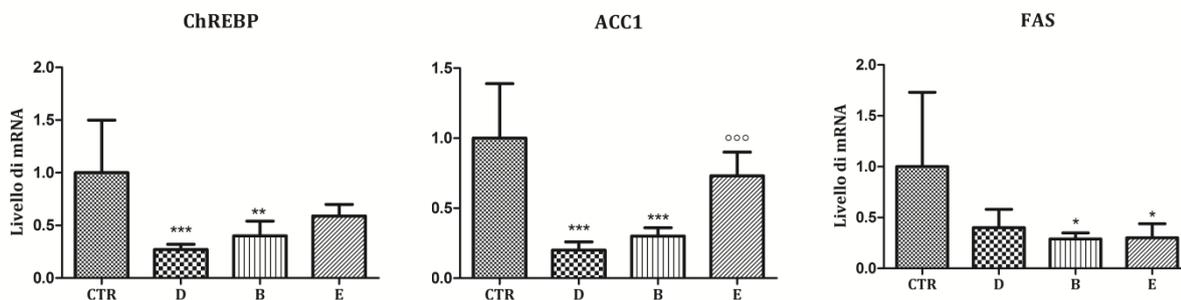


Figura 39. RT-PCR quantitativa per l'espressione dei geni ChREBP, ACC1 e FAS. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 rispetto al controllo. °°p < 0,001.

In Figura 39 sono riportati i livelli di espressione relativi ai geni ChREBP, ACC1 e FAS. Dai risultati ottenuti emerge una significativa riduzione per tutti i gruppi di trattamento dei tre geni, rispetto al controllo. E mostra un aumento significativo di ACC1, rispetto al D.

- **Geni mitocondriali**

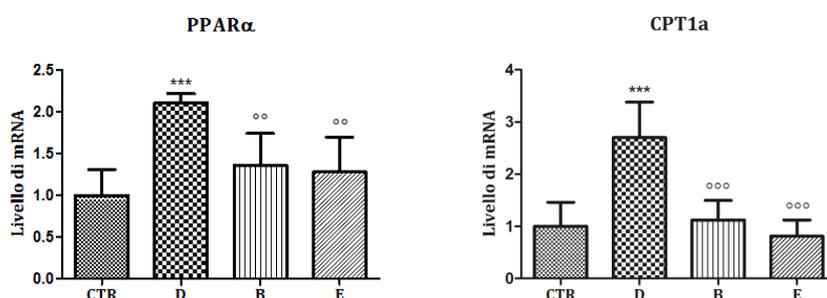


Figura 40. RT-PCR quantitativa per l'espressione dei geni PPARα e CPT1a. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. ***p < 0,001 rispetto al controllo. °p < 0,01; °°p < 0,001 rispetto al gruppo D.

In Figura 40 sono rappresentati i risultati relativi all'espressione dei geni PPARα e CPT1a. Entrambi i geni risultano significativamente indotti solo nei ratti steatotici rispetto al controllo, mentre in B ed E, questi risultano significativamente ridotti rispetto al D.

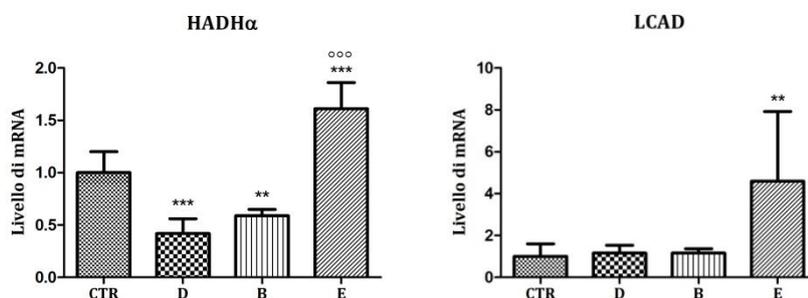


Figura 41. RT-PCR quantitativa per l'espressione dei geni HADHα e LCAD. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. **p < 0,01; ***p < 0,001 rispetto al controllo. °°°p < 0,001 rispetto al gruppo D.

Dall'analisi dei geni HADH α ed LCAD si osserva, per il primo, una significativa riduzione di D e B rispetto al controllo, mentre E risulta significativamente aumentato sia rispetto al controllo che al D. Per quanto riguarda l'espressione del gene LCAD non si evince alcuna differenza significativa in D e B rispetto a CTR. Ancora una volta, E risulta significativamente indotto rispetto al controllo (Figura 41).

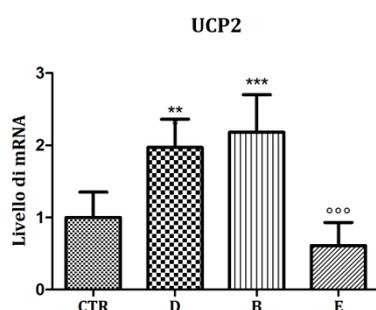


Figura 42. RT-PCR quantitativa per l'espressione del gene UCP2. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. **p < 0,01; ***p < 0,001 rispetto al controllo. ooo p < 0,001 rispetto al gruppo D.

In Figura 42 è riportata l'espressione del gene UCP2, implicato nel trasferimento dei protoni dallo spazio intermembrana alla matrice mitocondriale, regolando la produzione di ATP. Dai risultati emerge una significativa induzione del gene nei gruppi D e B, rispetto al controllo ed una significativa riduzione nel gruppo E rispetto al D.

- **Geni dello stress del reticolo endoplasmatico**

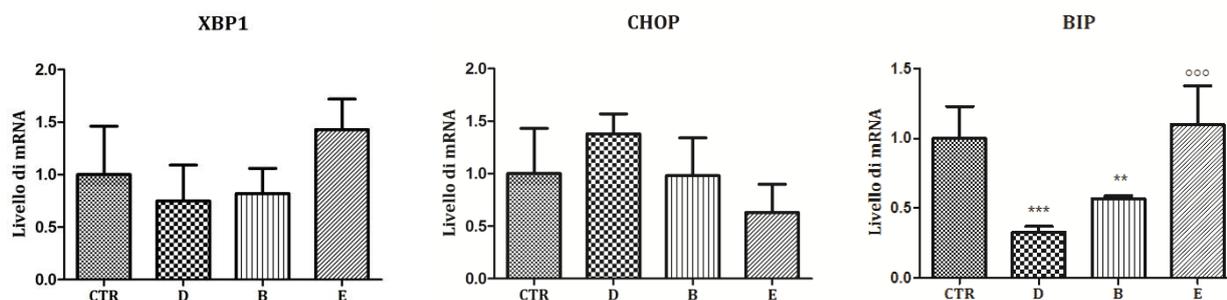


Figura 43. RT-PCR quantitativa per l'espressione dei geni XBP1, CHOP e BIP. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. **p < 0,01; ***p < 0,001 rispetto al controllo. ooo p < 0,001 rispetto al gruppo D.

In Figura 43 è riportata l'espressione dei geni XBP1, CHOP e BIP. Non si riscontra alcuna differenza significativa rispetto al controllo, in D, B ed E per nessuno dei primi due geni. Per quanto riguarda l'espressione di BIP, si osserva un significativo decremento, rispetto al controllo, in D e B. E invece tende a riportare l'espressione verso i valori di controllo, risultando significativo rispetto al D.

- **Geni del metabolismo glucidico**

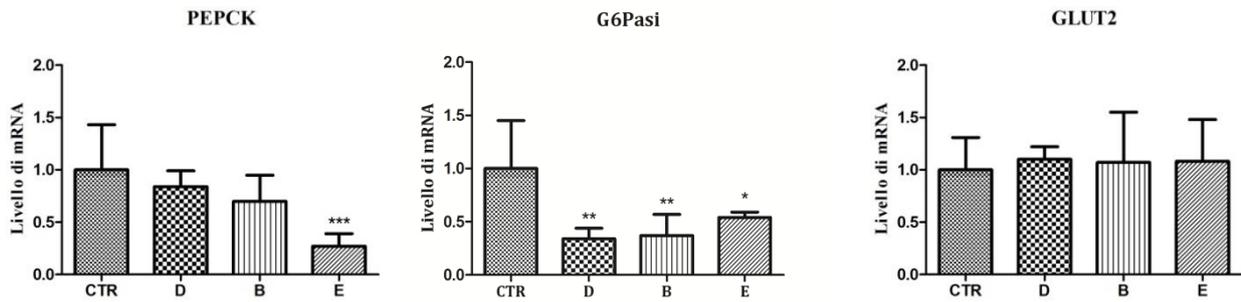


Figura 44. RT-PCR quantitativa per l'espressione dei geni PEPCK, G6Pasi e GLUT2. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ rispetto al controllo.

PEPCK è significativamente ridotto soltanto nei ratti trattati con eugenolo, rispetto a quelli di controllo. Per quanto riguarda il gene G6Pasi, si osserva un decremento significativo in D, B ed E rispetto al controllo. Nessuna differenza significativa si riscontra nell'espressione del gene GLUT2, rispetto al controllo (Figura 44).

- **Geni dell'infiammazione**

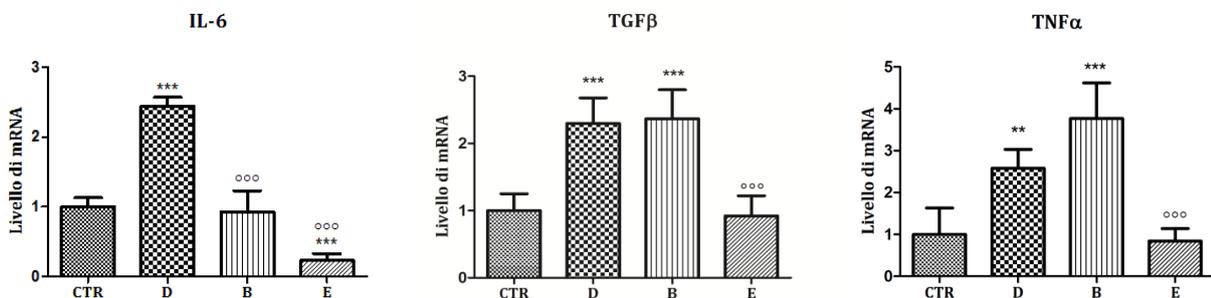


Figura 45. RT-PCR quantitativa per l'espressione dei geni IL-6, TGFβ e TNFα. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ rispetto al controllo. °°° $p < 0,001$

Dall'analisi dei geni dell'infiammazione, IL-6, TGFβ e TNFα (Figura 45), è emerso che questi ultimi vengono significativamente indotti dalla dieta iperlipidica, rispetto al controllo. Per quanto riguarda i gruppi di trattamento, è possibile osservare un significativo decremento esercitato dall'eugenolo, rispetto al D di tutti e tre i geni in questione. L'effetto antinfiammatorio esercitato dal B è osservabile soltanto nel gene IL-6.

8.9 Analisi delle proteine - *Western blotting*

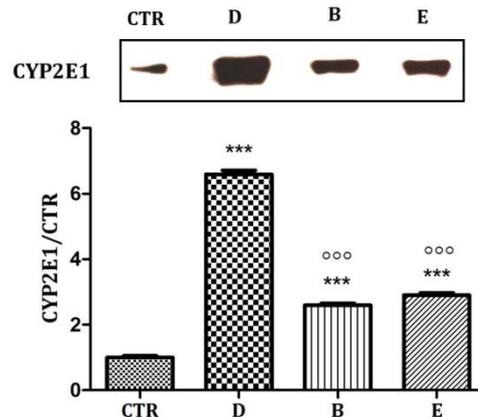


Figura 47. Western blotting per la proteina CYP2E1. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. *** $p < 0,001$ rispetto al controllo. °°° $p < 0,001$ rispetto al gruppo D. I dati sono normalizzati rispetto al controllo.

Nei campioni di fegato sono state determinate le espressioni proteiche di tre isoforme di citocromo P450, mediante *Western blotting*. La quantificazione di ciascun campione è stata realizzata mediante analisi densitometrica con l'utilizzo del *software ImageJ*, normalizzando i valori in relazione all'espressione del controllo. In Figura 47 è possibile osservare una significativa induzione dell'isoforma proteica di CYP2E1, rispetto al controllo ed una simile e significativa riduzione della medesima nei gruppi B ed E, rispetto ai ratti HFD/STZ (D).

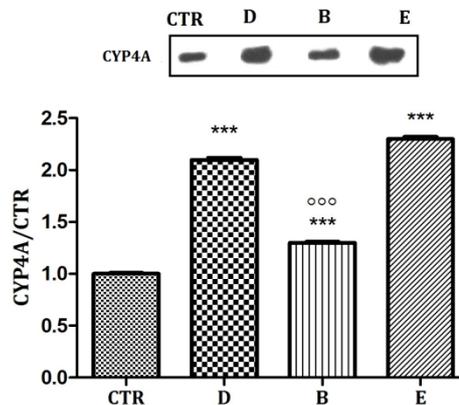


Figura 48. Western blotting per la proteina CYP4A1. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. *** $p < 0,001$ rispetto al controllo. °°° $p < 0,001$ rispetto al gruppo D. I dati sono normalizzati rispetto al controllo.

L'espressione proteica del CYP4A (Figura 48) è significativamente indotta in D ed E, rispetto al controllo, mentre una significativa riduzione si osserva in B, rispetto ad HFD/STZ.

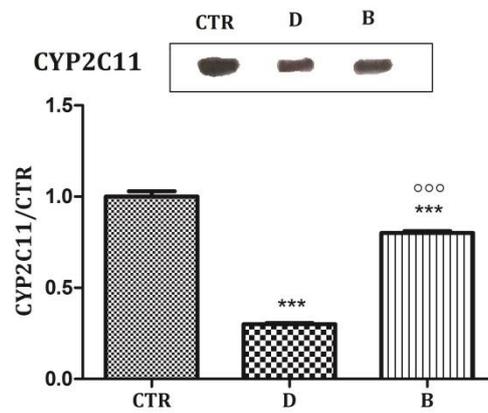


Figura 49. Western blotting per la proteina CYP2C11. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. *** $p < 0,001$ rispetto al controllo. °°° $p < 0,001$ rispetto al gruppo D. I dati sono normalizzati rispetto al controllo.

I risultati relativi all'espressione proteica del CYP2C11 (Figura 49) evidenziano una significativa riduzione della proteina in D, rispetto al controllo. I ratti trattati con la miscela mostrano un significativo ripristino dei valori di controllo.

8.10 Analisi istologica

Per verificare che i diversi tipi di trattamento avessero provocato cambiamenti nella morfologia del tessuto è stata eseguita l'analisi istologica mediante colorazione con ematossilina-eosina. Come si osserva nella Figura sottostante (Figura 50), dal punto di vista istologico è evidente la presenza di steatosi (macrovescicolare e microvescicolare) nei ratti HFD/STZ (D). Non è stato evidenziato alcun miglioramento in tutti gli altri casi (B, M ed E).

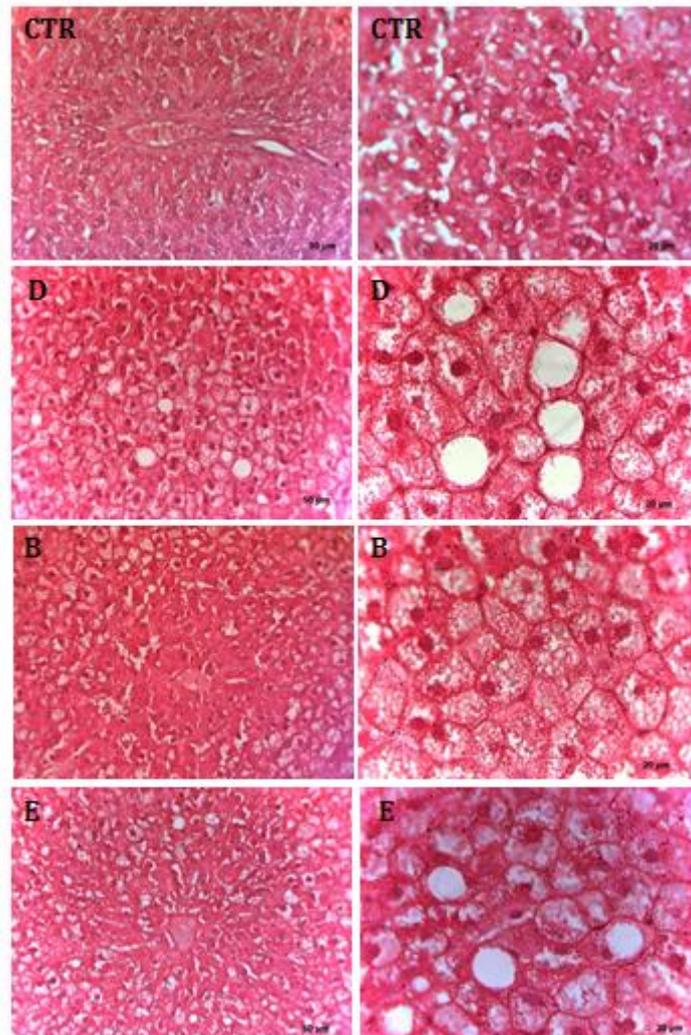


Figura 50. Analisi istologica su tessuto epatico mediante colorazione con ematossilina-eosina. Immagini relative ai gruppi CTR, D, B ed E.

8.11 Caratterizzazione del metabolismo del colesterolo e trasporto degli BAs nel modello HFD/STZ: analisi dell'espressione genica

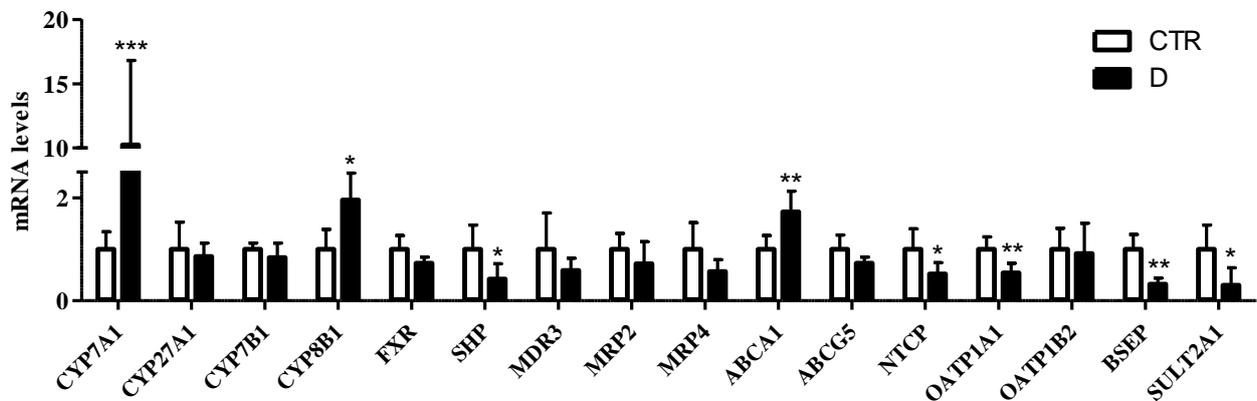


Figura 51. RT-PCR quantitativa per l'espressione dei geni CYP7A1, CYP27A1, CYP7B1, CYP8B1, FXR, SHP, MDR3, MRP2, MRP4, ABCA1, ABCG5, NTCP, OATP1A1, OATP1B2, BSEP, SULT2A1. I valori riportati sono stati calcolati come media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti condotti su 6 ratti per gruppo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ rispetto al controllo.

Per valutare l'espressione di geni non precedentemente descritti in un modello di steatosi, abbiamo predisposto un nuovo esperimento utilizzando due nuovi gruppi sperimentali di ratti HFD/STZ (CTR e D).

Alcuni dei principali geni coinvolti nel metabolismo del colesterolo e nel trasporto degli acidi biliari come CYP7A1, CYP27A1, CYP8B1, CYP7B1, FXR, SHP, MDR3, MRP2, MRP4, ABCA1, ABCG5, NTCP, OATP1A1, OATP1B2, BSEP e SULT2A1, sono stati analizzati nei campioni CTR e D attraverso la RT-PCR quantitativa. Come riportato in Figura 56, il gruppo HFD/STZ, rispetto al controllo, ha mostrato una forte induzione del CYP7A1 ($p < 0.001$), un significativo aumento dell'espressione genica di CYP8B1 ($p < 0.05$) e ABCA1 ($p < 0.05$), ed una diminuzione significativa dell'espressione di SHP ($p < 0.05$), NTCP ($p < 0.05$), OATP1A1 ($p < 0.01$), BSEP ($p < 0.01$), e SULT2A1 ($p < 0.05$). Al contrario, l'espressione di CYP27A1 e CYP7B1 è risultata invariata, mentre è stata osservata una riduzione, seppur non significativa, dell'espressione genica di FXR, MDR3, MRP2, MRP4, ABCG5 e OATP1B2 (Figura 51).

DISCUSSIONE

DISCUSSIONE

La NAFLD è una patologia epatica caratterizzata dall'accumulo di trigliceridi, prodotti per esterificazione di acidi grassi liberi e glicerolo all'interno degli epatociti (Hassan K. et al., 2014). Secondo la teoria dei due colpi, questa patologia necessita di due principali eventi per essere innescata. Il primo evento è rappresentato dall'accumulo di TG negli epatociti, a cui deve far seguito un qualsiasi insulto di tipo ossidativo che porti alla produzione di ROS e di aldeidi tossiche (es. malondialdeide ed idrossinonenale) capaci di innescare vari processi, inclusa la trascrizione di NF-kB (regolatore dei geni dell'infiammazione), portando così a necroinfiammazione e fibrosi (Day C.P. e James O.F., 1998). Le principali fonti di acidi grassi che si accumulano nel fegato sono rappresentate da lipolisi, lipogenesi, dieta ed inibizione della β -ossidazione.

Appropriati modelli animali di NAFLD sono stati sviluppati al fine di studiarne i principali meccanismi patogenetici e di formulare nuovi farmaci per il suo trattamento. L'elemento che maggiormente accomuna i diversi modelli è rappresentato dal trattamento dell'animale con dieta iperlipidica. Fino ad oggi però, nessun modello animale di NAFLD è in grado di riprodurre fedelmente le caratteristiche fisiopatologiche della malattia umana (Kucera O. et al., 2011). Tra i diversi modelli, quello che prevede la somministrazione di una dieta iperlipidica ed una bassa dose di STZ (35 mg/Kg) ha raccolto sempre più consensi da parte degli studiosi, dal momento che riproduce anche il diabete di tipo 2, mediante induzione di morte selettiva delle cellule β -pancreatiche, riducendo la secrezione di insulina e quindi la tolleranza del glucosio (Reed M.J. et al., 2000; Srinivasan K. et al., 2005). Dal momento che in circa il 75% dei casi di NAFLD nell'uomo, si osserva una concomitante presenza del diabete di tipo 2, questo modello rispecchia più fedelmente il quadro umano ed è quello del quale ci siamo avvalsi per questo lavoro. Gli obiettivi principali di questa tesi sono stati quelli di caratterizzare il modello per quel che concerne il drug metabolism e, a livello genico, i metabolismi del colesterolo, lipidico, glucidico e dei trasportatori degli BAs. Inoltre abbiamo valutato i potenziali effetti antisteatotici esercitati da una miscela di estratti vegetali, i cui componenti (riso rosso fermentato, caigua, soia, erba medica e carciofo), sono già documentati in letteratura per le specifiche proprietà ipolipidemiche (Clinton W. et al., 2012; Kim Y. et al., 2014) ed antiossidanti (Lee C.C. et al., 2015; Sankar P. et al., 2015), anche se con dati contrastanti.

Per tutti i parametri presi in esame, i ratti che hanno assunto con la miscela 0,3 mg/Kg di monacolina K non hanno mostrato segni di miglioramento rispetto ai ratti HFD/STZ. Per questo

motivo sono stati discussi soltanto i risultati ottenuti dal trattamento con la miscela a maggiore dosaggio di monacolina K (1 mg/Kg).

La caratteristica primaria del diabete, sia esso insulino-dipendente che non, è la mancata attivazione del segnale dell'insulina, che regola svariate vie. Pertanto, per verificare lo stato diabetico nella steatosi e per valutare l'effetto del trattamento su quest'ultima, sono state prese in esame diverse vie regolate dall'insulina. Tra queste, la sintesi del glicogeno (dosato con un saggio biochimico descritto in bibliografia ma messo a punto per questo caso specifico) è risultata significativamente ridotta rispetto al controllo, sia in assenza che in presenza di trattamento con estratti vegetali. Dal momento che la sintesi del glicogeno è regolata direttamente dall'insulina, tale risultato conferma l'assenza dell'insulina nei ratti HFD/STZ ed un mancato effetto su questa via da parte della miscela (Naowaboot J. et al., 2015).

La presenza del diabete (confermata da valori di glicemia >250 mg/dl, corrispondenti a 14 mmol/l) ha anche provocato una significativa riduzione del peso corporeo in tutti i ratti HFD/STZ. Ciò è dovuto al fatto che l'assenza del segnale dell'insulina induce la lipolisi nel tessuto adiposo ed una degradazione proteica in quello muscolare (Subash-Babu P. et al., 2007). Contrariamente all'incremento ponderale, il peso relativo del fegato è risultato significativamente aumentato in tutti i ratti con steatosi epatica, come riportato in letteratura e la miscela non ha esercitato alcun effetto su questi due parametri (Kucera O. et al., 2011). L'incremento del peso relativo del fegato è avvalorato dal corrispondente incremento di lipidi epatici, confermando la presenza di steatosi nel modello in questione. I ratti trattati con la miscela hanno riportato una significativa riduzione dei lipidi epatici, a riprova di un'azione ipolipidemica. Per quanto riguarda le transaminasi è stata osservata un'induzione dell'alanina aminotransferasi (ALT), un valido marcatore di NAFLD nell'uomo (Bi W.R. et al., 2014), indice della tossicità indotta dalla dieta HFD/STZ nel fegato, sebbene non si evidenzino, da un punto di vista istologico, fenomeni di necrosi cellulare. Anche il significativo incremento di parametri ematici quali colesterolo totale, LDL, trigliceridi e glucosio, nei ratti HFD/STZ, rispecchia il quadro tipico della steatosi epatica (Mnafgui K. et al., 2012). Il trattamento ha determinato una significativa riduzione di colesterolo totale ed LDL, lasciando alti ed invariati i valori di HDL. Il trattamento con la miscela non ha avuto effetto sulla concentrazione di glucosio ematico, diversamente dal controllo positivo (eugenolo), già noto per le sue proprietà ipoglicemicizzanti (Srinivasan S. et al., 2013). Possiamo quindi ipotizzare che la miscela non abbia esercitato un effetto ipoglicemicizzante.

L'accumulo di grassi nel fegato può essere dovuto al contributo di diverse vie, tra cui l'aumentata disponibilità di acidi grassi dal tessuto adiposo (lipolisi), la sintesi *de novo* degli acidi grassi, la ridotta attività degli enzimi della β -ossidazione, e la diminuita esportazione di acidi grassi sotto forma di VLDL (Postic C. and Girard J., 2008). Per valutare l'effetto della miscela su queste vie, sono stati analizzati diversi geni, tra cui LXR α e SREBP1c. Il primo è un fattore trascrizionale, i cui ligandi sono gli ossidi del colesterolo, che lo attivano e determinano la trascrizione dei suoi geni *target*, tra cui SREBP1c, gene chiave della sintesi *de novo* degli acidi grassi (Higuchi N. et al., 2008). Dai dati ottenuti, la miscela, similmente all'eugenolo (Jo H.K. et al., 2014), ha esercitato un effetto inibitorio sull'espressione di SREBP1c, che nel gruppo HFD/STZ era risultato significativamente indotto rispetto al controllo. L'espressione dei geni regolati da SREBP1c, quali ACC1 e FAS, è risultata ridotta in tutti i gruppi rispetto al controllo, in linea con la diminuita espressione di ChREBP (regolatore, insieme a SREBP1c, dei geni ACC1 e FAS). Dal momento che ChREBP è attivato da un intermedio metabolico della glicolisi, è plausibile che l'assenza di insulina in tale modello abbia determinato l'inibizione della glicolisi e quindi di ChREBP, come descritto in letteratura (Agius L., 2013).

In assenza di lipogenesi, una possibile causa di accumulo degli acidi grassi è l'inibizione della β -ossidazione mitocondriale. PPAR α regola l'espressione dei principali geni dell'ossidazione, nei mitocondri, nei perossisomi e nei microsomi (Kohjima M. et al., 2007). Il CPT1a è invece il regolatore primario del flusso degli acidi grassi dal citosol al mitocondrio e la sua espressione è indotta dal PPAR α attivato, ed inibita allostericamente dal malonil-CoA, il metabolita derivante dall'attività di ACC1 nella lipogenesi. La β -ossidazione è poi catalizzata da alcuni enzimi, tra cui le deidrogenasi LCAD ed HADH α (Musso G. et al., 2009). Dai dati ottenuti, l'espressione genica di PPAR α e di CPT1a è superiore nel gruppo HFD/STZ rispetto al controllo, riducendosi invece nei gruppi B ed E. Diversamente, i trascritti delle deidrogenasi mitocondriali, LCAD ed HADH α , sono risultati ridotti. I nostri dati sono in accordo con la letteratura in relazione al malfunzionamento della β -ossidazione in presenza di NAFLD, legato primariamente ad una disfunzione mitocondriale (Liu X. et al. 2015). Inoltre, La presenza della miscela o dell'eugenolo ha ridotto l'espressione di PPAR α e di CPT1a, regolarizzando la via di ossidazione degli acidi grassi. La disfunzione mitocondriale è confermata dall'aumentata espressione, nei gruppi D e B, di UCP2, gene chiave nella regolazione del bilancio energetico del mitocondrio (Xu H. et al., 2015). La stessa induzione non è riscontrabile invece nel gruppo E, che, oltre a mostrare un significativo decremento a favore di UCP2, ha rivelato un evidente innalzamento dell'espressione delle deidrogenasi mitocondriali.

Sono stati inoltre analizzati i geni coinvolti nell'*up-take* e nella sintesi del colesterolo, SREBP2, HMGCR ed LDLr. SREBP2 è un fattore trascrizionale che regola l'espressione di HMGCoA reduttasi, (gene chiave nella sintesi endogena del colesterolo) e di LDLr (responsabile dell'*up-take* del colesterolo dal circolo sanguigno all'interno delle cellule). Nel modello in esame questi geni sono risultati ridotti rispetto ai controlli, sia in assenza che in presenza della miscela. Tale decremento potrebbe essere dovuto al colesterolo presente nella dieta (2%), che avrebbe inibito la sua stessa produzione, tramite un processo a *feedback* negativo. La riduzione di LDLr potrebbe giustificare l'alto contenuto ematico di LDL nei ratti a dieta iperlipidica. Sono stati anche analizzati i geni ABCA1 e CYP7A1. Il primo è un trasportatore che favorisce l'efflusso di esteri del colesterolo dalle cellule, promuovendo la formazione di particelle HDL, che vengono poi indirizzate al fegato per l'eliminazione mediata dagli acidi biliari. Il gene ABCA1 viene regolato trascrizionalmente da LXR α e a livello post-trascrizionale da *mir-33* (Fernández-Hernando C., 2013). CYP7A1 è un gene coinvolto nella via biosintetica degli acidi biliari a partire dal colesterolo per favorirne l'escrezione tramite la bile (Bunnoy A. et al., 2015). Nel presente studio i valori di mRNA del CYP7A1 sono risultati significativamente indotti nel modello steatotico, rispetto al controllo. Nei ratti trattati con la miscela è stata osservata una significativa riduzione del trascritto di tale gene, ad indicare che la via tramite cui gli estratti vegetali determinano un abbassamento di colesterolo non è la presente (Bunnoy A. et al., 2015).

Considerando l'esistenza di diverse evidenze sperimentali e cliniche che dimostrano che lo stress del reticolo endoplasmatico è molto importante nella progressione della NAFLD a NASH e nel diabete mellito di tipo 1 e 2, (Oslowski C. M. e Urano F., 2011), è stata eseguita un'analisi trascrizionale dei geni dello stress del reticolo endoplasmatico (XBP1, CHOP e BIP). Il primo è un fattore trascrizionale che, in risposta allo stress del RE, attiva l'espressione di *chaperones* e di proteine di degradazione associate al RE (ERAD); CHOP è un fattore pro-apoptotico, la cui espressione aumenta in presenza di stress del RE, mentre BIP è una *chaperone* che viene indotto in situazioni di accumulo di proteine nel RE (Oslowski C.M. e Urano F., 2011). Dai dati ottenuti non emerge alcuna condizione di stress del reticolo endoplasmatico, confermando il fatto che la patologia non sia ancora in uno stadio di NASH.

In condizioni fisiologiche ed in uno stato post-prandiale, l'insulina inibisce la gluconeogenesi, mentre in presenza di insulino-resistenza, tale via rimane attiva. Dall'analisi quantitativa dei due geni chiave della gluconeogenesi (PEPCK e G6Pasi) è risultata un'inibizione di tale via sia in presenza che in assenza di trattamento. Questi risultati concordano con la presunta IR e con la

ridotta espressione di ChREBP, noto per regolare positivamente l'espressione del gene G6Pasi (Agius L., 2013). Inoltre, anche SREBP1c è un forte inibitore di tali geni, e nel presente modello è risultato indotto (Ramírez C.M. et al., 2013).

Per quanto riguarda il processo infiammatorio, sono stati analizzati i geni TNF α e IL-6, che sono risultati significativamente indotti nei ratti HFD/STZ rispetto al controllo. Un simile risultato suggerisce che la dieta iperlipidica insieme ad una bassa dose di STZ abbia determinato uno stadio di NAFLD conclamato, sebbene non sia ancora rilevabile a livello istologico alcuna infiltrazione di macrofagi (caratteristica più comune della NASH). Il fatto che la miscela di estratti vegetali abbia determinato una diminuzione del trascritto di IL-6, paragonabile a quella esercitata dall'eugenolo, già noto per le sue proprietà antinfiammatorie, ci permette di attribuire alla miscela un plausibile effetto antinfiammatorio (Baskaran Y. et al., 2010).

Elevati livelli di stress ossidativo sono caratteristici di modelli animali di NAFLD (Lieber et al. 2004; Nanji 2004). I mitocondri rappresentano la più importante sorgente cellulare di ROS nella NASH (Pessayre D. and Fromenty B., 2005). Giacché la disfunzione mitocondriale rappresenta un punto critico della progressione della patologia epatica (dalla NAFLD alla steatoepatite), sono stati analizzati alcuni indici di stress ossidativo: perossidazione lipidica, carbonilazione delle proteine e dosaggio del GSH (Parveen K. et al., 2010). Dai risultati ottenuti, nei ratti HFD/STZ si osserva una chiara evidenza di stress ossidativo, definita principalmente dalle concentrazioni di proteine carbonilate e dalla deplezione di GSH epatico. Il trattamento con la miscela ha evidenziato un effetto rilevabile soltanto per quanto riguarda le proteine carbonilate, che sono state ridotte in modo significativo rispetto al modello HFD/STZ. Questi dati mettono in luce le proprietà antiossidanti esercitate dalla miscela, confermando i dati di letteratura sulle singole componenti (Lee B.H. et al., 2013; D'Antuono I. et al., 2015).

La condizione di stress ossidativo è stata ulteriormente confermata dall'attività della DT-diaforasi, uno dei geni target di Nrf2, che è risultata significativamente indotta sia nei ratti trattati con HFD/STZ che con la miscela. Alcuni autori correlano l'attivazione di Nrf2 soltanto con fasi successive della patologia, suggerendo che il nostro modello rappresenti una fase avanzata di NAFLD.

Considerando che l'induzione dei citocromi P450 è una prerogativa tipica della steatosi epatica, sono state determinate le attività e le relative espressioni proteiche delle principali isoforme coinvolte nella patogenesi della NAFLD: CYP2E1, CYP4A e CYP2C11. In particolare, viene modulato il CYP2E1 in quanto gli acidi grassi promuovono sia la sua trascrizione che la sua sintesi. (Aubert J.

et al., 2011). Le condizioni di chetosi, indotte dalla dieta iperlipidica, sembrano promuovere un'attivazione pre-traduzionale dell'isoforma (Yun Y. P. et al., 1992), la cui induzione è importante in quanto questo citocromo è coinvolto sia nella produzione di ROS (in particolare di superossido), tramite disaccoppiamento del sistema monossigenasico, sia nell'insorgenza dell'insulino-resistenza. A lungo andare la sua attivazione provoca un aumento di ROS che, insieme alla disfunzione mitocondriale, contribuisce all'incremento dello stress ossidativo (Caro A. A. et al., 2004). Le attività marcatrici del 2E1 sono risultate significativamente indotte nei ratti iperlipidici, rispetto ai controlli, in accordo con i dati presenti in letteratura (Abdelmegeed M.A. et al., 2012). I dati relativi a queste attività sono stati confermati anche per le proteine, dove i citocromi 4A è risultato maggiormente espresso nei ratti HFD/STZ, mentre il 2C11 ha subito una riduzione. In tutti i casi presi in esame (2E1, 4A e 2C11), è stato possibile apprezzare un'azione della miscela nel ripristino dei valori di controllo, confermando la sua azione protettiva in questo modello.

Un ulteriore parametro analizzato riguarda le attività antiossidanti: GSH-red, GPX, SOD, CAT, oltre alla già discussa DT-diaforasi. L'attività della GSH-reduttasi è risultata significativamente indotta nei ratti iperlipidici rispetto ai controlli, in accordo con la deplezione del GSH. Al contrario, i ridotti valori di GPX negli HFD/STZ possono essere giustificati dalla ridotta disponibilità di substrato (GSH) per la GPX stessa. Inoltre, nei ratti steatotici non è stata osservata alcuna variazione della catalasi, mentre la SOD è risultata diminuita significativamente. Dai dati presenti in letteratura emerge che gli enzimi antiossidanti risultano indotti soltanto in una fase iniziale di NAFLD e vanno incontro a declino negli stadi più avanzati (Kanagasabapathy et al., 2013; Pan M.H. et al., 2014). Il fatto che SOD e GPX siano risultate ridotte rappresenta un'ulteriore conferma che questo modello non rappresenti uno stadio precoce di NAFLD. Se in una prima fase della patologia si osserva un aumento dell'attività di tali enzimi, solo con l'avanzamento della stessa si riscontra un quadro di deplezione, come da noi evidenziato.

Un altro parametro analizzato al fine di precisare lo stadio della patologia è rappresentato dal grado di fibrosi, definito dal gene TGF β , la cui espressione attiva le cellule di *Kupffer*, che a loro volta inducono le cellule stellate epatiche (HSC) a produrre collagene. La presenza di fibrosi è stata confermata dall'elevata espressione di questo gene, sia nei ratti HFD/STZ che in quelli che hanno assunto la miscela. Da ciò si evince che il trattamento non ha indotto un effetto migliorativo nel processo di fibrosi, che invece è risultato evidente nel gruppo trattato con eugenolo.

Per approfondire la caratterizzazione del nostro modello HFD/STZ, abbiamo analizzato l'espressione di vari geni chiave del metabolismo del colesterolo e del trasporto degli acidi biliari (BAs).

La produzione di BAs gioca un ruolo fondamentale nella biotrasformazione dell'eccesso di colesterolo nel fegato. Ciò si realizza principalmente attraverso l'up-regolazione trascrizionale del CYP7A1, l'enzima limitante della biosintesi classica (neutra) degli BAs, che, insieme al CYP8B1, porta alla formazione dell'acido colico (CA). È inoltre presente nel fegato una via minore alternativa (acida) che coinvolge gli enzimi CYP27A1 e CYP7B1, e produce acido chenodeossicolico (CDCA).

La presenza di colesterolo nella dieta ha provocato nel gruppo D un significativo incremento trascrizionale dei geni CYP7A1 e CYP8B1, ma non del CYP27A1 e del CYP7B1. Al contrario, in ratti trattati soltanto con HFD e colesterolo, solo CYP7A1 è risultato indotto, mentre CYP8B1 inibito (Lulu et al., 2014). Dall'altro lato, in ratti diabetici trattati con la sola STZ, è stato riportato un incremento dell'espressione del CYP8B1 da Ichida et al. È altresì verosimile che questa induzione dei CYP si riscontri in pazienti diabetici, dal momento che gli acidi biliari idrossilati in posizione 12 α dal CYP8B1 e coniugati sono stati trovati aumentati nel loro siero e correlati ad insulino resistenza (Argaud et al., 1996). Studi sui ratti hanno evidenziato come l'attività del CYP8B1 sia regolata a livello trascrizionale, e come l'insulina sia in grado di abbassare i suoi livelli di mRNA (Pikuleva, 2006). Si può dunque affermare che gli aumentati livelli di mRNA del CYP8B1 osservati in questo studio possono essere associati ad una disfunzione insulinica.

Il CYP8B1 è considerato determinante per la regolazione del rapporto CA/CDCA, che ha importanti implicazioni. Questo citocromo P450 è un target per l'abbassamento del colesterolo dal momento che controlla la produzione di CA, che è stato dimostrato essere più efficiente del CDCA per il riassorbimento del colesterolo e per il suo storage nel fegato (Woollett et al., 2004).

Dall'altro lato, il CDCA ed il suo derivato acido deossicolico sono i più potenti agonisti di FXR (Jia et al., 2014) che, quando attivo, protegge il fegato dalla tossicità degli BAs e dalla formazione di calcoli, incrementando l'espressione dei trasportatori di efflusso dei sali degli BAs (BSEP e MRP2/4), della fosfatidilcolina (MDR2), del colesterolo (ABCG5), e diminuendo l'assorbimento del trasportatore dei sali degli BAs (NTCP) (De Lima and Tagliati, 2014). In aggiunta, sotto stimolazione da BAs, FXR attiva potentemente la trascrizione di SHP, che è in grado di produrre una reazione di feedback sulla sintesi degli BAs, inibendo la trascrizione di CYP7A1 e CYP8B1. (Goodwin et al., 2000). Nei nostri ratti HFD/STZ, l'aumentata espressione del CYP8B1 può aver determinato una

diminuzione dei livelli di CDCA e dei suoi coniugati con una conseguente diminuita o mancata attivazione di FXR. Infatti FXR, la cui espressione mostra una tendenza alla diminuzione, in accordo con Lulu et al. (2014), non sembra essere attivato, dal momento che le espressioni di SHP, BSEP e OATP1A1 risultano diminuite, quelle di MDR2, MRP2/4 e ABCG5 invariate o tendenti alla diminuzione, e CYP7A1 e CYP8B1 non risultano inibite. È stato precedentemente dimostrato che l'espressione di BSEP e OATP1A1, ma non quella di MRP2 e MRP4, era indotta in ratti trattati con la sola HFD (Fisher et al., 2009; Canet et al., 2014; Lickteig et al., 2007). Uno studio di Hartman et al. (2002) ha dimostrato che la somministrazione di TNF α ai roditori abbassa i livelli di mRNA di BSEP, MRP2 e OATP1A1, suggerendo come la ridotta espressione dei trasportatori dei sali degli BAs e del SULT2A1 nei nostri ratti HFD/STZ, potrebbe essere dovuta agli alti livelli di citochine pro-infiammatorie che abbiamo riscontrato (TNF α ed IL6).

Dal momento che i trasportatori epatobiliari determinano criticamente flusso degli BAs e loro concentrazione, le alterazioni di questi trasportatori possono portare ad una differente composizione del pool degli BAs, che è alla base di alcune patologie epatiche (Chiang, 2013). Infatti, una ridotta espressione dei trasportatori del canalicolo per il colesterolo, BAs e fosfatidilcolina è rilevante per la formazione dei calcoli e/o per una condizione di colestasi, come dimostrato con knockout in topi privi di FXR (Helilbasic et al., 2013) ed in pazienti con NAFLD grave (Fracanzani et al., 2012).

Diversamente, quando prevale il pathway acido degli BAs, che porta ad alti livelli di CDCA e ad un ridotto rapporto CA/CDCA, insorgono gravi patologie epatiche come la cirrosi (Gupta et al., 2001). Nel presente studio, la ridotta espressione dei trasportatori degli BAs, insieme ad un elevato rapporto CA/CDCA, ed una conseguente mancata attivazione di FXR ed accumulo di colesterolo nel fegato, potrebbe essere indice della presenza di calcoli o di una condizione di colestasi nel nostro modello HFD/STZ di NAFLD/NASH.

BIBLIOGRAFIA

A

Abdelmegeed M.A., Banerjee A., Yoo S.H., Jang S., Gonzalez F.J., Song B.J. (2012) - *Critical role of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the development of high fat-induced non-alcoholic steatohepatitis.* J. Hepatol. 57:860-866.

Aebi H. (1984) – *Catalase in vitro.* Methods Enzymol.105: 121-126.

Agius L. (2013) - *High-carbohydrate diets induce hepatic insulin resistance to protect the liver from substrate overload.* Biochem. Pharmacol. 85:306-312.

Ahmed U., Redgrave T.G., Oates P.S. (2009) - *Effect of dietary fat to produce non-alcoholic fatty liver in the rat.* J. Gastroenterol. Hepatol. 24:1463-1471.

Aitio A. (1978) - *A simple and sensitive assay of 7-ethoxycoumarin deethylation.* Anal. Biochem. 85: 488-491.

Ali S., Prasad R., Mahmood A., Routray I., Shinkafi T.S., Sahin K., Kucuk O. (2014) - *Eugenol-rich fraction of syzygium aromaticum (Clove) reverses biochemical and histopathological changes in liver cirrhosis and inhibits hepatic cell proliferation.* J. Cancer Prev.19:288-300.

Al-Okbi S.Y., Mohamed D.A., Hamed T.E., Edris A.E. (2014) - *Protective effect of clove oil and eugenol microemulsions on fatty liver and dyslipidemia as components of metabolic syndrome.* J. Med. Food 17:764-771.

Amato G., Longo V., Mazzaccaro A., Gervasi P. G. (1996) - *Microsomal oxidation of N,N-diethylformamide and its effect on P450-dependent monooxygenase in rat liver.* Chem. Res. Toxicol. 9: 882-890.

Andrade J.M., Paraíso A.F., de Oliveira M.V., Martins A.M., Neto J.F., Guimarães A.L., de Paula A.M., Qureshi M., Santos S.H. (2014) - *Resveratrol attenuates hepatic steatosis in high-fat fed mice by decreasing lipogenesis and inflammation.* Nutrition 30:915-919.

Argaud D., Zhang Q., Pan W., Maitra S., Pilkis S.J., Lange A.J. (1996) - *Regulation of rat liver glucose-6-phosphatase gene expression in different nutritional and hormonal states: gene structure and 5'-flanking sequence.* Diabetes. 45: 1563-1571.

Aubert J., Begriche K., Knockaert L., Robin M.A., Fromenty B. (2011) - *Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and pathophysiological role.* Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol. 35:630-637.

B

Bachiega T.F., de Sousa J.P., Bastos J.K., Sforcin J.M. (2012) - *Clove and eugenol in noncytotoxic concentrations exert immunomodulatory/anti-inflammatory action on cytokine production by murine macrophages.* J. Pharm. Pharmacol. 64:610-616.

Badary O.A., Abdel-Maksoud S., Ahmed W.A., Owieda G.H. (2005) - *Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats.* Life Sci. 76:2125-2135.

Banerjee M., Robbins D., Chen T. (2015) - *Targeting xenobiotic receptors PXR and CAR in human diseases.* Drug Discov. Today 20:618-628.

Barnett C.R., Gibson G.G., Wolf C.R., Flatt PR, Ioannides C. (1990) - *Induction of cytochrome P450III and P450IV family proteins in streptozotocin-induced diabetes.* Biochem. J. 268:765-769.

Berg A.H., Scherer P.E. (2005) - *Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease.* Circ. Res. 96:939-949.

Bi W.R., Yang C.Q., Shi Q., Xu Y., Cao C.P., Ling J., Wang X.Y. (2014) - *Large-scale analysis of factors influencing nonalcoholic fatty liver disease and its relationship with liver enzymes.* Genet. Mol. Res.13:5880-5891.

Bora K.S., Sharma A. (2011) - *Phytochemical and pharmacological potential of Medicago sativa: a review.* Pharm. Biol. 49:211-220.

Brunner L.J., Bai S. (2000) - *Effect of dietary oil intake on hepatic cytochrome P450 activity in the rat.* J. Pharm. Sci. 89:1022-1027.

Bunnoy A., Saenphet K., Lumyong S., Saenphet S., Chomdej. S. (2015) - *Monascus purpureus-fermented Thai glutinous rice reduces blood and hepatic cholesterol and hepatic steatosis concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats.* BMC Complement. Altern. Med. 15:88.

Burke F.M. (2015) - *Red yeast rice for the treatment of dyslipidemia.* Curr. Atheroscler. Rep.17:495.

C

Canet MJ, Cherrington NJ. (2014) - *Drug disposition alterations in liver disease: extrahepatic effects in cholestasis and nonalcoholic steatohepatitis.* Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol. 10:1209-19.

Carbone V., Montoro P., de Tommasi N., Pizza C. (2004) - *Analysis of flavonoids from Cyclanthera pedata fruits by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry.* J. Pharm. Biomed. Anal. 34:295-304.

Caro A.A., Cederbaum A.I. (2004) - *Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1.* Annu Rev Pharmacol. Toxicol. 44:27-42.

Chiang J.Y. (2013) - *Bile acid metabolism and signaling.* Compr. Physiol. 3: 1191-1212. Doi 10.1002/c.phy.c.120023.

Childress L., Gay A., Zargar A., Ito M.K. (2013) - *Review of red yeast rice content and current Food and Drug Administration oversight.* J. Clin. Lipidol.7:117-122.

Choi W.H., Um M.Y., Ahn J., Jung C.H., Ha T.Y. (2014) - *Long-term intake of rice improves insulin sensitivity in mice fed a high-fat diet.* Nutrition 30:920-927.

Chung S.I., Kim T.H., Rico C.W., Kang M.Y. (2014) - *Effect of instant cooked giant embryonic rice on body fat weight and plasma lipid profile in high fat-fed mice.* Nutrients 6:2266-2278.

Coskun O., Kanter M., Korkmaz A., Oter S. (2005) - *Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas.* Pharmacol. Res. 51:117-123.

D

D'Antuono I., Garbetta A., Linsalata V., Minervini F., Cardinali A. (2015) - *Polyphenols from artichoke heads (*Cynara cardunculus* (L.) subsp. *scolymus* Hayek): in vitro bio-accessibility, intestinal uptake and bioavailability.* Food Funct. 6:1268-1277.

D' Avila Farias M., Oliveira P.S., Dutra F.S., Fernandes T.J., de Pereira C.M., de Oliveira S.Q., Stefanello F.M., Lencina C.L., Barschak A.G. (2014) - *Eugenol derivatives as potential antioxidants: is phenolic hydroxyl necessary to obtain an effect.* J. Pharm. Pharmacol. 66:733-746.

Day C.P., James O.F. (1998) - *Steatohepatitis: a tale of two "hits"?* Gastroenterology 114:842-845.

De Lima Toccafondo Vieira M., Tagliati C.A. (2014) - *Hepatobiliary transporters in drug-induced cholestasis: a perspective on the current identifying tools.* Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol. 10: 581-97.

Do G.M., Oh H.Y., Kwon E.Y., Cho Y.Y., Shin S.K., Park H.J., Jeon S.M., Kim E., Hur C.G., Park T.S., Sung M.K., McGregor R.A., Choi M.S. (2011) - *Long-term adaptation of global transcription and metabolism in the liver of high-fat diet-fed C57BL/6J mice.* Mol. Nutr. Food Res. 55 Suppl 2:S173-185.

Donahue B.S., Skottner-Lundin A., Morgan E.T. (1991) - *Growth hormone-dependent and -independent regulation of cytochrome P-450 isozyme expression in streptozotocin-diabetic rats.* Endocrinology 128:2065-2076.

Dong Z.G., Hong J.Y., Ma Q.A., Li D.C., Bullock J., Gonzalez F.J., Park S.S., Gelboin H.V., Yang C.S. (1988) - *Mechanism of induction of cytochrome P-450ac (P-450) in chemically induced and spontaneously diabetic rats.* Arch. Biochem. Biophys 263:29-35.

Dowman J.K., Tomlinson J.W., Newsome P.N. (2010) - *Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease.* QJM. 103:71-83.

E

Ellman G. L. (1959) – *Tissue sulphydryl groups.* Arch Biochem. Biophys 82: 70 - 77

F

FAO. (2009) - Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Fisher C.D., Lickteig A.J., Augustine L.M., Oude Elferink R.P., Besselsen D.G., Erickson R.P., Cherrington N.J. (2009) - *Experimental non-alcoholic fatty liver disease results in decreased hepatic uptake transporter expression and function in rats.* Eur J Pharmacol. 613: 119-27.

Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H. (1957) - *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue.* J. Biol. Chem. 226: 497-509.

Fracanzani A.L., Valenti L., Russello M., Miele L., Bertelli C., Bellia A., Masetti C., Cefalo C., Grieco A., Marchesini G., Fargion S. (2012) - *Gallstone disease is associated with more severe damage in patients with non-alcoholic liver disease.* PLoS One 7: e41183.

G

Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea: Regolamento (UE) n. 212/2014 della commissione del 6 marzo 2014.

Gerards M.C., Terlouw R.J., Yu H., Koks C.H., Gerdes V.E. (2015) - *Traditional chinese lipid-lowering agent red yeast rice results in significant LDL reduction but safety is uncertain - A systematic review and meta-analysis.* Atherosclerosis 240:415-423.

Giby V.G., Ajith T.A. (2014) - *Role of adipokines and peroxisome proliferator-activated receptors in nonalcoholic fatty liver disease.* World J. Hepatol. 27;6:570-579.

Goodwin B., Jones S.A., Price R.R., Watson M.A., McKee D.D., Moore L.B., Galardi C., Wilson J.G., Lewis M.C., Roth M.E., Maloney P.R., Willson T.M., Kliewer S.A. (2000) - *A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis.* Mol Cell. 6: 517-26.

Góth L., Mészáros I., Németh H. (1987) - *Serum catalase enzyme activity in liver diseases.* Acta Biol. Hung. 38:287-290.

Grespan R., Paludo M., Lemos Hde P., Barbosa C.P., Bersani-Amado C.A., Dalalio M.M., Cuman R.K. (2012) - *Anti-arthritic effect of eugenol on collagen-induced arthritis experimental model.* Biol Pharm Bull. 35:1818-1820.

Gupta S., Stravitz R.T., Dent P., Hylemon P.B. (2001) - *Down-regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) gene expression by bile acids in primary rat hepatocytes is mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway.* J. Biol. Chem. 11;276(19): 15816-22.

H

Halliwell B., Zhao K., Whiteman M. (2000) - *The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action?* Free Radic. Res.33:819-830.

Hardwick J.P., Osei-Hyiaman D., Wiland H., Abdelmegeed M.A., Song B.J. (2009) - *PPAR/RXR regulation of fatty acid metabolism and fatty acid omega-hydroxylase (CYP4) isozymes: implications for prevention of lipotoxicity in fatty liver disease.* PPAR Res. 2009:952734.

Hassan K., Bhalla V., El Regal M.E., A-Kader H.H. (2014) - *Nonalcoholic fatty liver disease: a comprehensive review of a growing epidemic.* World J. Gastroenterol. 20 12082-12101.

Higuchi N., Kato M., Shundo Y., Tajiri H., Tanaka M., Yamashita N., Kohjima M., Kotoh K., Nakamuta M., Takayanagi R., Enjoji M. (2008) - *Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease.* Hepatol Res. 38: 1122-1129.

I

Imai S.(2015) - *Soybean and processed soy foods ingredients, and their role in cardiometabolic risk prevention.* Recent Pat. Food Nutr. Agric. [Epubahead of print].

Imaoka S., Funae Y. (1991) - *Induction of cytochrome P450 isozymes in rat liver by methyl n-alkyl ketones and n-alkylbenzenes. Effects of hydrophobicity of inducers on inducibility of cytochrome P450.* Biochem. Pharmacol.42 Suppl:S143-150.

Ioannides C. (2006) - *Cytochrome p450 expression in the liver of food-producing animals.* Curr. Drug Metab. 7:335-348.

J

Jacociunas L.V., de Andrade H.H., Lehmann M., de Abreu B.R., Ferraz Ade B., da Silva J., Grivicich I., Dihl R.R. (2013) - *Artichoke induces genetic toxicity in the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) cytome assay.* Food Chem. Toxicol. 55:56-59.

Jia X, Suzuki Y, Naito H, Yetti H, Kitamori K, Hayashi Y, Kaneko R, Nomura M, Yamori Y, Zaitso K, Kato M, Ishii A, Nakajima T. (2014) - *A possible role of chenodeoxycholic acid and glycine-conjugated bile acids in fibrotic steatohepatitis in a dietary rat model.* Dig Dis Sci. 59:1490-501.

Jo H.K., Kim G.W., Jeong K.J., Kim do Y., Chung S.H.(2014) - *Eugenol ameliorates hepatic steatosis and fibrosis by down-regulating SREBP1 gene expression via AMPK-mTOR-p70S6K signaling pathway.* Biol. Pharm. Bull. 37:1341-1351.

Johansson I., Lindros K.O., Eriksson H., Ingelman-Sundberg M. (1990) - *Transcriptional control of CYP2E1 in the perivenous liver region and during starvation.* Biochem. Biophys Res. Commun.173:331-338.

K

Kanagasabapathy G., Malek S.N., Mahmood A.A., Chua K.H., Vikineswary S., Kuppusamy U.R. (2013) - *Beta-glucan-rich extract from pleurotus sajor-caju (Fr.) singer prevents obesity and*

oxidative stress in C57BL/6J Mice fed on a high-fat diet. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2013:185259.

Kakkar R., Mantha S.V., Radhi J., Prasad K., Kalra J. (1998) - *Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. Clin. Sci. (Lond).* 94:623-632.

Kanter M., Coskun O., Korkmaz A., Oter S. (2004) - *Effects of Nigella sativa on oxidative stress and beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. Anat. Rec. A Discov Mol. Cell. Evol. Biol.* 279:685-691.

Kathirvel E., Morgan K., French S.W., Morgan T.R. (2009) - *Overexpression of liver-specific cytochrome P450E1 impairs hepatic insulin signaling in a transgenic mouse model of nonalcoholic fatty liver disease. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 21:973-983.

Kim Y., Yoon S., Lee S.B., Han H.W., Oh H., Lee W.J., Lee S.M. (2014) - *Fermentation of soy milk via Lactobacillus plantarum improves dysregulated lipid metabolism in rats on a high cholesterol diet. PLoS One* 10;9:e88231.

Klimek M., Wang S., Ogunkanmi A. (2009) - *Safety and efficacy of red yeast rice (Monascus purpureus) as an alternative therapy for hyperlipidemia. P. T.* 34: 313-327.

Ko I. Y., Park S. S., Song B. J., Patten C., Tan Y. Z., Hah Y. C., Yang C. S., Gelboin H. V. (1987) - *Monoclonal antibodies to ethanol-induced rat liver cytochrome P-450 that metabolized aniline and nitrosamines. Cancer res.* 47: 3101-3109

Koh T., Murakami Y., Tanaka S., Machino M., Sakagami H. (2013) - *Re-evaluation of anti-inflammatory potential of eugenol in IL-1 β -stimulated gingival fibroblast and pulp cells. In Vivo.* 27:269-273.

Kohjima M., Enjoji M., Higuchi N., Kato M., Kotoh K., Yoshimoto T., Fujino T., Yada M., Yada R., Harada N., Takayanagi R., Nakamuta M. (2007) - *Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. Int. J. Mol. Med.* 20:351-358.

Kowalska J., Zabłocka A., Wilusz T. (2006) - *Isolation and primary structures of seven serine proteinase inhibitors from Cyclanthera pedata seeds. Biochim. Biophys Acta.* 1760:1054-1063.

Kučera O., Garnol T., Lotková H., Staňková P., Mazurová Y., Hroch M., Bolehovská R., Roušar T., Červinková Z. (2011) - *The effect of rat strain, diet composition and feeding period on the development of a nutritional model of non-alcoholic fatty liver disease in rats. Physiol. Res.* 60:317-328.

Kucera O., Cervinkova Z. (2014) - *Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. World J. Gastroenterol.* 20:8364-8376.

Küçükgergin C., Aydin A.F., Ozdemirler-Erata G., Mehmetçik G., Koçak-Toker N., Uysal M. (2010) - *Effect of artichoke leaf extract on hepatic and cardiac oxidative stress in rats fed on high cholesterol diet. Biol. Trace Elem. Res.*135:264-274.

L

- Laemmli U.K.** *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature 227:680-685.
- Lam B., Younossi Z.M.** *Treatment (2010) - Options for nonalcoholic fatty liver disease.* Therap Adv Gastroenterology 3: 121-137.
- Larter C.Z., Chitturi S., Heydet D., Farrell G.C.** (2010) - *A fresh look at NASH pathogenesis. Part 1: the metabolic movers.* J. Gastroenterol. Hepatol. 25:672-690.
- Lee C.C., Lee B.H., Lai Y.J.** (2015) - *Antioxidation and antiglycation of Fagopyrum tataricum ethanol extract.* J. Food Sci. Technol. 52:1110-1116.
- Lee W.L., Huang J.Y., Shyur L.F.** (2013) - *Phytoagents for cancer management: regulation of nucleic acid oxidation, ROS, and related mechanisms.* Oxid Med. Cell. Longev. 2013:925804.
- Li Y., Jiang L., Jia Z., Xin W., Yang S., Yang Q., Wang L.** (2014) - *A meta-analysis of red yeast rice: an effective and relatively safe alternative approach for dyslipidemia.* PLoS One 9: 98-611.
- Li Y.H., Yang L.H., Sha K.H., Liu T.G., Zhang L.G., Liu X.X.** (2015) - *Efficacy of poly-unsaturated fatty acid therapy on patients with nonalcoholic steatohepatitis.* World J. Gastroenterol. 21:7008-7013.
- Lickteig A.J., Fisher C.D., Augustine L.M., Aleksunes L.M., Besselsen D.G., Slitt A.L., Manautou J.E., Cherrington N.J.** (2007) - *Efflux transporter expression and acetaminophen metabolite excretion are altered in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease.* Drug Metab. Dispos. 35:1970-8.
- Lieber C.S., Leo M.A., Mak K.M., Xu Y., Cao Q., Ren C., Ponomarenko A., DeCarli L.M.**(2004) - *Model of nonalcoholic steatohepatitis.* Am J Clin. Nutr. 79:502-509.
- Liu J., Liu Y., Wang W., Luo Y., Zhuang Z., Jiao Q., Chen J., Bian D., Ma X., Xun Y., Zhu M., Shi J.** (2014) - *Development and evaluation of a high-fat/high-fructose diet-induced nonalcoholic steatohepatitis mouse model.* Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi. 22:445-450.
- Liu X., Zhang J., Ming Y., Chen X., Zeng M., Mao Y.** (2015) - *The aggravation of mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease accompanied with type 2 diabetes mellitus.* Scand. J. Gastroenterol. 50:1152-1159.
- Longo V., Mazzaccaro A., Naldi F., Gervasi P.G.** (1991) - *Drug-metabolising enzymes in liver, olfactory, and respiratory epithelium of cattle.* J. Biochem. Toxicol. 6:123-128.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.** (1951) - *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Lulu W, Xianping H, Su H, Xiaoli M, Shaolian W, Shuguan P.** (2014) - *Effect of simvastatin on the expression of farnesoid X receptor in diabetic animal models of altered glucose homeostasis.* Chin Med J., 127: 218-224.

M

Mansouri A., Demeilliers C., Amsellem S., Pessayre D., Fromenty B. (2001) - *Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial dna in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 298:737-743.

Mihara M., Uchiyama M. (1978) - *Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test.* Anal. Biochem. 86: 271-278.

Marklund S., Marklund G. (1974) - *Involvement of superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and convenient assay for superoxide dismutase.* Eur. J. Biochem. 47: 469-474.

Mercier Y., Gatellier P., Renerre M. (2004) - *Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet.* Meat Sci. 66:467-473.

Montoro P., Carbone V., Pizza C. (2005) - *Flavonoids from the leaves of Cyclanthera pedata: two new malonyl derivatives.* Phytochem. Anal. 16:210-216.

N

Naowaboot J., Somparn N., Saentaweek S., Pannangpet P. (2015) - *Umbelliferone improves an impaired glucose and lipid metabolism in high-fat diet/streptozotocin-induced type 2 diabetic rats.* Phytother. Res. doi: 10.1002/ptr.5392. [Epub ahead of print].

Nassir F., Ibdah J.A. (2014) - *Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease.* Int. J. Mol. Sci. 15: 8713-8742.

Nishikawa S., Yamashita T., Imai T., Yoshida M., Sakuratani Y., Yamada J., Maekawa A., Hayashi M. (2010) - *Thesaurus for histopathological findings in publically available reports of repeated-dose oral toxicity studies in rats for 156 chemicals.* J. Toxicol. Sci. 35:295-298.

O

Oh H.G., Kang Y.R., Lee H.Y., Kim J.H., Shin E.H., Lee B.G., Park S.H., Moon D.I., Kim O.J., Lee I.A., Choi J., Lee J.E., Park K.H., Suh J.W. (2014) - *Ameliorative effects of Monascus pilosus-fermented black soybean (Glycine max L. Merrill) on high-fat diet-induced obesity.* J. Med. Food. 17:972-978.

Oh M.K., Winn J., Poordad F. (2008) - *Review article: diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease.* Aliment. Pharmacol Ther. 28:503-522.

Oliveira A.C., dos Santos V.S., dos Santos D.C., Carvalho R.D., Souza A.S., Ferreira S.L. (2014) - *Determination of the mineral composition of Caigua (Cyclanthera pedata) and evaluation using multivariate analysis.* Food Chem. 152:619-623.

Omura T., Sato R. (1964) - *The carbon-monoxide binding protein of liver microsomes. Evidence for its hemoprotein nature.* J Biol Chem. 292: 2370-2378.

Osowski C.M., Urano F. (2011) - *The binary switch that controls the life and death decisions of ER stressed β cells.* Curr. Opin. Cell. Biol. 23:207-215.

P

Pan M.H., Lai C.S., Tsai M.L., Ho C.T. (2014) - *Chemoprevention of nonalcoholic fatty liver disease by dietary natural compounds.* Mol. Nutr. Food Res. 58:147-171.

Parveen K., Khan M.R., Mujeeb M., Siddiqui W.A. (2010) - *Protective effects of Pycnogenol on hyperglycemia-induced oxidative damage in the liver of type 2 diabetic rats.* Chem. Biol. Interact. 186:219-227.

Pascussi J.M., Gerbal-Chaloin S., Drocourt L., Assénat E., Larrey D., Pichard-Garcia L., Vilarem M.J., Maurel P. (2004) - *Cross-talk between xenobiotic detoxication and other signalling pathways: clinical and toxicological consequences.* Xenobiotica 34:633-664.

Pereira C., Barreira J.C., Calhelha R.C., Queiroz M.J., Barros L., Ferreira I.C. (2014) - *New insights into the effects of formulation type and compositional mixtures on the antioxidant and cytotoxic activities of dietary supplements based-on hepatoprotective plants.* Food Funct. 5:2052-2060.

Peverill W., Powell L.W., Skoien R. (2014) - *Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation.* Int. J. Mol. Sci. 15: 8591-8638.

Phaniendra A., Jestadi D.B., Periyasamy L. (2015) - *Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases.* Indian J. Clin. Biochem. 30:11-26.

Pikuleva I.A. (2006) - *Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis.* Pharmacol Ther. 112:761-73.

Pozzo L., Pucci L., Buonamici G., Giorgetti L., Maltinti M., Longo V. (2014) - *Effect of white wheat bread and white wheat bread added with bioactive compounds on hypercholesterolemic and steatotic mice fed a high-fat diet.* J. Sci. Food Agric.

Q

Qinna N.A., Badwan A.A. (2015) - *Impact of streptozotocin on altering normal glucose homeostasis during insulin testing in diabetic rats compared to normoglycemic rats.* Drug Des. Devel. Ther. 9:2515-2525.

R

Ramírez C.M., Goedeke L., Rotllan N., Yoon J.H., Cirera-Salinas D., Mattison J.A., Suárez Y., de Cabo R., Gorospe M., Fernández-Hernando C. (2013) - *MicroRNA 33 regulates glucose metabolism.* Mol. Cell. Biol. 33:2891-2902.

Ranilla L.G., Kwon Y.I., Apostolidis E., Shetty K. (2010) - *Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension*

of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresour. Technol.* 101:4676-4689.

Raunio H., Kuusisto M., Juvonen R.O., Pentikäinen O.T. (2015) - *Modeling of interactions between xenobiotics and cytochrome P450 (CYP) enzymes.* *Front. Pharmacol.* 6:123.

Reddy J.K., Rao M.S. (2006) - *Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation.* *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290: G852-858.

Reed M.J., Meszaros K., Entes L.J., Claypool M.D., Pinkett J.G., Gadbois T.M., Reaven G.M. (2000) - *A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat.* *Metabolism* 49:1390-1394.

Reinke L. A., Moyer M. J. (1985) - *p-Nitrophenol hydroxylation. A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol.* *Drug Metab. Dispos.* 13: 548-552.

Reinke L.A., Stohs S.J., Rosenberg H. (1978) - *Altered activity of hepatic mixed-function monooxygenase enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats.* *Xenobiotica* 8:611-619.

Robertson G., Leclercq I., Farrell G.C. (2001) - *Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress.* *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 281:G1135-1139.

Roe J.H., Dailey R.E. (1966) - *Determination of glycogen with the anthrone reagent.* *Anal. Biochem.* 15:245-250.

Ron D. (2002) - *Proteotoxicity in the endoplasmic reticulum: lessons from the Akita diabetic mouse.* *The Journal of Clinical Investigation.* 109:443-445.

Roskams T., Yang S.Q., Koteish A., Durnez A., DeVos R., Huang X., Achten R., Verslype C., Diehl A.M. (2003) - *Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease.* *Am. J. Pathol.* 163:1301-1311.

Ross D., Beall H., Traver R.D., Siegel D., Phillips R.M., Gibson N.W.(1994) - *Bioactivation of quinones by DT-diaphorase, molecular, biochemical, and chemical studies.* *Oncol. Res.* 6:493-500.

S

Sankar P., Gopal Telang A., Kalaivanan R., Karunakaran V., Manikam K., Sarkar S.N. (2015) - *Effects of nanoparticle-encapsulated curcumin on arsenic-induced liver toxicity in rats.* *Environ. Toxicol.* 30:628-637.

Senadheera S.P., Ekanayake S., Wanigatunge C. (2014) - *Anti-diabetic properties of rice-based herbal porridges in diabetic Wistar rats.* *Phytother. Res.* 28:1567-1572.

Schmatz R., Perreira L.B., Stefanello N., Mazzanti C., Spanevello R., Gutierrez J., Bagatini M., Martins C.C., Abdalla F.H., Daci da Silva Serres J., Zanini D., Vieira J.M., Cardoso A.M., Schetinger M.R., Morsch V.M. (2012) - *Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the*

activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. Biochimic. 94:374-383.

Shen Q., Wang Y., Zhang Y. (2011) - *Improvement of colchicine oral bioavailability by incorporating eugenol in the nanoemulsion as an oil excipient and enhancer.* Int. J. Nanomedicine 6:1237-1243.

Shi Y., Guo R., Wang X., Yuan D., Zhang S., Wang J., Yan X., Wang C. (2014) - *The regulation of alfalfa saponin extract on key genes involved in hepatic cholesterol metabolism in hyperlipidemic rats.* PLoS One 9:e88282.

Shimojo N. (1994) - *Cytochrome P450 changes in rats with streptozocin-induced diabetes.* Int. J. Biochem.26:1261-1268.

Song B.J., Matsunaga T., Hardwick J.P., Park S.S., Veech R.L., Yang C.S., Gelboin H.V., Gonzalez F.J. - (1987) *Stabilization of cytochrome P450j messenger ribonucleic acid in the diabetic rat.* Mol. Endocrinol. 1:542-547.

Srinivasan K., Viswanad B., Asrat L., Kaul C.L., Ramarao P. (2005) - *Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening.* Pharmacol. Res. 52:313-320.

Stresser D. M., Blanchard A. P., Turner S. D., Erve J. C., Dandeneau A. A., Miller V. P., Crespi C. L. (2000) - *Substrate-dependent modulation of CYP3A4 catalytic activity: analysis of 27 test compounds with four fluorimetric substrates.* Drug Metab. Dispos 28: 1440-1448.

Subash-Babu P., Ignacimuthu S., Agastian P. (2008) - *Insulin secretagogue effect of Ichnocarpus frutescence leaf extract in experimental diabetes: a dose-dependent study.* Chem. Biol. Interact. 172:159-171.

Subash-Babu P., Prabuseenivasan P., Ignacimuthu S. (2007) - *Cinnamaldehyde – a potential antidiabetic agent.* Phytomedicine 14:15-22.

Szkudelski T. (2001) - *The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas.* Physiol. Res. 50:537-546.

T

Tajima M., Ikarashi N., Igeta S., Toda T., Ishii M., Tanaka Y., Machida Y., Ochiai W., Yamada H., Sugiyama K. (2013) - *Different diets cause alterations in the enteric environment and trigger changes in the expression of hepatic cytochrome P450 3A, a drug-metabolizing enzyme.* Biol. Pharm. Bull. 36:624-634.

Tamura S., Shimomura I. (2005) - *Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease.* J. Clin. Invest. 115:1139-1142.

Tannenbaum G.S., Rorstad O., Brazeau P. (1979) - *Effects of prolonged food deprivation on the ultradian growth hormone rhythm and immunoreactive somatostatin tissue levels in the rat.* Endocrinology 104:1733-1738.

Terevinto A., Ramos A., Castroman G., Cabrera M.C., Saadoun A. (2010) - *Oxidative status, in vitro iron-induced lipid oxidation and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in rhea meat.* Meat. Sci. 84:706-710.

Thummel K.E., Schenkman J.B. (1990) - *Effects of testosterone and growth hormone treatment on hepatic microsomal P450 expression in the diabetic rat.* Mol. Pharmacol. 37:119-129.

Totah R.A. (2013) - *Cytochrome P450s: new insights and relevance to medicinal chemistry and drug discovery.* Curr. Top. Med. Chem. 13:1363.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) - *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* Biotechnology 24:145-149.

U

Um M.Y., Moon M.K., Ahn J., Youl Ha T. (2013) - *Coumarin attenuates hepatic steatosis by down-regulating lipogenic gene expression in mice fed a high-fat diet.* Br. J. Nutr. 109:1590-1597.

Urano A., Yagishita Y., Yamamoto M. (2015) - *The Keap1-Nrf2 system and diabetes mellitus.* Arch. Biochem. Biophys. 566:76-84.

V

Vornoli A., Pozzo L., Della Croce C.M., Gervasi P.G., Longo V. (2014) - *Drug metabolism enzymes in a steatotic model of rat treated with a high fat diet and a low dose of streptozotocin.* Food. Chem. Toxicol.70:54-60.

W

Wang Y.X., Li Y., Sun A.M., Wang F.J., Yu G.P. (2014) - *Hypolipidemic and antioxidative effects of aqueous enzymatic extract from rice bran in rats fed a high-fat and -cholesterol diet.* Nutrients 6:3696-3710.

Waxman D.J., Holloway M.G. (2009) - *Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes.* Mol. Pharmacol. 76:215-228.

Weltman M.D., Farrell G.C., Hall P., Ingelman-Sundberg M., Liddle C. (1998) - *Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis.* Hepatology 27:128-133.

Wheeler C. R., Salzman J. A., Elsayed N. M., Omaye S. T., Korte D. W. Jr (1990) – *Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity.* Anal. Biochem. 184: 193-199.

Wilson T.A., Meservey C.M., Nicolosi R.J. (1998) - *Soy lecithin reduces plasma lipoprotein cholesterol and early atherogenesis in hypercholesterolemic monkeys and hamsters: beyond linoleate.* Atherosclerosis 1998 140:147-153.

Woollett L.A., Buckley D.D., Yao L., Jones P.J., Granholm N.A., Tolley E.A., Tso P., Heubi J.E. (2004) *Cholic acid supplementation enhances cholesterol absorption in humans*. *Gastroenterology*. 126:724-31.

X

Xu H., Hertzel A.V., Steen K.A., Wang Q., Suttles J., Bernlohr D.A. (2015) - *Uncoupling lipid metabolism from inflammation through fatty acid binding protein-dependent expression of UCP2*. *Mol. Cell. Biol.* 35:1055-1065.

Y

Yamazoe Y., Shimada. M., Kamataki T., Kato R. (1986) - *Effects of hypophysectomy and growth hormone treatment on sex-specific forms of cytochrome P-450 in relation to drug and steroid metabolisms in rat liver microsomes*. *Jpn J. Pharmacol.* 42:371-382.

Yan Z., Caldwell G.W. (2001) - *Metabolism profiling, and cytochrome P450 inhibition & induction in drug discovery*. *Curr. Top. Med. Chem.* 1:403-425.

Yang C.W., Mousa S.A. (2012) - *The effect of red yeast rice (*Monascus purpureus*) in dyslipidemia and other disorders*. *Complement Ther. Med.* 20: 466-474.

Yogalakshmi B., Viswanathan P., Anuradha C.V. (2010) - *Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats*. *Toxicology* 268:204-212.

Yoon G.A., Park S. (2014) - *Antioxidant action of soy isoflavones on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in exercised rats*. *Nutr. Res. Pract.* 8: 618-624.

Yun Y.P., Casazza J.P., Sohn D.H., Veech R.L., Song B.J. (1992) - *Pretranslational activation of cytochrome P450IIE during ketosis induced by a high fat diet*. *Mol. Pharmacol.* 41:474-479.