



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

*Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche,  
Farmaceutiche ed Ambientali*

*Dottorato di Ricerca in Biologia Applicata e Medicina Sperimentale*

**XXXIII CICLO**

**Curriculum: Scienze del Farmaco SSD BIO/14**

---

## **Attività antinfiammatoria e insulino- sensibilizzante di due estratti vegetali: studio dei meccanismi molecolari in adipociti e cellule endoteliali**

**Tesi di Dottorato di  
Cristina OCCHIUTO**

**Tutor**

Chiar.ma Prof.ssa Mariateresa CRISTANI

**IL COORDINATORE DEL CORSO DI DOTTORATO**

Chiar.ma Prof.ssa Nunziacarla Spanò

---

2017 – 2020

# INDICE

|   |           |
|---|-----------|
| ABSTRACT.....   | 5         |
| PARTE COMPILATIVA.....  | 7         |
| <b>CAPITOLO 1: INSULINO-RESISTENZA E PATOLOGIE CORRELATE.....</b>                               | <b>8</b>  |
| INTRODUZIONE.....   | 9         |
| <b>RUOLO METABOLICO DELL'INSULINA.....</b>  | <b>9</b>  |
| <i>Nutrienti che stimolano la secrezione di insulina.....</i>                                   | <i>11</i> |
| Glucosio.....   | 11        |
| Amminoacidi.....  | 12        |
| <i>Stimoli nervosi che regolano la secrezione di insulina.....</i>                              | <i>12</i> |
| Trasmissione colinergica.....   | 12        |
| Pathway adrenergico.....  | 13        |
| Ormoni peptidici.....   | 13        |
| <b>MECCANISMO MOLECOLARE E FISIOLOGICO DELL'INSULINA.....</b>                                   | <b>14</b> |
| VIA PI3K/AKT.....   | 17        |
| GLUT-4 E GSK3.....  | 17        |
| ALTRI SUBSTRATI DI AKT.....   | 19        |
| VIA MAPK.....   | 20        |
| JNK.....  | 21        |
| p38 MAPK.....   | 22        |
| <b>INSULINO-RESISTENZA.....</b>   | <b>23</b> |
| GENERALITÀ.....   | 23        |
| <b>MECCANISMI DI INSULINO-RESISTENZA.....</b>   | <b>24</b> |
| <i>Disregolazione di FFA e secrezione di adipochine.....</i>                                    | <i>24</i> |
| <i>FFA e fattore di necrosi tumorale <math>\alpha</math>.....</i>                               | <i>25</i> |
| <i>Adiponectina.....</i>  | <i>26</i> |
| <i>Leptina.....</i>   | <i>26</i> |
| <i>Resistina.....</i>   | <i>27</i> |
| <i>Altre adipochine.....</i>  | <i>28</i> |
| <i>Glucocorticoidi e FFA.....</i>   | <i>28</i> |
| <i>Difetti a carico del recettore insulinico (IR) e conseguente insulino-resistenza.....</i>    | <i>29</i> |
| <i>Difetti nella via post-recettoriale dell'insulina e conseguente insulino-resistenza.....</i> | <i>29</i> |
| <b>PATOLOGIE ASSOCIATE ALL'INSULINO-RESISTENZA.....</b>   | <b>31</b> |
| <i>Sindrome metabolica.....</i>   | <i>31</i> |
| Patogenesi della sindrome metabolica.....   | 31        |
| Manifestazioni cliniche della sindrome metabolica.....  | 32        |
| <i>Lipodistrofie ereditarie e acquisite.....</i>  | <i>35</i> |
| <i>Malattie cardiovascolari.....</i>  | <i>37</i> |
| <i>Diabete mellito di tipo 2 (T2DM).....</i>  | <i>37</i> |
| Effetto dannoso degli FFA sulle cellule $\beta$ .....   | 38        |
| Geni di suscettibilità per diabete di tipo 2.....   | 39        |
| <i>Sindrome dell'ovaio policistico (PCOS).....</i>  | <i>39</i> |
| <b>CAPITOLO 2: PRODOTTI DI ORIGINE NATURALE INSULINO-SENSIBILIZZANTI.....</b>                   | <b>41</b> |
| INTRODUZIONE.....   | 42        |
| ANTOCIANINE COME FONTI NELLA DIETA.....   | 43        |

|   |    |
|---|----|
| <i>Antocianine ed effetti benefici per la salute</i> .....                            | 43 |
| <i>Targets cellulari e molecolari delle antocianine</i> .....                         | 44 |
| <b>GLYCYRRHIZA GLABRA, FONTE DI MOLECOLE BIOATTIVE</b> .....                          | 46 |
| <b>FOGLIE DI G. GLABRA, UN PRODOTTO RIVALUTATO</b> .....                              | 48 |
| <b>CICLITOLI, GENERALITÀ</b> .....  | 48 |
| <b>D-PINITOLO</b> .....   | 49 |
| <b>CICLITOLI, INSULINO-RESISTENZA E DIABETE</b> .....                                 | 51 |
| <b>CICLITOLI, IPERTENSIONE E ATROSCLEROSI</b> .....                                   | 53 |
| <b>CICLITOLI E SINDROME DELL’OVAIO POLICISTICO (PCOS)</b> .....                       | 54 |
| <b>PARTE SPERIMENTALE</b> .....   | 56 |
| <b>INTRODUZIONE</b> .....   | 57 |
| <b>SCOPO DEL LAVORO</b> .....   | 61 |
| <b>MATERIALI E METODI</b> .....   | 61 |
| <b>REAGENTI</b> .....   | 61 |
| <b>CAMPIONI TESTATI NEGLI ESPERIMENTI</b> .....                                       | 62 |
| <i>Estratto antocianine (ACN)</i> .....   | 62 |
| <i>Preparazione estratto metanolico di foglie di Glycyrrhiza glabra (GGLME)</i> ..... | 62 |
| <b>ANALISI HPLC / DAD E HPLC / ESI-MS</b> .....                                       | 63 |
| <b>ANALISI HPLC – ELSD</b> .....  | 64 |
| <b>ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE</b> .....   | 65 |
| <i>DPPH test</i> .....  | 65 |
| <i>TEAC test</i> .....  | 65 |
| <i>FRAP test</i> .....  | 65 |
| <i>ORAC test</i> .....  | 66 |
| <i>Bleaching β-carotene</i> .....   | 67 |
| <i>Attività SOD mimetica</i> .....  | 68 |
| <b>COLTURE CELLULARI</b> .....  | 68 |
| <i>Preadipociti murini 3T3-L1</i> .....   | 68 |
| <i>Cellule endoteliali HUVEC</i> .....  | 70 |
| <b>PREPARAZIONE DEL COMPLESSO ALBUMINA (BSA) – ACIDO PALMITICO (PA)</b> .....         | 71 |
| <b>TRATTAMENTO CELLULE 3T3-L1</b> .....   | 71 |
| <b>TRATTAMENTO CELLULE HUVEC</b> .....  | 72 |
| <b>TEST DI CITOTOSSICITÀ</b> .....  | 73 |
| <b>ANALISI ISTOLOGICA DEI LIPIDI INTRACELLULARI</b> .....                             | 73 |
| <b>VALUTAZIONE DELL’ESPRESSIONE GENICA</b> .....                                      | 74 |
| <i>Estrazione dell’RNA</i> .....  | 74 |
| <i>Verifica dell’integrità dell’RNA</i> .....   | 74 |
| <i>Ottenimento del cDNA</i> .....   | 74 |
| <b>PCR REAL-TIME</b> .....  | 75 |
| <i>Espressione genica</i> .....   | 77 |
| <i>Elaborazione post-analisi</i> .....  | 77 |
| <b>ANALISI WESTERN BLOT</b> .....   | 78 |
| <i>Estrazione delle proteine nucleari e citoplasmatiche</i> .....                     | 78 |
| <i>Proteine totali</i> .....  | 79 |
| <i>Determinazione del contenuto di proteine</i> .....                                 | 79 |
| <i>Immunoblotting</i> .....   | 80 |
| <b>ANALISI STATISTICA</b> .....   | 81 |
| <b>RISULTATI</b> .....  | 82 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>STUDIO DELL'EFFETTO PROTETTIVO DELLE ANTOCIANINE IN ADIPOCITI IPERTROFICI</b>   | 82  |
| .....  | 82  |
| <i>EFFETTO PROTETTIVO DELL'ESTRATTO DI ANTOCIANINE (ACN) NELL'IPERTROFIA INDOTTA DA PA</i> ....  | 82  |
| <i>EFFETTO INIBITORIO DELL'ESTRATTO ACN SULL'ATTIVAZIONE DI NF-KB INDOTTA DA PA</i> .....  | 83  |
| <i>EFFETTO DELL'ESTRATTO ACN NEI CONFRONTI DELL'INSULINO-RESISTENZA INDOTTA DA PA</i> .....  | 86  |
| <i>EFFETTO DELL'ESTRATTO ACN SU PI3K E PAKT</i> .....  | 86  |
| <i>EFFETTO DELL'ESTRATTO ACN SULL'ESPRESSIONE DELLA PROTEINA GLUT-1</i> .....  | 87  |
| <b>STUDIO DELL'EFFETTO DI UN ESTRATTO DI FOGLIE DI GLYCYRRHIZA GLABRA (GGLME) SULLA LIPOTOSSICITÀ INDOTTA DA ACIDO PALMITICO (PA) IN ADIPOCITI E CELLULE ENDOTELIALI</b> ..... | 91  |
| <b>CARATTERIZZAZIONE QUALI - QUANTITATIVA DI GGLME</b> .....   | 91  |
| <b>DETERMINAZIONE</b> .....  | 94  |
| <b>D-PINITOLO IN GGLME</b> .....   | 94  |
| <b>ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE</b> .....  | 94  |
| <b>EFFETTO PROTETTIVO DI GGLME NEI CONFRONTI DELL'IPERTROFIA INDOTTA DA PA IN ADIPOCITI MURINI</b> .....   | 96  |
| <b>EFFETTO INIBITORIO DI GGLME SULL'ATTIVAZIONE DELLA VIA INFIAMMATORIA DI NF-KB INDOTTA DA PA</b> .....   | 97  |
| <b>EFFETTO DELL'ESTRATTO GGLME NEI CONFRONTI DELL'INSULINO-RESISTENZA INDOTTA DA PA</b> .....  | 101 |
| .....  | 101 |
| <i>Effetto di GGLME sull'asse PI3K/Akt</i> .....   | 101 |
| <i>Effetto di GGLME sull'espressione della proteina GLUT-1</i> .....   | 102 |
| <b>STUDIO DELL'EFFETTO DI GGLME SULL'INSULINO-RESISTENZA IN CELLULE HUVEC ESPOSTE A PA</b> .....   | 104 |
| .....  | 104 |
| <i>Test di vitalità</i> .....  | 104 |
| <i>Effetto di GGLME sulla fosforilazione attivante di IRS-1 in cellule HUVEC</i> .....   | 105 |
| <i>Effetto di GGLME sulla via di segnale PI3K/Akt/eNOS in cellule HUVEC</i> .....  | 106 |
| <b>CONCLUSIONI</b> .....   | 115 |

## Abstract

La MetS è una condizione clinica che colpisce circa il 25-35% della popolazione e caratterizzata da uno stato infiammatorio diffuso e correlata ad un insieme di fattori di rischio quali obesità, dislipidemia, ipertensione e resistenza all'insulina, in grado di aumentare la possibilità di sviluppare malattie cardiovascolari, ictus e diabete.

La forza trainante della sindrome metabolica è sicuramente l'obesità che è caratterizzata da un eccessivo accumulo di grasso corporeo che può essere dovuto sia all'iperplasia che all'ipertrofia degli adipociti. Nel tessuto adiposo di individui obesi è stata evidenziata un'aumentata espressione del TNF-  $\alpha$ , il quale ha un ruolo cruciale nello stato infiammatorio legato all'obesità. Un'infiammazione cronica di basso grado e un'attivazione del sistema immunitario, osservate nell'obesità viscerale, possono giocare un ruolo importante nella patogenesi dei disturbi metabolici correlati all'obesità. Questi disturbi metabolici aumentano il rischio di sviluppo di diabete mellito di tipo 2 (T2DM) e malattie cardiovascolari. Il T2DM è la patologia metabolica più diffusa al mondo ed è caratterizzata principalmente da resistenza all'insulina che può essere causata da difetti a carico del recettore insulinico (IR) e della via di segnale a valle.

Negli ultimi anni è aumentato l'interesse verso diverse molecole bioattive di origine naturale e gli studi si sono concentrati sulla valutazione dei loro potenziali effetti benefici sulla salute umana, in particolare per evidenziare una eventuale attività modulatrice positiva sulla funzione endoteliale e sul metabolismo dei lipidi e del glucosio.

Nella presente tesi è stato preso in esame un estratto di antocianine (ACN), Medox® Biolink Group AS, Sandnes, Norvegia, un integratore alimentare disponibile in commercio costituito da 17 antocianine (tutti glicosidi di cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina) estratte da mirtillo (*Vaccinium myrtillus*) e ribes nero (*Ribes nigrum*). Le antocianine SONO polifenoli noti per le proprietà antiossidanti, antinfiammatorie e antiiperglicemiche, per valutarne l'effetto protettivo *in vitro* nei confronti dell'infiammazione ed insulino-resistenza indotta da acido palmitico (PA) in adipociti murini 3T3-L1. Successivamente abbiamo concentrato l'attenzione su un estratto metanolico di foglie di *Glycyrrhiza glabra* L. (GGLME) e del D-pinitolo, un ciclitolo naturale di cui è ricco l'estratto, per valutarne l'attività nei confronti dell'infiammazione e dell'insulino-resistenza indotta da PA in cellule endoteliali e adipociti. In questo caso si è voluto anche tener conto della possibilità di utilizzare le foglie di *G. glabra*, generalmente scarto della produzione della liquirizia, come fitocomplesso utile per il trattamento di patologie correlate alla MetS.

Per quanto riguarda l'estratto ACN, i dati hanno dimostrato un effetto protettivo nei confronti dell'infiammazione e insulino-resistenza negli adipociti, ripristinando i livelli di PI3K e di pAkt

alterati da PA; inoltre l'estratto ACN ha dimostrato esercitare effetti positivi sulla via insulinica alterata da PA negli adipociti con un effetto insulino-sensibilizzante.

In maniera analoga all'estratto ACN, anche l'estratto metanolico di foglie di *G. glabra*, ricco in D-pinitolo, ha mostrato un effetto protettivo nei confronti dell'infiammazione e insulino-resistenza negli adipociti. Infatti, i nostri dati dimostrano, per la prima volta, che il pretrattamento con GGLME ha inibito la via proinfiammatoria di NF- $\kappa$ B, indotta da PA, in modo dose-dipendente. Inoltre i dati ci hanno permesso di osservare che l'effetto ottenuto con GGLME è paragonabile a quello del D-pinitolo lasciando ipotizzare che il contenuto di questo inositolo influenza prevalentemente l'attività antiinfiammatoria e insulino-sensibilizzante osservata. Ancora, dai dati ottenuti, l'estratto GGLME, così come il D-pinitolo, ha dimostrato un effetto insulino-mimetico.

I risultati ottenuti sugli adipociti sono stati confermati anche su un altro modello sperimentale che impiega le HUVEC esposte ad alte concentrazioni di PA. I dati ottenuti pretrattando le cellule HUVEC con GGLME dimostrano che l'estratto in esame è stato in grado di ripristinare la sensibilità all'insulina, alterata da PA, aumentando a valle i livelli di pAkt ed eNOS. Anche nelle cellule endoteliali, i dati confermano che l'effetto esercitato dal GGLME è sovrapponibile a quello del D-pinitolo supportando ulteriormente l'importante ruolo del D-pinitolo contenuto nell'estratto. Inoltre, sia l'estratto che il D-pinitolo inducono, anche in questo modello sperimentale, un effetto insulino-mimetico, già dimostrato negli adipociti.

Essendo GGLME ricco anche di altri metaboliti secondari, in particolare flavonoidi, diidrostilbeni, non è possibile escludere che l'effetto protettivo di GGLME, osservato nei confronti dell'infiammazione e dell'insulino-resistenza indotte da PA, sia parzialmente dovuto ai composti polifenolici in esso contenuti. Quindi un'interazione sinergica tra i componenti bioattivi di questo estratto (D-pinitolo e polifenoli) può contribuire a migliorare, anche in modo significativo, l'efficacia protettiva dell'estratto nella sua interezza.

Anche se sono necessari ulteriori studi *in vivo* (su animali e sull'uomo) per chiarire e confermare l'efficacia dimostrata *in vitro*, i risultati consentono di ipotizzare una possibile applicazione di questi estratti vegetali nella prevenzione di condizioni patologiche legate alla sindrome metabolica.

# **PARTE COMPILATIVA**

# **CAPITOLO 1**

## **Insulino-resistenza e patologie correlate**



## Introduzione

L'insulina, isolata per la prima volta nel 1921 da Banting e Best, è un ormone polipeptidico, formato da due catene polipeptidiche, A e B, di 21 e 30 amminoacidi rispettivamente (Wilcox, 2005), tenute insieme da ponti disolfuro (S-S). L'insulina è sintetizzata dalle cellule  $\beta$  delle *isole di Langerhans* del pancreas a partire da precursori proteici, pre-proinsulina che si trasforma in pre-insulina ad opera di enzimi proteolitici. Infine, la pre-insulina viene trasformata in insulina mediante taglio idrolitico, viene asportato il peptide di connessione (peptide C) rendendo così autonome le due catene A e B.

## Ruolo metabolico dell'insulina

L'insulina ha una potente azione anabolizzante, è coinvolta nel metabolismo di glucosio, lipidi e protidi principalmente a livello di fegato, tessuto muscolare e tessuto adiposo. In ciascuno di questi tessuti, l'insulina influenza vari processi anabolici e catabolici:

|                    | Fegato           | Tessuto muscolare                    | Tessuto adiposo   |
|--------------------|------------------|--------------------------------------|---|
| Effetti anabolici  | Glicogenosintesi | Sintesi proteica<br>Glicogenosintesi | Captazione, sintesi<br>Ed esterificazione<br>degli acidi grassi |
| Effetti catabolici | Glicolisi        | Glicolisi                            |   |

**Tabella 1.** Effetti metabolici dell'insulina

Altre importanti cellule bersaglio dell'insulina sono: i neuroni, dove promuove segnali anoressigenici e locomotori, macrofagi e cellule endoteliali. Lo stimolo che maggiormente induce la secrezione di insulina da parte delle cellule  $\beta$ -pancreatiche è il glucosio. La secrezione di insulina basale (a digiuno) è di 0,25 – 1,5 unità all'ora e una volta secreta, svolge la sua potente azione anabolica nel giro di pochi secondi, garantendo la rapida regolazione dell'omeostasi glucidica. La secrezione basale di

insulina rappresenta oltre il 50% della secrezione totale di insulina nelle 24 ore. La percentuale rimanente della produzione giornaliera totale è rappresentata dall'insulina secreta in concomitanza dei pasti. I picchi di secrezione maggiore si hanno in seguito ai pasti (glucosio post-prandiale). Oltre che dal glucosio, la secrezione di insulina è regolata anche da altri nutrienti come amminoacidi, da vari ormoni e dal sistema nervoso autonomo (Tabella 2). Inoltre, l'insulina promuove anche la regolazione del ciclo cellulare. L'insulina endogena ha un'emivita plasmatica molto bassa di circa 5-6 minuti. Una volta esplicata la sua azione, dopo internalizzazione dell'ormone e del suo recettore, la degradazione dell'insulina avviene principalmente nel fegato (per il 60%). (Wilcox, 2005).

| Stimolo        | Nutriente      | Ormone                | Stimolo nervoso      |
|----------------|----------------|-----------------------|----------------------|
| <b>Secrete</b> | Glucosio       | Ormone della crescita | $\beta$ -adrenergico |
|                | Amminoacidi    | Glucagone             | Vago                 |
|                |                | GLP-1                 |                      |
|                |                | GIP                   |                      |
|                |                | Secretina             |                      |
|                |                | Colecistochinina      |                      |
|                |                | Gastrina              |                      |
|                |                | VIP                   |                      |
|                |                | GRP                   |                      |
|                |                | <b>Inibente</b>       |                      |
|                | Somatostatina  |                       |                      |
|                | Adrenalina     |                       |                      |
|                | Noradrenalina  |                       |                      |
|                | Galanina       |                       |                      |
|                | Neuropeptide Y |                       |                      |
|                | CGRP           |                       |                      |

**Tabella 2.** Mediatori della secrezione dell'insulina (Wilcox, 2005). Abbreviazioni: GLP-1 = peptide 1 glucagone-simile; GIP = peptide inibitorio gastrico; VIP = peptide intestinale vasoattivo; GRP = peptide rilasciante gastrina; CGRP = peptide correlato al gene della calcitonina.

## Nutrienti che stimolano la secrezione di insulina

### *Glucosio*

La secrezione di insulina dopo somministrazione endovenosa di glucosio è associata a una *prima fase* in cui viene rilasciata insulina già sintetizzata e immagazzinata, il rilascio di insulina quindi è rapido, inizia entro un minuto con un picco di 3–5 minuti e una durata di 10 minuti; E una *seconda fase* più lenta, in cui viene rilasciata sia insulina già immagazzinata che insulina di nuova sintesi, il rilascio inizia poco dopo la somministrazione di glucosio e dura quanto la durata dell'iperglicemia. Quindi in

soggetti sani, la secrezione pancreatica di insulina stimolata dal glucosio è bifasica. La secrezione complessiva di insulina è direttamente proporzionale alla dose totale di glucosio e alla sua velocità di somministrazione. Nell'uomo la risposta pancreatica maggiore si verifica con 20g di glucosio somministrati per via endovenosa nell'arco di 3 minuti. Contrariamente, la secrezione di insulina dopo assunzione di glucosio per via orale è più variabile: l'assorbimento del glucosio è influenzato dallo svuotamento gastrico e dalla motilità gastrointestinale, gli ormoni gastrointestinali e gli stimoli nervosi associati all'ingestione del glucosio modificano la risposta all'insulina e la secrezione di insulina continua qualche tempo dopo l'ingestione di glucosio.

### ***Amminoacidi***

Come amminoacidi che influenzano la secrezione di insulina troviamo: arginina, L-ornitina, leucina. L'azione dell'arginina viene associata ad un aumento della permeabilità al potassio e l'assorbimento di questo amminoacido a livello delle cellule  $\beta$ -pancreatiche è associato alla depolarizzazione della membrana cellulare e all'apertura dei canali del calcio. L'amminoacido L-ornitina ha un'azione simile all'arginina. La leucina, invece, potenzia la secrezione di insulina stimolando allostericamente il glutammato deidrogenasi inducendo la formazione di  $\alpha$ -chetoglutarato mediante il ciclo di Krebs generando adenosina trifosfato (ATP). (Wilcox, 2005).

### **Stimoli nervosi che regolano la secrezione di insulina**

#### ***Trasmissione colinergica***

Quando il cibo viene visto, annusato o ingerito, l'acetilcolina induce la secrezione di insulina agendo sui recettori colinergici muscarinici presenti nelle cellule  $\beta$ -pancreatiche. In seguito al legame tra acetilcolina e recettore muscarinico, viene attivata la fosfolipasi C e, in seguito ad eventi intracellulari, si ha attivazione della proteina chinasi C, della fosfolipasi A2 e mobilizzazione del calcio intracellulare.

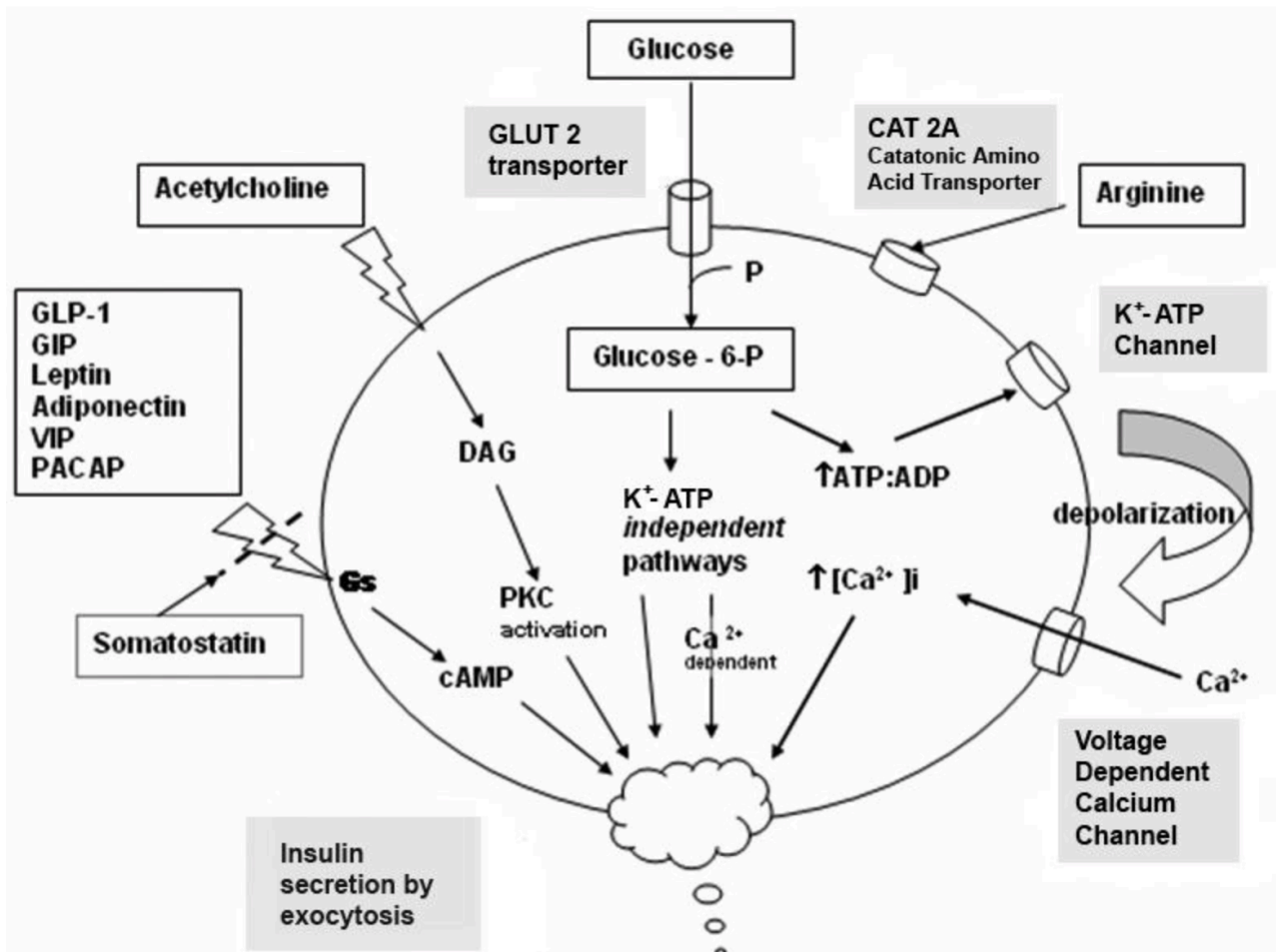
Questi eventi determinano la secrezione di insulina pancreatica, non si verificano a digiuno o se i livelli di glucosio nel sangue sono bassi. (Wilcox, 2005).

### ***Pathway adrenergico***

Nelle cellule  $\beta$ -pancreatiche sono presenti anche recettori adrenergici ( $\alpha_2$ ), l'adrenalina e le altre catecolamine agendo su di essi inibiscono la secrezione di insulina. Questo meccanismo si innesca durante l'esercizio fisico e lo stress. (Wilcox, 2005).

### ***Ormoni peptidici***

La secrezione di insulina è influenzata da vari ormoni peptidici, tra cui: gli ormoni intestinali GLP-114, la somatostatina, la leptina, l'adiponectina. Gli ormoni intestinali GLP-114 promuovono la secrezione di insulina, mentre la somatostatina la inibisce. La secrezione di questi ormoni è stimolata dalla presenza di nutrienti nell'intestino e il loro meccanismo d'azione sembra essere mediato, almeno in parte, dalla formazione di adenosina monofosfato ciclico (cAMP) e dall'attivazione di una proteina chinasi cAMP-sensibile. Anche la leptina e l'adiponectina sembrano agire in maniera simile. (Wilcox, 2005). Inoltre l'ormone della crescita (GSH), la prolattina, il lattogeno placentare (HPL), noto anche come somatomammotropin corionica umana (HCS) e il peptide 1 glucagone-simile (GLP-1) mediano la secrezione di insulina a lungo termine inducendo proliferazione delle cellule  $\beta$  del pancreas e, inoltre, aumentano il rilascio di insulina stimolato dal glucosio e l'espressione del gene dell'insulina (Wilcox, 2005).



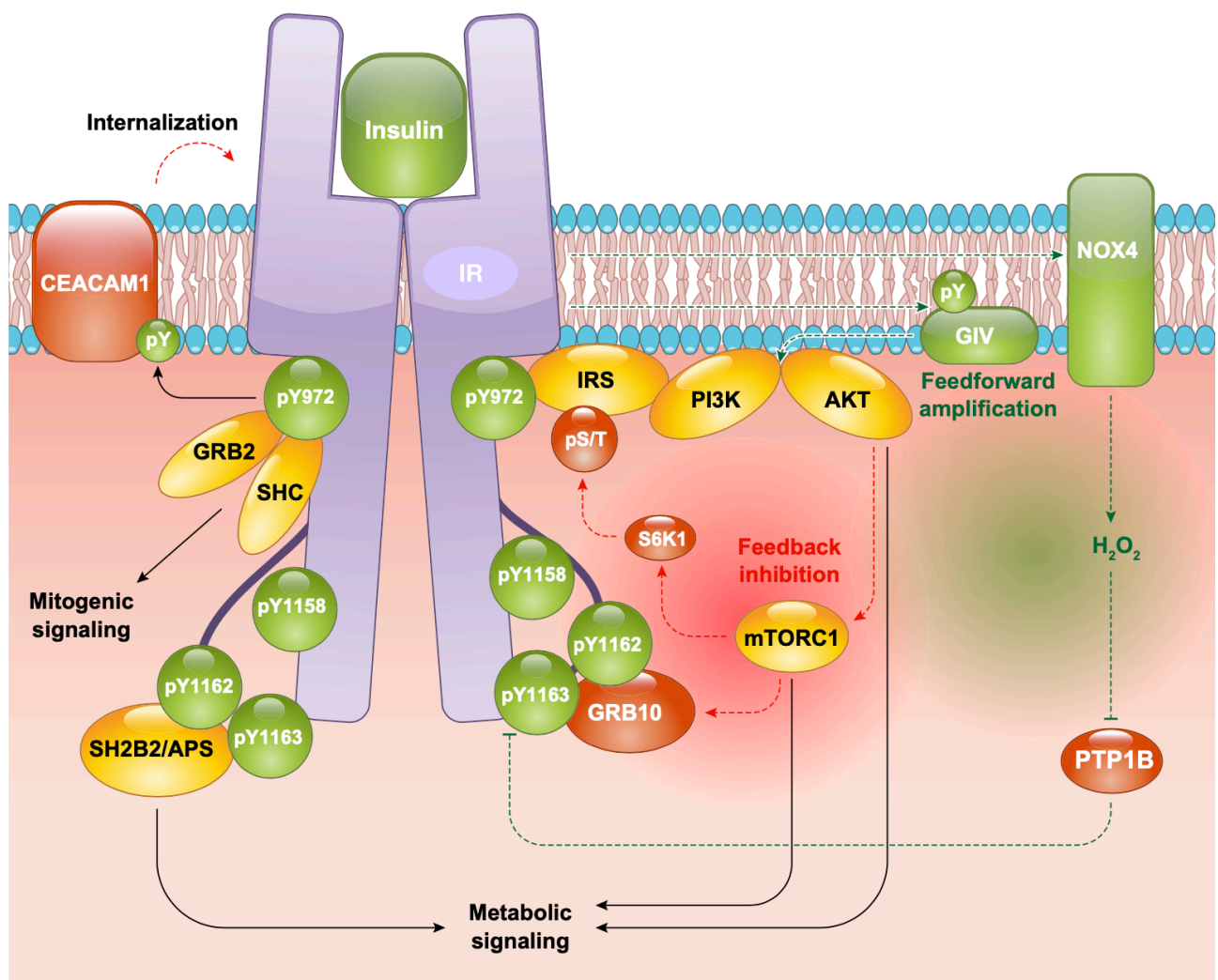
**Figura 1.** *Principali vie che influenzano la secrezione dell'insulina (Wilcox, 2005).* Abbreviazioni: Akt/PKB = protein kinase B; GLP-1 = glucagon-like peptide 1; ATP = adenosine triphosphate; IRS = insulin receptor substrate; ADP = adenosine diphosphate; MAP kinase = mitogen activated protein kinase; cAMP = cyclic adenosine monophosphate; PACAP = pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; DAG = diacylglycerol; PI3K = phosphatidylinositol 3-kinase; GIP = gastric inhibitory peptide; PIPD1 & 2 = phosphatidylinositol dependent protein kinase 1 & 2; PKC = protein kinase C; Glucose-6-P = glucose 6 phosphate; RAS = rat sarcoma protein; GLUT 2 = glucose transport protein 2; SHC = adaptor protein with src-homology; GLUT 4 = glucose transport protein 4; VIP = vasoactive intestinal peptide.

### **Meccanismo molecolare e fisiologico dell'insulina**

L'insulina per poter esplicare la sua azione fisiologica, si deve legare al recettore insulinico (IR) situato a livello della membrana plasmatica della cellula di tessuti insulino-dipendenti o insulino-sensibili. L'IR è una glicoproteina transmembrana appartenente alla famiglia dei recettori tirosin-chinasici ed è costituita da quattro

subunità: due  $\alpha$  e due  $\beta$  legate tra loro con ponti disolfuro. Le due subunità  $\alpha$  extracellulari sono bersaglio dell'insulina, le due subunità  $\beta$  intracellulari possiedono un dominio tirosin-chinasi 343 (Petersen et al., 2018). La subunità  $\alpha$  è costituita da 723 amminoacidi ed ha una massa molecolare di circa 130 kDa, mentre la subunità  $\beta$  è costituita da 620 amminoacidi ed ha una massa molecolare di circa 95 kDa (Lee et al., 1994). La sintesi del recettore insulinico, catalizzata dal gene INSR, avviene nel ribosoma a partire dal reticolo endoplasmatico rugoso, dove si forma il suo precursore che poi viene elaborato nell'apparato del Golgi. Mutazioni a carico del gene INSR sono alla base di gravi sindromi insulino-resistenti ereditarie, quali: insulino-resistenza di tipo A, sindrome di Donohue e la sindrome di Rabson-Mendenhall (Choi et al., 2015). L'IR ha un'emivita piuttosto breve e per questo è soggetto ad un rapido turn over. Esistono due isoforme dell'IR: A e B. Il loro ruolo fisiologico non è del tutto chiarito, ma sembra essere correlato alla loro differente affinità di legame per i fattori di crescita insulino-simili (IGF), soprattutto per IGF2. L'isoforma A, differenziata dall'esone 11, ha un ruolo predominante nella crescita e nello sviluppo prenatale, difatti è espressa molto nel feto, dove ha un'elevata affinità per il fattore di crescita insulino-simile 2 (IGF-2) che promuove lo sviluppo fetale (Kaku et al., 2007). Inoltre l'isoforma A sembra promuovere maggiormente la sintesi di glicogeno. L'isoforma B, invece, ha una bassa affinità per IGF-2 e un'affinità ancor più bassa per IGF-1, presenta un esone aggiuntivo che codifica per 11 amminoacidi, è quella primaria nell'adulto, espressa in fegato, tessuto muscolare e tessuto adiposo bianco ed è perciò quella che media la maggior parte degli effetti metabolici dell'insulina. Quindi ha un ruolo predominante nella regolazione metabolica. L'insulina si lega e attiva il recettore insulinico, il legame tra insulina e recettore determina un cambiamento conformazionale del recettore stesso che porta a trans-autofosforilazione delle tirosine del ciclo di attivazione Tyr1162, Tyr1158 e Tyr1163, inoltre, avviene un'ulteriore fosforilazione dei residui di tirosina come Tyr972 nella regione juxtamembrana. Questi eventi sono importanti per il reclutamento di substrati, uno dei quali è il substrato del recettore dell'insulina-1 (IRS-1) che, in condizioni fisiologiche, viene fosforilato sul residuo Tyr895. L'attivazione

di IRS-1 può portare all'attivazione della via metabolica PI3K/Akt e all'attivazione della via mitogenica MAPK. Le concentrazioni di insulina necessarie per stimolare le risposte metaboliche sono inferiori a quelle necessarie per stimolare le risposte mitogeniche (Petersen et al., 2018). In generale, la fosforilazione della tirosina attiva il pathway insulinico, la fosforilazione di serina / treonina lo inattiva. I vari step nella cascata di segnale dell'insulina sono reazioni enzimatiche reversibili. Oltre al gruppo di chinasi serine / treonine regolate dall'insulina, c'è un gruppo di fosfatasi che sopprime le azioni di queste chinasi attivate dall'insulina. Quindi per ogni chinasi attivata dall'insulina, ci sono fosfatasi che interrompono la sua azione.



**Figura 1.** Meccanismo d'azione dell'insulina. Cerchi e frecce verdi rappresentano eventi di attivazione, cerchi e frecce rosse rappresentano eventi di inibizione (Petersen et al., 2018).



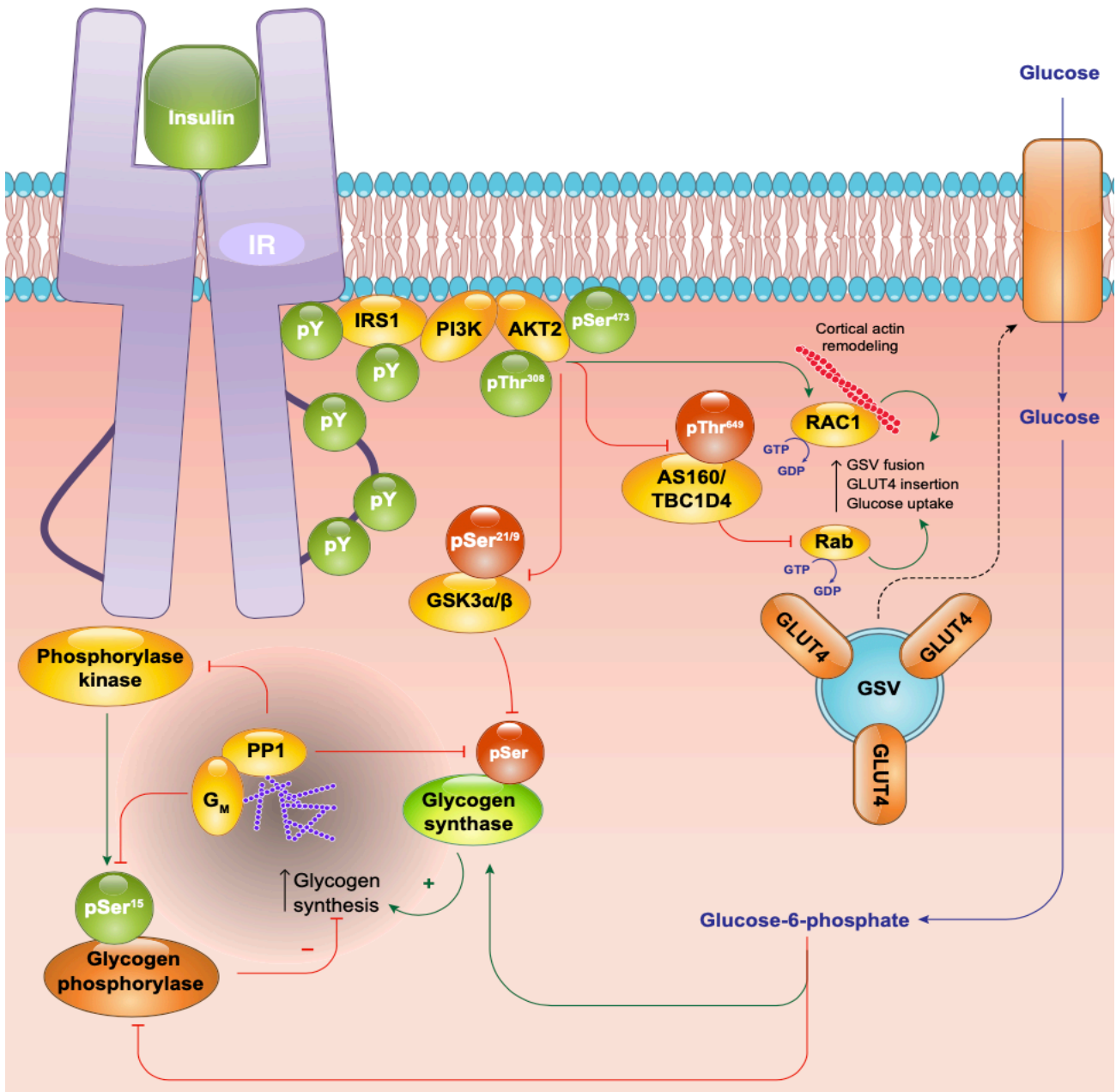
### **Via PI3K/Akt**

Quando IRS-1 è attivato, l'enzima fosfatidil-inositolo-3-kinasi (PI3K) si unisce a IRS-1 mediante il dominio SH2 e, una volta attivato, converte il lipide di membrana fosfatidil-inositolo-4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) in fosfatidil-inositolo-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>). La formazione di PIP<sub>3</sub> induce la migrazione della proteina chinasi B (PKB o Akt) verso la membrana plasmatica dove si lega al PIP<sub>3</sub> mediante il suo dominio PH (Pleckstrin Homology) e si ha così un cambiamento conformazionale della molecola (Frech et al., 1997). Tale cambiamento ha come risultato quello di esporre il sito di fosforilazione sul residuo di treonina 308, situato nel dominio chinasi di Akt, che verrà fosforilato dalla proteina chinasi-1,3-fosfoinositide dipendente (PDK1) promuovendo la parziale attivazione di Akt. La completa attivazione di Akt è associata alla fosforilazione del residuo di serina 473 (Alessi et al., 1997) sul dominio carbossi-terminale. Sebbene, il ruolo di PDK1 nella fosforilazione della treonina sia ben chiaro, il meccanismo di fosforilazione della serina rimane attualmente poco chiaro (Cheng et al., 2005). L'attività di Akt può essere inibita da una fosfatasi lipidica, PTEN (Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10), che inibisce l'azione di PI3K defosforilando PIP<sub>3</sub> a PIP<sub>2</sub>. Quindi PTEN agisce come regolatore negativo della via PI3K/Akt. PTEN è importante per un normale sviluppo cellulare e la sua perdita contribuisce alla cancerogenesi (Vara et al., 2004). Akt, una volta attivata, va nel citoplasma dove è in grado di fosforilare diverse proteine substrato, attualmente come possibili substrati di Akt sono state individuate circa 50 proteine (Hanada et al., 2004). Akt è coinvolta in una serie di risposte cellulari: crescita, sopravvivenza, metabolismo cellulare.

### **GLUT-4 e GSK3**

Tra i substrati di Akt c'è il trasportatore del glucosio GLUT-4, la principale isoforma del trasportatore del glucosio nelle cellule insulino-sensibili del muscolo scheletrico e del tessuto adiposo. Una volta attivato, trasloca a livello della membrana plasmatica permettendo così l'entrata del glucosio nella cellula. Akt fosforila e inattiva la

glicogeno sintasi chinasi 3 (GSK3), (Burgering et al., 1995), una proteina coinvolta nel metabolismo del glucosio, ma anche nella proliferazione cellulare. GSK3 è responsabile della fosforilazione e dell'inattivazione della glicogeno sintasi, quindi quando GSK3 viene inattivata da Akt, avviene la sintesi di glicogeno. Nelle cellule insulino-sensibili, dal glucosio viene sintetizzato il glicogeno per mantenere la normale tolleranza al glucosio (Shan et al., 2011). Inoltre l'inattivazione di GSK3 determina la stabilizzazione e traslocazione nucleare di  $\beta$ -catenine che aumentano la trascrizione di geni, inclusa la ciclina D1, coinvolti nella progressione del ciclo cellulare. (Blume-Jensen et al., 2001).



**Figura 2.** Cascata di eventi in risposta all'insulina nel muscolo scheletrico. L'attivazione del recettore IR, nel miocita scheletrico, ha due principali funzioni metaboliche: entrata del glucosio nella cellula e sintesi di glicogeno. Cerchi e frecce verdi rappresentano eventi di attivazione, cerchi e frecce rosse rappresentano eventi di inibizione (Petersen et al, 2018).

### Altri substrati di Akt

Un altro substrato di Akt è la fosfodiesterasi 3B (PDE3B) che, una volta fosforilata e attivata, contribuisce alla regolazione enzimatica dei livelli intracellulari di nucleotidi ciclici, quali cAMP e cGMP (Kitamura et al., 1999). Akt attiva anche mTOR (bersaglio della rapamicina nei mammiferi), una serina/treonina chinasi che promuove la crescita

cellulare attraverso un aumento della sintesi proteica inducendo la biogenesi del ribosoma. mTOR, fosforilata e attivata da Akt sulla serina2448, controlla S6K1 una chinasi che attiva la proteina ribosomiale S6 che porta ad un aumento della quantità di mRNA che entra nel ribosoma (Scott et al., 1998). Un altro substrato di Akt è l'eNOS (ossido nitrico sintasi endoteliale) responsabile della produzione di NO, uno dei maggiori vasodilatatori (Evan et al., 2001). L'eNOS viene fosforilato sulla serina1177 e una volta attivato influenza l'angiogenesi tumorale e controlla la pressione sanguigna (Alderton et al., 2001). Inoltre, Akt controlla il ciclo cellulare fosforilando e inattivando i fattori di trascrizione FOXO (FOXO1, FOXO3 e FOXO4) che inducono l'espressione di vari geni pro-apoptotici e geni che promuovono l'arresto del ciclo cellulare in fase G1/S (come il gene p27KIP1). (Harris, 2003). Il primo bersaglio apoptotico di Akt è BAD (Datta et al., 1997), facente parte della famiglia delle proteine Bcl-2 che danno il via al processo apoptotico legandosi a Bcl-XL all'esterno della membrana mitocondriale, promuovendo il rilascio del Citocromo C nel citosol. Akt fosforila BAD sulla serina 136 (Datta et al., 1999) inibendo così la formazione del complesso Bcl-2/Bcl-XL e il conseguente rilascio del Citocromo C da parte del mitocondrio che porterebbe ad apoptosi. (Harris, 2003).

### **Via MAPK**

La via MAPK (proteina chinasi attivata da mitogeno) comporta la trasduzione di segnali dall'ambiente extracellulare al nucleo cellulare dove vengono attivati geni specifici per la crescita, la differenziazione e la sopravvivenza cellulare (Orton et al., 2005). La via MAPK comprende tre chinasi che vengono attivate mediante fosforilazione sequenziale: MAPK viene attivata da MAPKK / MKK (MAPK chinasi), che a sua volta viene attivata da MAPKKK / MKKK (MAPKK chinasi). Queste chinasi vengono attivate in seguito a stimoli, quali citochine, fattori di crescita, neurotrasmettitori, stress cellulare e aderenza cellulare (Orton et al., 2005). Le MAPK vengono inattivate da fosfatasi MKP (fosfatasi MAPK) (Farooq e Zhou, 2004). La famiglia delle MAPK dei mammiferi comprende le chinasi regolate da segnali

extracellulari, ERK, p38 e chinasi N-terminale c-Jun (JNK, denominata anche proteina chinasi attivata dallo stress – SAPK). L'attivazione di ERK 1/2, in seguito ad infiammazione legata all'obesità, porta alla produzione di FFA e citochine pro-infiammatorie; ciò causa un aumento dell'infiammazione e della resistenza all'insulina (Nandipati et al., 2017). JNK e p38 MAPK vengono attivate da fattori di stress metabolici, quali l'infiammazione e il dispendio energetico (Solinas et al., 2016; Nandipati et al., 2017) e sono importanti regolatori della funzione metabolica del muscolo scheletrico (Sabio et al., 2010.; Solinas et al., 2016); sono coinvolti nella via di segnale dell'insulina, nell'omeostasi del glucosio, nel metabolismo degli acidi grassi e dispendio energetico (Manieri et al., 2015; Pal et al., 2016; Akimoto et al., 2005).

## **JNK**

JNK presenta tre isoforme, JNK1, JNK2 e JNK3; JNK1 e JNK2 sono espresse in maniera ubiquitaria, invece JNK3 è espressa in un numero limitato di tessuti, tra cui cuore e cervello (Hirosumi et al., 2002). Una dieta ricca di grassi induce l'attivazione della via di segnale JNK1 che porta a insulino-resistenza e obesità (Nandipati et al., 2017). L'attivazione di JNK1 è correlata alla resistenza all'insulina osservata negli stati infiammatori. Nella risposta infiammatoria, ad esempio in risposta a TNF- $\alpha$ , l'attivazione di JNK1 segue una via parallela all'attivazione di NF-KB (Yazici et al., 2017). Recenti studi su topi knockout JNK1 mostrano una protezione dall'insulino-resistenza indotta dalla dieta. L'inattivazione di JNK1 in macrofagi e adipociti ha portato ad un aumento del dispendio energetico, protezione dall'obesità indotta dalla dieta, dalla steatosi epatica e dall'intolleranza al glucosio (Tuncman et al., 2006). L'inattivazione di JNK1 aumenta anche il dispendio energetico attraverso un aumento dell'espressione di termogenina o UCP1 (proteina disaccoppiante 1) del tessuto adiposo bruno (BAT), riduzione del peso corporeo, del contenuto di trigliceridi epatici, riduzione dell'attivazione di PKC $\epsilon$  e protezione dall'insulino-resistenza. La delezione specifica nel fegato di JNK1 promuove la steatosi epatica, con una maggiore espressione di enzimi lipogenici chiave, alterazione della via di segnale dell'insulina e

resistenza all'insulina epatica (Zhang et al. 2011b). In topi knockout JNK1 specifici per i muscoli, alimentati con dieta ricca di grassi, si è verificato un aumento di peso e una compromissione della tolleranza al glucosio. Tuttavia, questi topi hanno mostrato un modesto miglioramento nell'assorbimento del glucosio a livello muscolare, un miglioramento nella via di segnale dell'insulina. Inoltre, questi topi hanno manifestato sorprendentemente anche un aumento dell'infiammazione nel tessuto adiposo e un modesto aumento della steatosi epatica, senza differenze nella sensibilità insulinica adiposa o epatica. Pertanto JNK1 negli adipociti può essere correlato ad un aumento della lipolisi, tuttavia nel fegato può sopprimere la lipogenesi. Quindi, JNK1 sembra avere effetti diversi nei vari tessuti nella patogenesi dell'insulino resistenza. Alterazioni dell'attività di JNK1 possono alterare la reattività all'insulina, il suo ruolo può essere indiretto e può essere correlato alla sua capacità di alterare il metabolismo lipidico intracellulare (Samuel e Shulman 2012).

### **p38 MAPK**

p38 MAPK è una proteina che presenta quattro isoforme  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ; le isoforme  $\alpha$  e  $\beta$  sono espresse ubiquitariamente, l'isoforma  $\gamma$  è espressa nel muscolo scheletrico, mentre l'isoforma  $\delta$  è espressa in testicoli, pancreas e intestino tenue (Schindler et al., 2007). L'attivazione di p38 MAPK causa lipotossicità in adipociti e in cellule stellate. Nei tessuti adiposo e intestinale è stata evidenziata una maggiore fosforilazione di p38 MAPK (Dahan et al., 2008).

## **Insulino-resistenza**

### **Generalità**

L'insulino-resistenza è uno stato patologico comune in cui le cellule bersaglio non rispondono ai normali livelli di insulina circolante. Ne risulta l'incapacità dell'insulina di fornire l'omeostasi normale del glucosio e dei lipidi. Pertanto, per mantenere la normoglicemia sono necessarie concentrazioni di insulina più alte del normale. Quindi, nell'insulino-resistenza, si sviluppa iperinsulinemia compensativa, ovvero maggiore secrezione di insulina da parte delle cellule  $\beta$  del pancreas. I marker clinici della resistenza all'insulina sono: obesità viscerale, acantosi nigricans, acne, irsutismo e steatosi epatica. L'insulino-resistenza viene associata ad una serie di patologie, tra cui: obesità, sindrome metabolica, diabete mellito di tipo II (DM2), lipodistrofie, sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) e infezione cronica. Per valutare la sensibilità dei tessuti all'insulina vengono utilizzate varie metodiche, quella di riferimento è il *clamp euglicemico iperinsulinemico* che si basa sull'infusione di una quantità di insulina per 120 min, in maniera tale da portare i valori ematici dell'ormone ad un valore costante di 100  $\mu\text{U}/\text{mL}$ . La misurazione della quantità di glucosio necessaria per mantenere livelli glicemici normali, studia la capacità dell'insulina esogena di far penetrare il glucosio nei tessuti. Per valutare, invece, la sensibilità tissutale all'insulina endogena si usa il clamp iperglicemico che si basa sull'infusione continua di glucosio per 120 min, determinando così uno stato iperglicemico costante intorno a 125 mg/dl sopra il livello basale. Infine, si misura la quantità di glucosio necessaria per avere un livello costante di iperglicemia. Altre metodiche sono: la misurazione della concentrazione plasmatica di insulina a digiuno, l'indice di valutazione del modello di omeostasi (HOMA), indice quantitativo di controllo della sensibilità all'insulina (QUICKI) e l'indice McAuley.

$$\text{HOMA index} = \text{insulin (mU/L)} \times [\text{glucose (mmol/L)}/22.5]$$

$$\text{QUICKI} = \frac{1}{\log \text{insulin (mU/L)} + \log \text{glucose (mg/dL)}}$$

$$\text{McAuley index} = e^{[2.63 - 0.28 \ln(\text{insulin (mU/L)}) - 0.31 \ln(\text{triglycerides (mmol/L)})]}$$

**Figura 4.** Modelli per la valutazione dell'insulino-resistenza: indice HOMA, QUICKI e McAuley (Mlinar et al., 2007).

L'eziologia dell'insulino-resistenza comprende fattori genetici e ambientali: assunzione di cibo, ridotta attività fisica, invecchiamento, fumo, somministrazione di farmaci (ad es. diuretici tiazinici, antagonisti beta-adrenergici, glucocorticoidi). Il fattore più importante è l'obesità che di solito è di origine combinata, poligenetica e ambientale. Nell'insulino-resistenza, il tessuto adiposo viscerale è resistente all'effetto antilipolitico dell'insulina e rilascia quantità eccessive di acidi grassi liberi (FFA). Inoltre anche diversi ormoni e citochine (adipochine) del tessuto adiposo contribuiscono all'insulino-resistenza. Viceversa l'apporto calorico limitato, la riduzione del peso e l'attività fisica migliorano la sensibilità all'insulina. (Mlinar et al., 2007).

## **Meccanismi di insulino-resistenza**

### **Disregolazione di FFA e secrezione di adipochine**

Una maggiore disponibilità e utilizzo di acidi grassi liberi (FFA), svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'insulino-resistenza. Vari studi scientifici dimostrano anche una correlazione tra insulino-resistenza e aumento del fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleuchina 6 (IL-6), proteina chemioattrattante macrofagi e monociti-1 (MCP-1), inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1), adiposina e ridotta adiponectina (Mlinar et al., 2007).



## **FFA e fattore di necrosi tumorale $\alpha$**

Il tessuto adiposo rilascia grandi quantità di TNF- $\alpha$  che è coinvolto nello sviluppo dell'insulino-resistenza. Il TNF- $\alpha$  è il principale fattore autocrino/paracrino che innesca la secrezione di acidi grassi liberi (FFA) dal tessuto adiposo nel circolo sanguigno. Il TNF- $\alpha$  media la repressione di molti geni responsabili dell'assorbimento e della conversazione di glucosio e FFA. TNF- $\alpha$  e FFA compromettono l'azione dell'insulina nei tessuti insulino-sensibili, specialmente nel tessuto muscolare. Secondo l'ipotesi dell'offerta lipidica (ipotesi di Randle), gli FFA rilasciati agiscono come substrato predominante nel metabolismo intermedio. L'aumento dei rapporti NADH/NAD<sup>+</sup> e acetil-CoA/CoA potrebbe essere la ragione della riduzione dell'assorbimento del glucosio, il che si traduce in resistenza all'insulina. Nel fegato, gli alti livelli di FFA, secreti dal tessuto adiposo viscerale, forniscono un abbondante substrato per la sintesi di trigliceridi, VLDL, fibrinogeno, PAI-1 e per la gluconeogenesi. Il TNF- $\alpha$  reprime i geni per l'assorbimento del glucosio e la  $\beta$ -ossidazione. I trigliceridi in eccesso si accumulano e inoltre gli FFA riducono la clearance epatica dell'insulina contribuendo così all'iperinsulinemia. Nel muscolo, le alte concentrazioni di FFA favoriscono la  $\beta$ -ossidazione che riduce l'assorbimento e l'ossidazione del glucosio. La  $\beta$ -ossidazione non elimina efficacemente gli FFA dalla circolazione e ancor di più in assenza di attività fisica. La sintesi di glicogeno viene inibita e inoltre il muscolo essendo il tessuto che utilizza maggiormente glucosio (80-90%), il ridotto utilizzo di esso contribuisce notevolmente all'iperglicemia. Anche nel muscolo gli FFA vengono immagazzinati sottoforma di trigliceridi. Nel tessuto adiposo gli FFA inibiscono la lipoproteina lipasi, di norma attivata dall'insulina, rendendo impossibile l'eliminazione degli FFA dalla circolazione. Nelle cellule  $\beta$  del pancreas la lunga esposizione ad alte concentrazioni di FFA compromette la secrezione di insulina. Il TNF- $\alpha$  ha dimostrato di downregolare i geni per: adiponectina, trasportatore del glucosio-4 (GLUT-4), CCAAT/proteina legante il potenziatore  $\alpha$  (C/EBP-  $\alpha$ ), recettore attivato dal proliferatore del perossisoma  $\gamma$  (PPAR-  $\gamma$ ) e perilipina negli adipociti. Il TNF- $\alpha$  sovraregola molti geni espressi nel tessuto adiposo che sono

responsabili dell'infiammazione, della risposta immunitaria e del bilancio energetico: adesione vascolare molecola-1 (VCAM-1), inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1 (PAI-1), IL-6, IL-1  $\beta$ , angiotensinogeno, resistina, leptina. (Mlinar et al., 2007).

### **Adiponectina**

L'adiponectina è correlata all'insulino-resistenza nella lipodistrofia, nell'obesità e negli stati infiammatori. La sintesi di adiponectina è stimolata da insulina e fattore di crescita insulino-simile (IGF-1) ed inoltre, essa è secreta esclusivamente dagli adipociti. I livelli di adiponectina aumentano con la perdita di peso e con l'impiego di farmaci quali i tiazolidinedioni (TZD) che sono agonisti del PPAR- $\gamma$ . La sintesi di adiponectina viene compromessa negli stati di eccesso calorico che potrebbero essere associati a resistenza o carenza di leptina. L'adiponectina migliora la sensibilità all'insulina attraverso vari meccanismi; Nel fegato induce l'ossidazione di acidi grassi, diminuisce la sintesi lipidica, diminuisce l'assorbimento di FFA e reprime la gluconeogenesi mediante downregulation enzimatica. Nel tessuto muscolare favorisce l'ossidazione di glucosio e FFA. Questi effetti sono in parte dovuti all'attivazione di cAMP e pertanto l'adiponectina riduce livelli plasmatici di FFA e glucosio. Il catabolismo degli FFA viene stimolato direttamente o attraverso la stimolazione dei recettori PPAR- $\gamma$ . L'adiponectina esercita effetti sulla trascrizione genica mediante l'inibizione del fattore di trascrizione kB (NF-kB) che viene attivato da TNF- $\alpha$ . L'adiponectina riduce l'espressione delle molecole di adesione sulla parete dei vasi sanguigni, inibisce la chemiotassi dei macrofagi e la loro conversione in cellule schiumose, la proliferazione delle cellule muscolari lisce e gli eventi infiammatori nell'aterogenesi promossi da IL-6, PAI-1 ecc.. Inoltre l'adiponectina sopprime la secrezione di TNF- $\alpha$ . (Mlinar et al., 2007).

### **Leptina**

La leptina ha dimostrato di essere implicata nel promuovere la sensibilità all'insulina. Essa è secreta principalmente dal tessuto adiposo, riduce l'assunzione di cibo e

aumenta il dispendio energetico promuovendo indirettamente la sensibilità all'insulina. Gli effetti della leptina sono mediati dalla sua azione sull'ipotalamo e sui tessuti bersaglio (muscoli, gonadi, cellule  $\beta$ , fegato). Le concentrazioni di leptina sono correlate alla massa grassa corporea totale, stati di ridotta massa adiposa (lipodistrofie) sono caratterizzati da ridotte concentrazioni plasmatiche di leptina. Inoltre un modello murino con soppressione dello sviluppo del tessuto adiposo ha prodotto topi iperfagici con diabete e insulino-resistenza. Il meccanismo suggerito che causava insulino-resistenza era il deficit di leptina e adiponectina a causa dell'assenza del tessuto adiposo. Infatti la somministrazione di questi due ormoni ha invertito l'insulino-resistenza. Pertanto, leptina e adiponectina sembrano essere fondamentali per la normale sensibilità all'insulina. La leptina è un fattore di fertilità essenziale, ridotte concentrazioni di leptina determinano soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi. Inoltre la leptina stimola l'attività simpatica agendo su neuroni sensibili alla leptina nell'ipotalamo. Ciò potrebbe in parte spiegare lo sviluppo dell'ipertensione nell'obesità viscerale e negli stati non obesi. In base a ciò, l'attività simpatica negli uomini non obesi e normotesi si correla bene con le concentrazioni di leptina legata alle proteine. (Mlinar et al., 2007).

### **Resistina**

La resistina viene secreta in misura maggiore dal tessuto adiposo sottocutaneo, sul ruolo della resistina nell'insulino-resistenza e nell'obesità ci sono pareri contrastanti; Alcuni studi dimostrano che in roditori obesi, i livelli sierici di resistina sono aumentati e pertanto si ipotizza che essa contribuisca all'insulino-resistenza. Altri studi, invece, non confermano questi risultati. La resistina umana mostra solo il 64% di omologia con la resistina di roditori e vi sono prove crescenti che l'espressione della resistina nel tessuto adiposo umano e la sua concentrazione plasmatica non sono associate a insulino-resistenza e obesità nell'uomo. Inoltre si discute se la resistina sia secreta dagli adipociti o da cellule stromali non ancora identificate e se la resistina circolante abbia qualche associazione con il tessuto adiposo. (Mlinar et al., 2007).

### **Altre adipochine**

Adipochine quali: MCP-1, PAI-1, IL-6 e IL-10 sono state studiate in associazione all'insulino-resistenza. MCP-1 è secreto dagli adipociti e sembra sia direttamente implicato nell'insulino-resistenza poiché è stato dimostrato che altera l'assorbimento del glucosio stimolato dall'insulina e la fosforilazione del recettore IR sul residuo di Tyr negli adipociti coltivati. MCP-1 promuove l'aterosclerosi attirando i macrofagi e favorendone l'accumulo nelle pareti dei vasi. La PAI-1 è maggiormente espressa nel tessuto adiposo viscerale, è fortemente associata ad obesità viscerale, insulino-resistenza e sindrome metabolica. I livelli plasmatici di PAI-1 diminuiscono dopo la perdita di peso e dopo terapia con sostanze sensibilizzanti all'insulina. IL-6 è fortemente implicata nell'insulino-resistenza in quanto le concentrazioni plasmatiche, l'espressione nel tessuto adiposo e i polimorfismi dell'IL-6 sono ben correlati con obesità e insulino-resistenza. IL-6 interferisce con l'azione dell'insulina, inibisce l'adipogenesi e la secrezione di adiponectina. Nel sistema nervoso, IL-6 ha effetti opposti favorendo il dispendio energetico. La somministrazione di IL-6 nei roditori ha invertito l'obesità. L'IL-10 promuove la sensibilità all'insulina: nell'obesità senza sindrome metabolica, i livelli plasmatici di IL-10 sono aumentati, mentre nella sindrome metabolica i suoi livelli sono diminuiti. (Mlinar et al., 2007).

### **Glucocorticoidi e FFA**

È noto che i glucocorticoidi sono antagonisti dell'insulina e quindi potrebbero indurre insulino-resistenza. Questi farmaci migliorano la gluconeogenesi epatica e il rilascio di glucosio, compromettono l'assorbimento di glucosio attraverso vari meccanismi come la maggiore disponibilità di FFA che riduce l'ossidazione del glucosio e quindi il suo assorbimento nei tessuti periferici. Inoltre i glucocorticoidi promuovono la lipolisi mediante diversi meccanismi, ad esempio convertendo la noradrenalina in adrenalina (mediante fenil-etanolamina N-metiltrasferasi nei muscoli scheletrici) che agisce sulla lipasi nel tessuto adiposo aumentando la lipolisi oppure ancora inibendo la lipoproteina lipasi impedendo l'assorbimento di FFA nel tessuto adiposo. Nel muscolo

scheletrico, in presenza di glucocorticoidi è stata osservata un'inibizione della traslocazione del GLUT-4. Inoltre è stato dimostrato che i glucocorticoidi inibiscono la vasodilatazione indotta dall'insulina in seguito al rilascio di NO, riducendo la quantità di glucosio nei tessuti bersaglio. Questi effetti dei glucocorticoidi sono potenziati dagli FFA che aumentano il legame dei glucocorticoidi con il loro recettore. Tutti questi meccanismi contribuiscono all'insulino-resistenza. (Mlinar et al., 2007).

### **Difetti a carico del recettore insulinico (IR) e conseguente insulino-resistenza**

La compromissione dell'azione dell'insulina può essere dovuta a difetti a livello del recettore insulinico (IR). Questi difetti possono essere causati da fattori genetici o ambientali. A carico del gene che codifica per il recettore dell'insulina sono state identificate più di 60 mutazioni. L'insulino-resistenza di tipo A è associata a una mutazione eterozigote che porta ad una ridotta fosforilazione di Tyr nella subunità  $\beta$  dopo legame con insulina (McIntyre EA et al., 2002). Nella sindrome di Rabson-Mendenhall e nella sindrome di Donohue, si presume che le mutazioni del gene del recettore dell'insulina compromettano il legame con l'insulina al recettore (McIntyre EA et al., 2002). L'insulino-resistenza può essere dovuta anche alla produzione anormale di anticorpi per il recettore insulinico (insulino-resistenza di tipo B) (O'Rahilly S., 2002). L'insulino-resistenza è correlata anche a mutazioni a carico di PPAR-  $\gamma$ , non associate a lipodistrofia (Borroso et al., 1999). Inoltre, secondo uno studio su topi iperinsulinemici, la ridotta fosforilazione di Tyr di IRS-1 che è stata trovata, potrebbe essere una conseguenza della ridotta attività del recettore insulinico (Saad et al., 1992). La disregolazione del rapporto tra l'isoforma A e B del recettore insulinico è associata a resistenza all'insulina, a invecchiamento e ad una maggiore attività proliferativa dei tessuti normali e neoplastici (Belfiore A. et al., 2017).

### **Difetti nella via post-recettoriale dell'insulina e conseguente insulino-resistenza**

La compromissione dell'azione dell'insulina può essere dovuta anche a difetti a livello post-recettoriale. Questi difetti possono essere causati da fattori genetici o ambientali.

Recenti studi dimostrano che l'aumentata fosforilazione della serina / Treonina dell'IRS-1 contribuisce all'insulino-resistenza (Mlinar et al., 2007). L'aumentata fosforilazione della Ser / Thr di IRS-1, potrebbe essere dovuta all'aumentata concentrazione di TNF- $\alpha$  e all'iperinsulinemia che è secondaria all'insulino-resistenza (Mlinar et al., 2007). L'iperinsulinemia, oltre a causare la degradazione di IRS-1, potrebbe anche influenzare la concentrazione di IRS-2 e provocare, così, variazioni a valle nella via di segnale dell'insulina (Pirola et al., 2004). Il TNF- $\alpha$ , IL-6 e insulina attivano anche i soppressori di citochine, SOCS-1 e -3, che competono con l'IRS-1 per l'associazione con il recettore dell'insulina, inibiscono Janus chinasi (JAK), coinvolte nel segnale dell'insulina, e aumentano la degradazione proteosomica dell'IRS-1 (Kile et al, 2002). Inoltre TNF- $\alpha$  riduce anche l'espressione di GLUT4 (Ruan et al, 2002). Protein chinasi C (PKC), chinasi PI3K, MAP-chinasi (chinasi-1 e 2 extracellulari-regolate da segnale Erk) sono ritenute responsabili della fosforilazione di Ser / Thr, seguita da una maggiore degradazione proteosomica dell'IRS-1. È importante sottolineare che un certo stato di fosforilazione Ser / Thr è comunque necessario per il successo della fosforilazione di Tyr e la conseguente attivazione della via dell'insulina PI3K/Akt. Quindi è da chiarire in che misura e su quali siti Ser / Thr IRS-1 deve essere fosforilato affinché si manifestino i diversi effetti (Mlinar et al., 2007). È stato dimostrato che elevate concentrazioni plasmatiche di acidi grassi liberi (FFA), mediante trasformazione in diacilglicerolo e acil-CoA, determinano un'aumentata fosforilazione della serina dell'IRS-1. Uno studio su ratti evidenzia che le aumentate concentrazioni di FFA hanno portato ad una ridotta attività di IRS-1, IRS-2, PI3K, PKB- $\alpha$ , PKC- $\lambda$ , PKC- $\zeta$  e GSK nel muscolo di ratto (Pirola et al, 2004). Inoltre l'aumentata concentrazione di FFA in topi transgenici, ha portato ad un aumento della proteina Munc18c, un regolatore negativo della traslocazione del trasportatore del glucosio GLUT-4 nella membrana plasmatica (Schlaepfer et al., 2003). Le proteine glicate, che si formano in seguito a iperglicemia, hanno mostrato di diminuire l'attività intracellulare di PI3K, Akt e GSK-3 contribuendo a insulino-resistenza. L'UDP-N-acetil glucosamina essendo il substrato principale per la glicosilazione cellulare,

migliora la glicosilazione di IRS-1, diminuendo la sua attività e la glicosilazione della glicogeno-sintasi e riducendo così la sua risposta all'insulina (Pirola et al., 2004). Inoltre è stato dimostrato che mutazioni a carico di determinate proteine di segnale come IRS-1, -2, aPKC, PKB $\beta$ , glicogeno sintasi e proteina Foxo1, determinano insulino-resistenza (Schlaepfer et al., 2003).

## **Patologie associate all'insulino-resistenza**

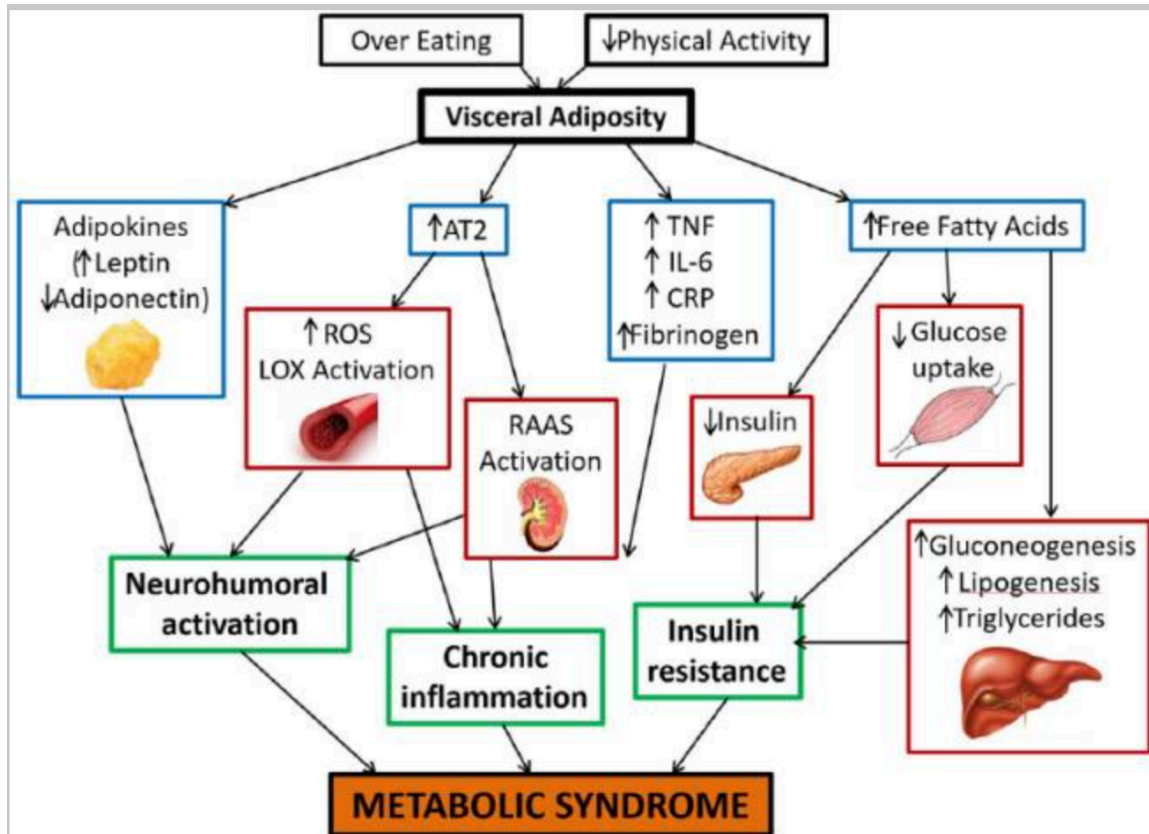
### **Sindrome metabolica**

La sindrome metabolica (MetS) rappresenta una delle principali sfide di salute pubblica e clinica in tutto il mondo. Questa sindrome colpisce tra il 10 e l'84% delle persone a seconda della regione geografica, dell'ambiente urbano o rurale, delle caratteristiche demografiche individuali della popolazione: sesso, età, razza, origine etnica (Gluvic et al., 2017). Negli Stati Uniti questa patologia colpisce un quinto o più della popolazione, In Europa un quarto della popolazione. La MetS rappresenta un importante fattore di rischio cardiovascolare ed è correlata anche a insulino-resistenza, diabete mellito di tipo 2 (T2DM), obesità, iperlipidemia, ipertensione, microalbuminuria (Rochlani et al., 2017). Le persone con MetS hanno un tasso di mortalità più elevato rispetto alle persone senza MetS, causato principalmente da aterosclerosi progressiva, accelerata da componenti pro-infiammatori e pro-coagulazione (Gluvic et al., 2017).

### ***Patogenesi della sindrome metabolica***

La patogenesi della MetS è complessa e rimane da chiarire del tutto, è da chiarire ancora se le varie problematiche correlate alla sindrome metabolica rappresentano patologie distinte o manifestazioni di un meccanismo patogenico comune. L'ampia diffusione della MetS a livello geografico sottolinea l'importanza di fattori ambientali e di stile di vita come la mancata attività fisica. Nella maggior parte dei casi di sindrome metabolica, l'adiposità viscerale è risultata essere un fattore scatenante primario, ciò evidenzia come il consumo di calorie in eccesso sia uno dei fattori principali che causano questa patologia. Comunque, insulino-resistenza, attivazione neuro-ormonale

e infiammazione cronica sembrano essere i principali fattori responsabili dell'inizio e della progressione dei problemi cardiovascolari correlati alla MetS (Rochlani et al., 2017).



**Figura 5.** Meccanismi fisiopatologici nella sindrome metabolica. AT2, recettore dell'angiotensina II tipo 2; CRP, proteina C reattiva; IL-6, interleuchina 6; LOX, lipoproteine a bassa densità ossidate simili alla lectina; RAAS, sistema renina-angiotensina-aldosterone; ROS, specie reattive dell'ossigeno; TNF, fattore di necrosi tumorale. (Rochlani et al., 2017).

### ***Manifestazioni cliniche della sindrome metabolica***

Nelle prime fasi della sindrome metabolica si ha un livello di FFA moderatamente elevato e normale tolleranza al glucosio (Grundy et al., 2004). In seguito a concentrazioni di insulina non ottimali, si ha alterata glicemia a digiuno (IFG) o ridotta tolleranza al glucosio (IGT). In seguito alla degenerazione delle cellule  $\beta$ -pancreatiche e alla conseguente diminuzione delle concentrazioni plasmatiche di insulina, i livelli di FFA aumentano, si ha iperglicemia e le condizioni di insulino-resistenza avanzano



a diabete di tipo 2 (DM2) [Reaven et al., 2001]. Si ha dislipidemia aterogena, aumenta la sintesi delle lipoproteine a densità molto bassa VLDL (Very Low Density Lipoprotein) nel fegato, diminuiscono le concentrazioni plasmatiche di lipoproteine ad alta densità HDL (High-Density Lipoprotein) ed aumentano le lipoproteine a bassa densità LDL (Low Density Lipoproteins) [Eckel et al., 2005]. Si ha anche ipertensione dovuta alla ridotta vasodilatazione in seguito a carenza di NO endoteliale che di norma viene rilasciato in seguito all'attivazione del pathway insulinico PI3K/Akt, inoltre la vasocostrizione è favorita anche dall'aumento dei livelli plasmatici di FFA. L'insulina stimola il sistema nervoso simpatico, le concentrazioni plasmatiche di leptina legata alle proteine nei soggetti normotesi, sono correlate all'attività del simpatico, quindi la leptina potrebbe dare un contributo all'ipertensione (Tank J et al., 2003). Altre manifestazioni della sindrome metabolica sono: stato pro-trombotico per aumento dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1 (PAL-1 - Plasminogen activator inhibitor-1) e fibrinogeno (Grundy et al., 2004). Stato pro-infiammatorio caratterizzato da un aumento della proteina C-reattiva (PCR) (Mlinar et al., 2007). Fegato grasso e steatoepatite dovute all'aumento di VLDL a livello epatico nello stato di insulino-resistenza, iperuricemia, aumento dell'omocisteina e anomalie vascolari con microalbuminuria (Eckel et al., 2005). L'iperuricemia probabilmente è una conseguenza dell'iperinsulinemia, il rene si adatta alle alte concentrazioni di insulina e si ha così una ridotta secrezione di acido urico, aumentandone così il livello plasmatico (Reaven et al., 2001). Inoltre un'altra manifestazione clinica è l'acanthosis nigricans che è un marcatore clinico importante dell'insulino-resistenza e consiste in alterazioni cutanee iperpigmentate basate sull'iperplasia epidermica. Si ritiene sia correlata all'iperinsulinemia in quanto studi scientifici dimostrano che l'insulina accelera la crescita di cellule epidermiche in coltura (Doi SA et al., 2005).

### **Fisiopatologia dell'obesità**

L'obesità è il disturbo metabolico più frequente al mondo, un terzo della popolazione mondiale è considerato in sovrappeso o obeso (Chooi et al., 2019), ed è il principale

fattore di rischio per l'insulino-resistenza. (Boles et al., 2017). L'obesità è l'accumulo cronico ed eccessivo di grasso corporeo (Abranches et al., 2015), è la conseguenza di uno squilibrio cronico tra apporto energetico e dispendio energetico, che culmina con l'eccesso di accumulo di grasso nel tessuto adiposo. Questa patologia può essere causata da fattori genetici o acquisiti ed è causa di un aumentato rischio di morbilità e mortalità. Infatti l'obesità è correlata a diabete mellito, malattie cardiovascolari, tumori (Atilla, 2017). Studi su uomo e animali condotti nei primi anni '90, sostengono l'origine infiammatoria dell'obesità. In questi studi, il tessuto adiposo di roditori obesi e umani mostra modificazioni infiammatorie e una maggiore secrezione di citochine TNF- $\alpha$  pro-infiammatorie in grado di indurre l'insulino-resistenza inattivando l'IRS-1 (Hotamisligil et al., 1993, 1995; Uysal et al., 1998). L'inibizione del TNF- $\alpha$  nei topi obesi migliora la sensibilità all'insulina e il metabolismo del glucosio, ciò supporta la tesi del ruolo chiave del TNF- $\alpha$  (Hotamisligil et al., 1993, 1999). Una graduale perdita di peso fino al 16% del peso corporeo originale è sufficiente per migliorare la funzione delle cellule  $\beta$  e la sensibilità all'insulina nel tessuto adiposo, nel fegato e nei muscoli scheletrici (Magkos et al., 2016).

### ***Tipi di obesità***

L'obesità è classificata mediante indice di massa corporea (IMC) / body mass index (BMI) che viene calcolato come peso corporeo in chilogrammi diviso l'altezza in metri quadrati ( $\text{kg} / \text{m}^2$ ). Altri metodi prendono in considerazione la circonferenza della vita, massa grassa centrale e periferica, ma l'IMC è il metodo di classificazione più utilizzato, il metodo standard accettato a livello internazionale. Secondo IMC, vengono riconosciute cinque differenti categorie (Atilla, 2017):

- 1)  $18,5 - 24,9 \text{ kg} / \text{m}^2 =$  normale
- 2)  $25,0 - 29,9 \text{ kg} / \text{m}^2 =$  sovrappeso
- 3)  $30,0 - 34,9 \text{ kg} / \text{m}^2 =$  obesità di classe 1
- 4)  $35,0 - 39,9 \text{ kg} / \text{m}^2 =$  obesità di classe 2
- 5)  $\geq 40 \text{ kg} / \text{m}^2 =$  obesità di classe 3

L'obesità morbosa è considerata obesità di classe 3 o obesità di classe 2 più significative comorbilità correlate all'obesità (Ashwell et al., 2014).

Negli ultimi 33 anni, 1769 studi hanno evidenziato un sostanziale aumento della prevalenza dell'obesità e quindi un grave problema di salute in tutto il mondo. La percentuale di adulti con un  $IMC \geq 25 \text{ kg / m}^2$  è aumentata tra il 1980 e il 2013 dal 28,8% (intervalli di incertezza del 95% (UI): 28,4-29,3) al 36,9% (36,3-37,4) negli uomini e dal 29,8% (29,3-30,2) al 38,0% (37,5-38,5) nelle donne (Ng et al., 2014). Inoltre, studi basati sulla popolazione in diversi paesi hanno dimostrato che l'obesità continuerà a rappresentare un grave rischio per la salute in futuro.

### ***Resistenza alla leptina e all'insulina nell'obesità***

La leptina agendo sulle cellule  $\beta$ -pancreatiche inibisce la produzione di insulina. Quindi la resistenza alla leptina nelle cellule  $\beta$ -pancreatiche può contribuire alla produzione eccessiva di insulina. Studi scientifici mostrano che modelli murini resistenti alla leptina, come topi ob / ob (deficienza di leptina) e topi db / db (deficienti del recettore per la leptina), hanno riportato iperinsulinemia e quindi insulino-resistenza (Jianping Ye, 2013).

### ***Lipodistrofie ereditarie e acquisite***

L'insulino-resistenza accompagna una serie di disturbi chiamati lipodistrofie, caratterizzati dalla perdita selettiva di tessuto adiposo e altre manifestazioni cliniche. Le lipodistrofie possono essere ereditarie o acquisite (Mlinar et al., 2007). Tuttavia, tutte le forme di lipodistrofia ereditaria sono rare, ad esempio la più diffusa tra queste è la lipodistrofia generalizzata congenita e si verifica in 1 su 10 milioni di persone (Garg A., 2004). La lipodistrofia congenita generalizzata (Berardinelli-Seip) può essere di tipo 1 o di tipo 2, entrambe associate a difetti genetici ed entrambe comportano: mancanza generalizzata di tessuto adiposo sottocutaneo, intraaddominale e intratoracico, maggiore appetito durante l'infanzia, ipertrofia muscolare scheletrica e cardiaca, ipertrigliceridemia che porta poi a pancreatite acuta, acanthosis nigricans.

Quella di tipo 1 è associata a difetti nel gene AGPAT2 (1-acilglicerolo-3-fosfato-O-acil-transferasi 2) che è coinvolto nella sintesi dei trigliceridi negli adipociti (Pfeifer et al., 2005). Quella di tipo 2 è associata a difetti nel gene di seipina (Magre et al., 2001), il ruolo della seipina non è noto, ma è espressa a livello del sistema nervoso centrale (SNC) e ciò indica un possibile difetto nel SNC in questa lipodistrofia. Infatti i pazienti affetti da questa lipodistrofia di tipo 2 presentano ritardo mentale (Mlinar et al., 2007). Un altro tipo di lipodistrofia è quella parziale familiare che può essere di tipo 1 (FPLD1) o tipo Koebberling, di tipo 2 (FPLD2) o tipo Dunningan, di tipo 3 (FPLD3) o PPARG-correlata. La FPLD1 è una forma molto rara di lipodistrofia parziale familiare, l'eziologia non è nota, è stata ipotizzata una trasmissione autosomica dominante, esordisce nell'infanzia ed è caratterizzata da lipoatrofia degli arti e da una distribuzione di tessuto adiposo normale o eccessiva su viso, collo e tronco. Inoltre viene associata a ipertensione arteriosa e diabete. La FPLD2 è caratterizzata da perdita di tessuto adiposo sottocutaneo negli arti, glutei e tronco e da un accumulo progressivo di grasso su collo, viso, zona ascellare e bacino. Alcune pazienti presentano i sintomi della sindrome dell'ovaio policistico (irsutismo, oligomenorrea, ovaie policistiche e infertilità). Questo tipo di lipodistrofia è associato a malattie cardiovascolari precoci, diabete mellito, insulino-resistenza, dislipidemia, steatosi epatica, acanthosis nigricans. Generalmente esordisce alla pubertà, ma può esordire anche nell'infanzia o età adulta, è a trasmissione autosomica dominante ed è dovuta ad una mutazione nel gene LMNA (1q22) che codifica le lamine, filamenti intermedi nucleari di tipo A. Le forme tipiche di FPLD2 sono causate soprattutto da sostituzioni eterozigoti nel codone 482 del gene (mutazione p.R482W/Q o L). La FPLD3 è anch'essa rara, a trasmissione autosomica dominante, esordisce in età adulta ed è correlata al gene PPARG, l'attività del recettore PPAR- $\gamma$  è necessaria per la differenziazione degli adipociti (Garg et al., 2004).

## **Malattie cardiovascolari**

Molti studi dimostrano che l'insulino-resistenza costituisce un importante fattore di rischio per lo sviluppo di patologie cardiovascolari. È stato dimostrato che in soggetti affetti da insulino-resistenza, il rischio di malattia coronarica è tre volte maggiore rispetto ai soggetti che non presentano resistenza all'insulina. È stato calcolato che nella popolazione di giovani adulti negli Stati Uniti, l'insulino-resistenza è stata responsabile di circa il 42% degli infarti del miocardio. (Adeva-Andany et al., 2019). Livelli elevati di LDL, fumo, pressione sanguigna elevata e il diabete di tipo 1 e di tipo 2 sono fattori di rischio ben noti per lo sviluppo di malattie cardio vascolari (CVD), tuttavia, resistenza all'insulina, iperglicemia e l'infiammazione si è dimostrato abbiano una correlazione con queste patologie. Inoltre, l'insulina resistenza è correlata a disturbi come l'ipertrigliceridemia così come livelli bassi di HDL. Inoltre, l'insulina resistenza si è evidenziata in circa il 30% di soggetti con diagnosi di ipertensione. Numerosi studi hanno correlato l'insulino resistenza con le CVD. Nel 1996, ricercatori coinvolti nell'Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS), hanno mostrato una relazione diretta tra l'insulino resistenza e aterosclerosi. In una meta-analisi del 2012 che includeva 65 studi, in cui erano coinvolti 516.325 partecipanti, si è evidenziato che la resistenza all'insulina, valutata secondo l'indice HOMA, è un buon predittore di CVD. Utilizzando il modello di Archimede (uno strumento analitico per migliorare la qualità e l'efficienza dell'assistenza sanitaria) su un gruppo selezionato di giovani adulti non diabetici di età compresa tra 20 e 30 anni, gli autori sono giunti alla conclusione che prevenire l'insulino-resistenza potrebbe evitare circa il 42% degli infarti del miocardio nei partecipanti nella simulazione con un periodo di follow-up di 60 anni. (Ormazabal et al., 2018).

## **Diabete mellito di tipo 2 (T2DM)**

I principali fattori fisiopatologici del diabete mellito di tipo 2 sono: la resistenza all'insulina e la disfunzione delle cellule  $\beta$ -pancreatiche. Il diabete di tipo 2 è un disturbo metabolico molto diffuso, si stima che colpisca l'8,5% della popolazione e il

90-95% dei pazienti diabetici presenta diabete di tipo 2. È noto da tempo che il diabete di tipo 2 progredisce nonostante il trattamento ipoglicemizzante, il 50% delle persone necessita di terapia insulinica entro 10 anni. Il T2DM rappresenta un importante fattore di rischio per le patologie cardiovascolari (CVD). Infatti il tasso di malattie cardiovascolari negli adulti con diabete è da due a tre volte maggiore rispetto agli adulti senza diabete. Inoltre, le malattie cardiovascolari sono la principale causa di morte prematura negli adulti con diabete. DM2 può essere causato da fattori genetici (una persona con un parente di primo grado affetto da diabete di tipo 2, presenta un rischio di sviluppare questa patologia circa 3,5 volte maggiore rispetto ad altri individui che non hanno parenti affetti da DM2) o acquisiti (Mlinar et al., 2007).

### ***Effetto dannoso degli FFA sulle cellule $\beta$***

Gli acidi grassi liberi (FFA) mediante attivazione di varie isoforme di protein chinasi C (PKC) inibiscono la mitogenesi delle cellule  $\beta$ . Gli FFA aumentano la secrezione di insulina stimolata dal glucosio. Ciò avviene mediante due processi, un primo processo porta all'aumento di ATP/ADP mediato da acetil-CoA che chiude i canali del  $k^+$  sensibili all'ATP, aumenta il tempo di apertura dei canali del calcio e l'elevata concentrazione di  $Ca^{2+}$  intracellulare modula le chinasi e altre proteine coinvolte nella via di segnale per la secrezione di insulina. Un secondo processo porta alla sintesi di piruvato a partire dal glucosio, seguita da ossalacetato e citrato che porta alla sintesi di malonil-CoA che stimola la sintesi di CoA a lunga catena (LC-CoA) e lipidi complessi – diacilgliceroli e fosfatidato. Gli FFA sono implicati in questo processo in quanto costituiscono un substrato per la sintesi di LC-CoA. Si presume che lipidi complessi e LC-CoA attivino la PKC o modifichino lo stato di acilazione delle proteine che agiscono sui canali ionici e l'esocitosi dei granuli contenenti insulina. Quindi LC-CoA sembra essere coinvolto nella secrezione di insulina da parte delle cellule  $\beta$  pancreatiche. Studi *in vitro* e *in vivo* dimostrano che l'esposizione a breve termine ad alte concentrazioni plasmatiche di FFA aumenta la secrezione di insulina stimolata da glucosio, mentre l'esposizione a lungo termine ad alte concentrazioni plasmatiche di

FFA aumenta la secrezione di insulina basale e aumenta la secrezione stimolata da glucosio (Mlinar et al., 2007).

### ***Geni di suscettibilità per diabete di tipo 2***

CAPN10 è l'unico gene dimostrato di suscettibilità per il diabete di tipo 2, esso è stato trovato attraverso metodi a scansione larga del genoma. Questo gene codifica per calpain-10 espressa in cellule  $\beta$ . Tra i geni che si occupano della secrezione e dell'azione all'insulina abbiamo il gene PPARG con un altro polimorfismo Pro12Ala e il gene KCNJ11, codificante per le proteine contenute nei canali KATP. Studi interessanti, ma non ancora definitivi, mostrano implicazioni nel DM2 dei geni IRS-1, GLUT2 e PGC1A (co-attivatore di PPAR- $\gamma$ ). Il diabete MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) è una forma monogenica del diabete ed esiste in 6 forme derivanti da 6 geni MODY. Tre di questi, i geni HNF4A, TCF1 (o HNF1A) e GCK codificano per due fattori trascrizionali e glucochinasi nelle cellule  $\beta$  e hanno dimostrato di essere coinvolti nel DM2. Anche il gene dell'insulina con alleli ripetitivi in tandem di classe III in numero variabile è stato associato con DM2 multifattoriale. Inoltre, è stato dimostrato che il gene AGPAT2 alla base della lipodistrofia congenita Berardinelli-Seip e il gene mitocondriale Mt-tRNA Leu (UUR), associato alla sindrome del diabete e della sordità ereditata dalla madre (MIDD), sono coinvolti nel DM2 (Mlinar et al., 2007).

### **Sindrome dell'ovaio policistico (PCOS)**

La sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) è un gruppo eterogeneo di patologie con difetti metabolici ed endocrini che colpisce il 5-10% delle donne in età riproduttiva. I criteri diagnostici per PCOS secondo la Rotterdam European Society of Human Reproduction / American Society for Reproductive Medicine (ESHRE / ASRM) sponsorizzati dal gruppo PCOS Consensus Workshop includono almeno due delle tre caratteristiche cliniche: oligo- o anovulazione, segni di iperandrogenismo e ovaie policistiche all'esame ecografico in assenza di altre possibili eziologie. Il 50-70% delle

pazienti presenta insulino-resistenza, è stato ipotizzato che l'insulino resistenza e la conseguente iperinsulinemia svolgono un ruolo chiave nell'eziologia della PCOS, in quanto farmaci dimagranti e insulino-sensibilizzanti migliorano l'iperandrogenemia e ripristinano l'ovulazione e i livelli di insulina a digiuno sono ben correlati con i livelli di androgeni. In pazienti affetti da PCOS con insulino-resistenza è stata notata una riduzione dell'autofosforilazione del recettore IR negli adipociti del 30% e nessuna nei fibroblasti, aumento del 50% della fosforilazione di Ser nei fibroblasti, minore attività PI3K associata all'IRS-1 nelle cellule muscolari e normale attività nei fibroblasti. Oltre all'insulino-resistenza, altre manifestazioni frequenti nella PCOS, comprendono: obesità, dislipidemia, ipertensione, ridotta tolleranza al glucosio e elevato rapporto ormone luteinizzante / ormone follicolo-stimolante (LH/FSH). Inoltre nelle donne affette da PCOS è stato osservato un aumento del rischio di DM2, di malattie cardiovascolari e di carcinoma dell'endometrio (Mlinar et al., 2007).



## **CAPITOLO 2**

### **Prodotti di origine naturale insulino-sensibilizzanti**

## **Introduzione**

Gli effetti benefici di prodotti di origine vegetale sulla salute umana sono noti da molto tempo. Numerosi studi scientifici dimostrano che un maggiore consumo di frutta e verdura è utile nel prevenire varie patologie (Antonowski et al., 2019).

Composti presenti in natura con importanti proprietà terapeutiche e benefiche per la salute, sono gli antociani. Essi sono composti polifenolici che ritroviamo nella dieta, in quanto sono presenti in frutta e verdura.

Studi *in vitro* dimostrano le loro varie attività biologiche, come l'attività antinfiammatoria, anti-aterosclerotica ed è stata evidenziata un'attività anti-iperlipidemiche. Inoltre, gli antociani normalizzano l'ipertrofia degli adipociti indotta da una dieta ricca di acidi grassi agendo sul gene SREBP-1 nel tessuto adiposo riducendo i livelli di mRNA di SREBP-1 e sintesi di acidi grassi (Kim et al., 2012; Tsuda et al., 2004).

Tra le piante medicinali tradizionalmente utilizzate c'è la *Glycyrrhiza glabra*, utilizzata sin dall'antichità per i suoi effetti benefici, nota per l'utilizzo di radici e stoloni che costituiscono la liquirizia.

La *Glycyrrhiza glabra* è una pianta erbacea perenne appartenente alla famiglia delle Fabaceae, resistente al gelo, ampiamente diffusa nelle steppe orientali e nelle coste dell'Europa meridionale, in terreni sabbiosi, argillosi o calcarei, ma anche in zone umide a ridosso di fiumi. Questa pianta presenta fusti semplici o ramificati che possono oltrepassare il metro d'altezza ed un grosso rizoma (fusto modificato con funzione di riserva), dal quale si dipartono gli stoloni (rami striscianti sul terreno) e le radici con andamento orizzontale al suolo che possono estendersi oltre i due metri di lunghezza. La liquirizia possiede principalmente proprietà espettoranti, antinfiammatorie e antiossidanti.

### **Antocianine come fonti nella dieta**

Frutta e verdura costituiscono la principale fonte di antocianine; In particolare, questi composti li ritroviamo in: bacche rosse (mirtilli, fragole, more ecc..), acini d'uva dalla buccia rossa, mele, pere e verdure color rosso/viola (carote, patate, ravanelli, cavoli). Inoltre, ancora, le antocianine sono presenti anche nei pomodori rossi e nelle barbabietole.

L'assunzione delle antocianine varia in base a cibi e bevande che vengono consumate; è stato stimato che circa il 70% delle antocianine assunte in un giorno, deriva dalla frutta. In Francia, ad esempio, si stima che l'assunzione di antocianine sia intorno a 57 mg al giorno (Perez-Jimenez et al., 2010), in Finlandia circa 47 mg al giorno (Ovaskainen et al., 2008), negli Stati Uniti circa 12,5 mg al giorno. Oltre che da frutta e verdura, le antocianine vengono assunte mediante sotto forma di coloranti naturali (cibi e bevande). Inoltre sono disponibili in commercio, numerosi integratori a base di antocianine sotto forma di polveri, capsule, gel. Un aspetto importante da valutare, quando si acquistano integratori a base di antocianine, è se la loro attività chimica e biologica sia stata mantenuta; Poiché le antocianine sono composti instabili ad alte temperature ed in presenza di luce. Sono stabili in condizioni acide ( $\text{PH} < 3$ ), le polveri acidificate e liofilizzate dovrebbero essere conservate a basse temperature in confezioni adeguate e, preferibilmente, in presenza di un basso livello di ossigeno per avere un massimo periodo di conservazione (Hua et al., 2010).

### **Antocianine ed effetti benefici per la salute**

Gli effetti benefici per la salute delle antocianine sono stati studiati mediante una serie di modelli sperimentali che vanno dagli studi epidemiologici sull'uomo a trial clinici, a studi meccanicistici e di screening su animali e su colture cellulari (Lila, 2004; Seeram, 2008; Burton-Freeman, 2010; Blumberg et al., 2013; Basu et al., 2014; Joseph et al., 2014). Vari studi hanno dimostrato che una dieta ricca in antocianine si è rivelata utile nel prevenire lo sviluppo di problemi cardiovascolari (Mink et al., 2007; McCullough et al., 2012; Cassidy et al., 2013). In particolare, l'assunzione, con la dieta,

delle antocianine è stata inversamente correlata all'ipertensione (Cassidy et al., 2011; Jennings et al., 2014), al diabete mellito di tipo 2 (T2DM) (Wedick et al., 2012), all'insulino-resistenza, e ai marker dell'infiammazione/proteina C reattiva (Jennings et al., 2014). Studi clinici randomizzati (RCTs) mostrano che fonti di antocianine, quali: fragole, mirtilli rossi e more, migliorano i profili lipidici aterogenici diminuendo la quantità di LDL e di colesterolo totale, aumentando il colesterolo-HDL e migliorando le dimensioni delle particelle lipoproteiche (Erlund et al., 2008; Lee et al., 2008; Basu et al., 2010; Basu et al., 2014; Zunino et al., 2012; Novotny et al., 2015).

### **Targets cellulari e molecolari delle antocianine**

Le antocianine, insieme ad altri flavonoidi, hanno ricevuto particolare attenzione nel corso degli anni per la loro attività antiossidante e i possibili effetti benefici per la salute, in quanto lo stress ossidativo ed il conseguente danneggiamento di cellule e tessuti sembra essere alla base del processo di invecchiamento e delle patologie croniche. Tuttavia, bisogna considerare la bassa biodisponibilità dei flavonoidi; In particolare le antocianine hanno una biodisponibilità dell'1-2% (McGhie et al., 2003; Gonzalez-Barrio et al., 2010; Banaszewski et al., 2013). La concentrazione nel plasma sia delle antocianine che dei loro metaboliti coniugati, dopo l'assunzione per via orale, è compresa in un range di pM fino a nM, una concentrazione al di sotto di quella considerata la soglia per l'attività radical scavenger. Di contro, gli antiossidanti come l'acido ascorbico e gli urati, circolano in concentrazioni equivalenti a  $\mu\text{M}$ . Sulla base di queste differenze di concentrazione ed intervalli in cui le antocianine si trovano in circolo, si ipotizzano vari meccanismi a supporto della loro attività. Studi scientifici suggeriscono che i metaboliti delle antocianine possono ridurre l'attivazione di fattori di trascrizione che vengono attivati in cellule del nostro organismo, in condizioni patologiche e di stress. (Forester e Waterhouse, 2010; Forester et al., 2014). Questi fattori di trascrizione sono: il fattore nucleare kappa B (NF- $\kappa$ B), l'attivatore della proteina-1 (AP-1), Il trasduttore del segnale e l'attivatore della trascrizione 1 (STAT-1). NF- $\kappa$ B è un mediatore cruciale delle risposte infiammatorie e, di conseguenza, della

generazione dei ROS (specie reattive dell'ossigeno) nei sistemi cellulari. Gli effetti degli alimenti contenenti antocianine e dei prodotti a base di questi composti sull'infiammazione e sui target infiammatori, sono stati ampiamente descritti (Joseph et al., 2014).

Le antocianine sono in grado di stimolare l'espressione di geni oncosoppressori mediante demetilazione dei promotori della chinasi-ciclina-dipendente (CDK), dell'inibitore della chinasi dipendente dalla ciclina 2A (CDKN2A), delle SFRP2, SFRP5 (secreted frizzled-related proteins) e del fattore 1 di inibizione di wnt (WIF-1) (Wang et al., 2013). Gli inibitori dell'attività di CDK, p21 e p27, sembrano essere sensibili alle antocianine e ad alle antocianidine, molecole che promuovono sia l'arresto del ciclo cellulare che l'apoptosi nelle cellule tumorali.

Altri target molecolari risultati sensibili alle antocianine sono le protein-chinasi, come le chinasi che legano l'ATP, le chinasi regolate da segnali extracellulari (ERK), la proteina chinasi attivata da mitogeni (MAPK), e le c-Jun chinasi N-terminale (JNK). Il trattamento con antocianine ha comportato una riduzione dei segnali cellulari posti a valle e associati al cancro, all'invecchiamento cerebrale, alle patologie croniche come le malattie cardiovascolari, l'infiammazione cronica legata al diabete (Ghosh et al., 2007; Basu et al., 2014; Edirisinghe et al., 2014; Joseph et al., 2014).

A suscitare particolare interesse sono alcune attività metaboliche delle antocianine; I target molecolari sono rappresentati da enzimi [la protein chinasi attivata da AMP (AMPK), la fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K), la protein chinasi B (Akt); Da recettori e trasportatori (recettore dell'insulina, substrato-1 del recettore dell'insulina (IRS-1), la carnitina-palmitoil transferasi 1 (CPT1)]; e da proteine di legame nucleari/fattori di trascrizione (come PPAR) coinvolti nel metabolismo cellulare energetico (Tulio et al., 2012; Park et al. 2015). AMPK è un importante target per gli effetti delle antocianine non mediati dall'insulina, influenzando il metabolismo del glucosio (Tsuda, 2008; Kurimoto et al., 2013).

Inoltre, nelle cellule endoteliali, gli estratti ricchi in antocianine hanno aumentato la fosforilazione della via PI3K/Akt portando ad un aumento dell'attività di eNOS (Xu et

al., 2014; Edirisinghe et al., 2008; Edisinghe et al., 2011), importante per la vasodilatazione (Nakamura et al. 2002; Edirisinghe et al. 2008). La proteina attivante il recettore della trombina (TRAP), ed il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), che hanno un ruolo nella trombosi e nell'angiogenesi, possono rappresentare validi target per le antocianine, riducendo il rischio di aterosclerosi e l'insorgenza del cancro (Rechner et al., 2005; Oak et al., 2006).

Le antocianine, come altri polifenoli, interagiscono con enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci, come la mono-ossigenasi del citocromo P450 (CYP50) e gli enzimi di coniugazione di fase 1 e 2, e presumibilmente con i trasportatori deputati all'escrezione dei farmaci. Pertanto l'interazione delle antocianine con questi target potrebbe comportare una diminuzione della biodisponibilità di alcuni farmaci, causando il fallimento della terapia, oppure potrebbe comportare un aumento della biodisponibilità, aumentando la probabilità di effetti collaterali e di tossicità (Rodriguez-Fragoso et al., 2011).

### ***Glycyrrhiza glabra*, fonte di molecole bioattive**

La *Glycyrrhiza glabra* è stata oggetto di numerosi studi per comprendere quali fossero i costituenti responsabili delle sue proprietà terapeutiche; la maggioranza di questi studi hanno avuto come oggetto le radici. Le radici di *G. glabra* sono costituite dal 25-30% da amidi, dal 3-10% da zuccheri (soprattutto glucosio e saccarosio), dal 3-5% da saponosidi, di cui la glicirrizina è il componente più rilevante sostanza alla quale vengono attribuiti gli effetti terapeutici; quantità minori di altre sostanze sono presenti nella radice: cumarine, triterpenoidi, steroli e flavonoidi, soprattutto flavanoni, calconi, isoflavoni e isoflavonoli. Le percentuali con cui ognuno di questi composti si ritrova nella pianta variano in base a specie, coltivazione e ambiente di crescita (Fenwick et al., 1990; Wang et al., 2007). La glicirrizina, triterpenoide glicoside è costituito da una parte idrofila ed una idrofoba, la quale per idrolisi libera due molecole di acido D-glucuronico (componente idrofila) ed una molecola di acido glicirretico (18- $\beta$ -glicirretico; componente idrofoba).

All'acido glicirretico viene attribuita l'attività antinfiammatoria delle radici di *G. glabra* (Yu-Jin Kwon et al., 2020). È stato dimostrato che i flavonoidi, presenti anch'essi nelle radici di *G. glabra*, anche se come componenti minori, abbiano proprietà antinfiammatoria, antiulcerosa e antispasmodica (Duke JA., 1985; Dehpour 1994). La liquirizia è impiegata sia da sola che insieme ad altre sostanze per il trattamento di malattie epatiche; a riguardo sono stati proposti diversi meccanismi epatoprotettori sia per l'acido glicirrizico che il 18- $\beta$ -glicirretico. Di recente è stato dimostrato un effetto benefico dell'acido glicirrizico anche sull'epatite. La somministrazione endovenosa di quest'ultimo, diminuisce l'alanina transaminasi nel sangue (ALT), la necro-infiammazione e la fibrosi nel fegato (Vichkanova et al., 1978; Kashilov et al., 1975; Obolentseva et al., 1999]. I meccanismi coinvolti nel suo effetto protettivo tendono a diminuire l'attività dell'ALT (alanina aminotrasferasi nota anche con la sigla GPT) e dell'AST (aspartato transaminasi, chiamata anche con l'acronimo GOT). Si pensa che sia l'acido glicirrizico che il 18- $\beta$ -glicirretico possono inibire la fibrosi nel fegato che porterebbe al cancro; Riguardo queste due sostanze sono riportati effetti positivi anche nei confronti di danni cerebrali indotti da ischemia e dalla 6-idrossidopamina (molecola che induce effetti neurotossici poiché va incontro a reazioni di ossido riduzione che portano alla formazione di chinoni e specie reattive dell'ossigeno, incrementando i livelli di stress ossidativo e causando morte cellulare) (Moro et al., 2008).

L'acido glicirrizico sembra essere efficace contro danni chimici, compresi quelli che riguardano il midollo spinale, il miocardio, il fegato e l'intestino (Arjumand et al., 2011; Yokozawa et al., 2000; Haleagrahara et al., 2011; Ogiku et al., 2011; Di Paola et al., 2009). L'acido glicirrizico e L'acido 18- $\beta$ -glicirretico, inoltre, sembrano in grado di inibire le infiammazioni legate a infezioni batteriche e virali; in particolare l'acido glicirrizico si è mostrato efficace nell'inibire la replicazione di 32 virus, tra cui: Coronavirus associati alla grave sindrome respiratoria acuta (SARS), virus da immunodeficienza umana (HIV), virus dell'epatite (A, B, C), virus dell'herpes simplex, citomegalovirus e virus influenzali (H1N1; H5N1) (Fiore et al., 2008). Vari

esperimenti indicano che l'acido glicirrizico potrebbe modulare l'infiammazione inibendo le citochine pro-infiammatorie e la stimolazione delle funzioni immunitarie.

### **Foglie di *G. glabra*, un prodotto rivalutato**

Come detto in precedenza, radici e stoloni di *G. glabra* sono stati sempre oggetto di studio per le loro proprietà benefiche conosciute sin dai tempi antichi, mentre le parti aeree della stessa pianta sono state poco attenzionate. Recentemente, lo studio del contenuto in composti presenti nelle foglie di *Glycyrrhiza glabra* è stato l'obiettivo di differenti lavori. Le foglie di questa pianta hanno mostrato possedere un quantitativo di sostanze biologicamente attive presenti solo in tracce nelle radici, come ad esempio alcuni fenoli caratteristici (glabranina, pinocembrina, licoflavone, wighteone naringenina, lupiwighteone, pinocembrina 7-O-glucoside, astragalina, isoquercitrina, vicenina II) (Fukui et al. 1998; Hayashi 1996), nuovi diidrostilbeni ( $\alpha,\alpha'$ -diidro-3,5,4'-triidrossi-4,5'-diisopentenilstilbene,  $\alpha,\alpha'$ -diidro-3,5,3',4'-tetraidrossi-4,5'-diisopentenilstilbene,  $\alpha,\alpha'$ -diidro-3,5,4'-triidrossy-5'-isopentenilstilbene,  $\alpha,\alpha'$ -diidro-3,5,3'-triidrossi-4'-metossi-5'-isopentenilstilbene e  $\alpha,\alpha'$ -diidro-3,5,3',4'-tetraidrossi-5'-isopentenil stilbene (Biondi et al., 2003; Siracusa et al., 2011) e un ciclitolo, il D-pinitolo (Biondi et al., 2005).

### **Ciclitoli, generalità**

Tra le varie sostanze di origine vegetale, su cui recentemente è stata focalizzata la ricerca scientifica, troviamo i ciclitoli. Essi sono i cicloalcani più comuni nelle cellule eucariote, nella struttura presentano un gruppo idrossile su ciascuno dei tre o più atomi di carbonio dell'anello e per questo sono chiamati anche polioli. Esistono in nove possibili stereoisomeri cinque dei quali sono presenti in natura: myo-, scyllo-, muco-, neo- e D-chiro-inositolo, gli altri quattro derivano dal myo-inositolo e sono: L-chiro-, allo-, epi- e cis-inositolo. I ciclitoli naturali sono coinvolti nelle funzioni cellulari, in quanto, sono implicati nella trasduzione del segnale, nella biogenesi della membrana, nella formazione della parete cellulare, nella fisiologia dei canali ionici, nell'accumulo



di fosfati, nell'osmoregolazione, inoltre hanno attività antiossidante. Nella pianta si formano in risposta a stress salino o idrico. I ciclitoli sono attualmente impiegati in terapia nel trattamento delle sindromi metaboliche, nel diabete mellito gestazionale, nel diabete di tipo 2 (T2DM), nella sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) (Bizzarri et al., 2016). Le loro proprietà terapeutiche e benefiche per la salute sono associate all'attività insulino-simile, antiossidante, antinfiammatoria, antitumorale ed inoltre hanno mostrato migliorare il profilo lipidico diminuendo i trigliceridi sierici e il colesterolo totale questo suggerisce che essi possano avere un effetto protettivo, anche, sul sistema cardiovascolare. Inoltre, presentano una bassa tossicità e per questo sono raccomandati per le donne in gravidanza e nei bambini (Owczarczyk-Saczonek et al., 2018).

### **D-pinitolo**

Un ciclitolo importante, che ha richiamato molto l'attenzione, è il D-pinitolo (3-O-metil-D-chiro-inositolo), un derivato (etere metilico) del D-chiro-inositolo.

Il D-Pinitolo (3-O-metil-D-chiro-inositolo) è presente nelle famiglie delle Leguminose o Fabacee e delle Pinaceae. Svolge un ruolo importante nelle piante come modulatore cellulare fisiologico e difesa chimica contro condizioni ambientali sfavorevoli, come deficit idrico e alto livello di salinità. Le piante ricche in D-pinitolo vengono utilizzate nella medicina tradizionale per il diabete, l'infiammazione, il cancro.

Il D-Pinitolo è stato identificato per la maggior parte nelle piante della famiglia delle Leguminose, circa 106 specie appartenenti a 70 generi. *Glycine max* (soia), *Ceratonia siliqua* (baccelli di carrubo), *Dalbergia paniculata* (foglie), *Sesbania bispinosa* (foglie, fusti e radici), *Trifolium spp.* (parti aeree), *Retama spp.* (cladodi) sono buone fonti di D-pinitolo (Krishnan et al., 2011; Poongothai e Sripathi 2013; González-Mauraza et al., 2016; Pereira Paes Menezes et al., 2016; Lahuta et al., 2018; López-Sánchez et al., 2018; Christou et al., 2019).

Inoltre, il D-pinitolo è stato isolato anche nelle famiglie delle Ginkgoaceae, Cupressaceae, Cycadaceae, Podocarpaceae, Nyctaginaceae, Asteraceae,

Caryophyllaceae, Zygophyllaceae, Aristolochiaceae, Sapindaceae e Aizoaceae (Poongothai et al., 2013; Negishi et al., 2015; Zhang et al., 2019). Industrialmente il D-pinitolo viene estratto soprattutto dai baccelli di carrubo e dalle foglie di soia (Lo'pez-Sa'nchezetal, 2018) mediante estrazione con ultrasuoni (Tetik e Yu'ksel, 2014).

Si pensa che il D-pinitolo svolga un ruolo importante come modulatore fisiologico e difesa chimica delle piante, in quanto la sua sintesi nelle piante cambia durante lo sviluppo dell'embrione.

L'accumulo di D-pinitolo è considerato un meccanismo adattativo per far fronte ai cambiamenti ambientali. Maggiori concentrazioni di D-pinitolo sono state osservate in risposta a condizioni di stress osmotico, come deficit idrico o elevata salinità. Un'ipotesi è che il D-pinitolo sia un osmoprotettore, in grado di mantenere la pressione del turgore a un potenziale idrico inferiore conferendo aggiustamento osmotico (Ahn et al., 2018; Dumschott et al., 2019).

Il D-pinitolo agisce come crioprotettore in caso di stress da freddo (Orthen e Popp, 2000). Inoltre, il D-pinitolo è stato identificato come un ferormone poiché stimola l'ovodeposizione della comune farfalla gialla, *Eurema mandarina*, sulle specie Fabaceae (Mukae et al., 2016); Infine sembra agisca come fungicida contro l'oidio del cetriolo (Erysiphales) (Chen e Dai, 2014) e che abbia una potente attività larvicida nelle piante (Chaubal et al., 2005).

Poiché alcuni derivati dell'inositolo hanno attività insulino-simile e sono efficaci nell'abbassare il glucosio ematico, sono stati effettuati studi sul D-pinitolo e si è dimostrato che quello ottenuto da foglie di *Bougainvillea spectabilis* riduce i livelli di glucosio ematico in ratti con diabete indotto da streptozotocina (STZ) e in soggetti diabetici. Inoltre, il D-pinitolo ha mostrato un'attività insulino-simile, in pazienti affetti da T2DM, il trattamento con D-pinitolo ha migliorato il controllo glicemico, diminuito il livello di adipocitochine e diminuito i parametri metabolici associati al rischio di malattie cardiovascolari. Anche se si ipotizza un effetto insulino simile, tuttavia il meccanismo con cui agisce il D-pinitolo, che spieghi le proprietà anti-iperglicemiche

non è del tutto chiaro. Il D-pinitolo, insieme al mio-inositolo, si ipotizza possa anche migliorare i profili lipidici riducendo i trigliceridi sierici ed il colesterolo totale (Antonowski et al., 2019).

### **Ciclitoli, insulino-resistenza e diabete**

Il diabete mellito rappresenta una delle patologie attualmente più diffuse, colpisce fino a 422 milioni di adulti, nei paesi altamente sviluppati ha una tendenza al rialzo costante a causa dell'epidemia di obesità. Il diabete porta a malattie cardiovascolari, cecità e insufficienza renale. Il diabete e le complicanze ad esso annesse rappresentano la quarta causa di mortalità in tutto il mondo ed essendo, così, anche un grave onere economico per l'assistenza sanitaria, l'impiego di ciclitoli nel trattamento di questa patologia potrebbe avere un risvolto pratico importante. Studi clinici dimostrano gli effetti benefici dei ciclitoli ottenuti da soia, grano saraceno, carrubbo, fico e fagiolo verde. Il D-chiro-inositolo (DCI) e i suoi derivati, quali: D-pinitolo, L-quebrachitolo, pinpollitolo e D-ononitolo, hanno mostrato un effetto simile all'insulina riducendo così la glicemia (Owczarczyk-Saczonek et al., 2018). I ciclitoli inibiscono l'accumulo di grasso nella cellula del tessuto adiposo, favorendo un maggiore ingresso di glucosio nella cellula e quindi riduzione della resistenza all'insulina. Il myo-inositolo (MI) e D-chiro-inositolo inducono la sintesi di glicogeno e il D-chiro-inositolo stimola la secrezione di insulina nel pancreas (Lazarenko et al., 2014). È stato evidenziato che negli animali con diabete di tipo 2 e nell'uomo, sia in pazienti con diabete non insulino-dipendente che con diabete insulino-dipendente, la quantità di DCI escreta nelle urine diminuisce fino anche a 10 volte, invece il MI aumenta. Poiché la conversione fisiologica di myo-inositolo a D-chiro-inositolo è indotta dall'epimerasi, si ipotizza che nel diabete ci sia un difetto secondario dell'epimerasi che altera la conversione fisiologica di MI a DCI stimolata dall'insulina. (Larner et al., 2002). D-pinitolo e MI influenzano l'attivazione del trasportatore del glucosio GLUT-4 che in caso di insulino-resistenza e T2DM è ridotto, compromettendo l'assorbimento del glucosio nella cellula insulino-sensibile. In assenza della fosfatidilinositolo 3- chinasi (PI3K), il

D-pinitolo riduce il glucosio diminuendo la resistenza all'insulina (Bates et al., 2000; Altaf et al., 2015). Invece, il mio-inositolfosfonato (MI-IPG), un derivato del MI, inibendo l'adenilato ciclasi, riduce il rilascio di acidi grassi liberi (FFA) dal tessuto adiposo, responsabili di un aumento della sintesi di trigliceridi e insulino-resistenza. In letteratura sono presenti diversi studi sia sull'animale che sull'uomo che confermano l'utilità dei ciclitoli nel trattamento del diabete. Kawa e collaboratori (2003) hanno valutato l'effetto del concentrato di grano saraceno, contenente DCI e MI, sull'iperglicemia e sulla tolleranza al glucosio in ratti con diabete indotto da streptozocina. Questo concentrato di grano saraceno, 10 e 20 mg di DCI per kg di peso corporeo, ha ridotto il glucosio sierico del 12-19% dopo 90 e 120 min nei ratti. Un altro studio (Fonteles et al., 2000) dimostra che una singola dose pari a 15 mg / Kg di DCI iniettata nella giugulare induce una diminuzione del 21% del glucosio plasmatico in ratti diabetici. Uno studio coreano (Kang et al., 2006) ha mostrato l'effetto benefico del D-pinitolo di soia sulla glicemia postprandiale in pazienti con diabete di tipo 2. I pazienti in esame hanno consumato riso bianco cotto con 1,2 g di D-pinitolo e la glicemia è stata valutata dopo 60, 120 e 180 min. I livelli di glucosio postprandiale erano inferiori dopo l'integrazione con D-pinitolo. Un altro studio coreano condotto da Kim e collaboratori (2005) ha confermato l'effetto benefico di D-pinitolo di soia sul profilo glicemico e sui fattori di rischio cardiovascolare in pazienti con T2DM. Questo studio è stato condotto su un totale di 30 pazienti che ha ricevuto una dose orale di 600 mg di D-pinitolo o placebo due volte al giorno per tre tredici settimane. Nel gruppo trattato con D-pinitolo, la glicemia media a digiuno, il livello di insulina, la fruttosamina, HbA1c e HOMA-IR sono diminuiti in modo significativo. Inoltre il D-pinitolo ha determinato una significativa riduzione del colesterolo totale, del colesterolo LDL e della pressione sanguigna sistolica e diastolica, invece il colesterolo HDL è aumentato. Questi dati suggeriscono che il D-pinitolo di soia può essere utile nel ridurre il rischio cardiovascolare che è una conseguenza del T2DM.

## **Ciclitoli, ipertensione e aterosclerosi**

L'ipertensione causa danni al miocardio, ictus e insufficienza renale. La fisiopatologia dell'ipertensione comprende più fattori, inclusa l'attivazione del sistema nervoso simpatico, del sistema renina – angiotensina – aldosterone e mediatori dell'infiammazione. Si ha un restringimento dei vasi e un'infiammazione che porta infine alla formazione di lesioni aterosclerotiche. Inoltre, come risultato dell'infiammazione, lo stress ossidativo riduce la biodisponibilità dell'ossido nitrico, vasodilatatore naturale, e si ha disfunzione endoteliale (Schulz et al., 2011).

Un estratto vegetale di *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae), contenente flavonoidi e bornesitolo, è stato studiato sul sistema cardiovascolare dei ratti (Silva et al., 2011). È stato osservato che l'estratto etanologico di foglie di questa pianta ha influenzato la vasodilatazione del muscolo mesenterico dei vasi a causa della produzione di ossido nitrico nell'endotelio mediante attivazione di PI3K. L'attività dell'ACE (enzima di conversione dell'angiotensina) nel siero e i livelli di angiotensina II sono stati significativamente ridotti da questo estratto vegetale, rispetto al gruppo di controllo trattato con captopril, un farmaco antipertensivo.

Queste osservazioni sono state confermate da un altro studio degli stessi autori; lo stesso estratto è stato studiato in topi a cui è stato rimosso il rene chirurgicamente e a cui è stata indotta ipertensione mediante somministrazione di desossicorticosterone. Nei vasi mesenterici, la vasodilatazione è stata misurata con un miografo. L'estratto ha abbassato la pressione sanguigna, causato vasodilatazione arteriosa in maniera dose-dipendente, con aumento dei nitriti plasmatici (Silva et al., 2016).

I ciclitoli hanno mostrato effetti antiaterosclerotici. Quando il colesterolo LDL penetra nel sub-endotelio, viene ossidato dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS), formando le LDL ossidasi, lipoproteine a bassa densità (ox-LDL). Queste interagiscono con il recettore LOX-1 presente sulla superficie dei macrofagi, ciò provoca l'internalizzazione delle ox-LDL all'interno dei macrofagi che si trasformano in cellule schiumose, le quali vanno a costituire il *core* della placca aterosclerotica. Il D-pinitolo

inibisce la formazione delle cellule schiumose, limitando così la formazione della placca aterosclerotica (Agnieszka et al., 2018).

### **Ciclitoli e sindrome dell'ovaio policistico (PCOS)**

Numerosi studi scientifici confermano l'effetto benefico dei ciclitoli nel trattamento della PCOS. Essi, oltre all'effetto insulino-sensibilizzante, hanno mostrato un effetto antiandrogenico che si traduce nella regolazione del ciclo mestruale, della fertilità e anche dell'eccessiva crescita di peli su viso, busto e perdita di capelli. Secondo Nestler et al (1999), l'integrazione con 1,2g di DCI per 6-8 settimane in donne affette da PCOS ha migliorato la sensibilità all'insulina, aumentato SHBG (Sex Hormone Binding Globulin – globulina legante gli ormoni sessuali), diminuito i livelli di testosterone e trigliceridi plasmatici, normalizzato la pressione sanguigna sistolica e ha stimolato l'ovulazione. Secondo un altro studio (Gerli et al, 2006) randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo su 283 donne con PCOS, nelle donne trattate con DCI l'incidenza dell'ovulazione è aumentata di due volte, è aumentato anche il colesterolo HDL e la sensibilità all'insulina. In Unfer et al (2016), è stata presentata una meta-analisi relativa all'effetto del myo-inositolo da solo o in combinazione con DCI sul profilo ormonale e sui disturbi metabolici nelle donne con PCOS. Sono stati considerati solo studi randomizzati, inclusi nove articoli (247 pazienti e 249 controlli). Il MI è stato in grado di ridurre l'insulina a digiuno e l'HOMA, riducendo i livelli di testosterone con androstenedione immutato. Inoltre, in studi in cui MI è stato somministrato per almeno 24 settimane, è stato notato un aumento significativo della SHBG sierica. In sintesi, il trattamento con ciclitoli nella PCOS è risultato efficace nel ridurre l'indice di massa corporea, anche senza modificare lo stile di vita. Il DCI aiuta a normalizzare il rapporto LH / FSH. Il myo-inositololo è risultato più efficace nei pazienti obesi con elevati livelli di insulina sierica a digiuno e predisposizione familiare al diabete. Questa terapia non comporta effetti collaterali. L'importanza e l'efficacia dell'integrazione con ciclitoli è stata apprezzata e raccomandata dalla Polish Gynecological Society nel 2014 (Szkodziak et al., 2014). Inoltre, di recente sono state condotte ricerche sul potenziale

utilizzo del MI nel trattamento dell'infertilità maschile. Il MI partecipa a processi che coinvolgono la regolazione della motilità, capacità e risposta degli acrosomi spermatici, probabilmente regolando la concentrazione osmotica (Conadorelli et al., 2017).

Il myo-inositolo potrebbe essere utile per gli uomini con astenozoospermia (ridotta motilità degli spermatozoi).

## **PARTE SPERIMENTALE**



## **Introduzione**

Il termine "sindrome metabolica" (MetS) indica un insieme di fattori di rischio caratterizzati da obesità addominale, dislipidemia, bassi livelli di colesterolo lipoproteico ad alta densità (HDL-c), ipertensione e resistenza all'insulina in grado di aumentare la possibilità di sviluppare malattie cardiovascolari, ictus e diabete di tipo 2. La MetS è una condizione clinica ampiamente diffusa, nota anche come sindrome "X", sindrome da insulino-resistenza, sindrome da obesità o sindrome di Reaven. L'incidenza di comparsa della MetS aumenta con l'aumentare dell'età si stima che in Italia interessi circa il 25-35% della popolazione. Può manifestarsi a qualunque età ma la categoria di persone a maggior rischio è rappresentata dalle persone più anziane, inattive e sovrappeso, con particolare accumulo di grasso in corrispondenza della zona addominale. Nella MetS è presente uno stato infiammatorio diffuso e si può verificare difficoltà nella coagulazione che può comportare un maggiore rischio di incorrere in trombosi e malattie cardiache. Le complicanze derivanti dalla MetS, se non trattate, possono esacerbarsi in meno di 15 anni e i pazienti affetti da MetS, fumatori, hanno una prognosi peggiore.

L'obesità è caratterizzata da un eccessivo accumulo di grasso corporeo. Negli esseri umani ci sono due tipi di tessuto adiposo con diversa distribuzione e funzione: il tessuto adiposo bianco (WAT, white adipose tissue) e il tessuto adiposo bruno (BAT, brown adipose tissue). Il WAT costituisce primariamente un deposito di energia in eccesso, sotto forma di triacilglicerolo (Paniagua et al., 2016), mentre il BAT è coinvolto nella termogenesi e quindi nel dispendio energetico e nella regolazione del peso corporeo (Van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009). Pertanto gli adipociti svolgono un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi lipidica e dell'equilibrio energetico immagazzinando triacilgliceroli o rilasciando acidi grassi liberi (FFA) in base alle richieste energetiche dell'organismo (Czech, 2020). L'aumento di massa corporea può essere dovuto sia all'iperplasia che all'ipertrofia degli adipociti. L'adipogenesi e la lipogenesi sono regolate da vari fattori di trascrizione: il recettore  $\alpha$  X del fegato (LXR), la proteina -  $\alpha$  legante il potenziatore

di CCAAT (C/EBP  $\delta$ ), il recettore -  $\gamma$  attivato dai proliferatori dei perossisomi (PPAR- $\gamma$ ), il fattore 1 di trascrizione legante gli elementi regolatori dello sterolo (SREBP-1c). Tra questi, il PPAR- $\gamma$  è un principale regolatore dell'adipogenesi, responsabile dell'accumulo dei lipidi e presenta importanti attività nel controllo della lipolisi, secrezione di adipochine e sensibilità all'insulina. È stata evidenziata un'aumentata espressione del fattore di necrosi tumorale-alfa (TNF- $\alpha$ ) nel tessuto adiposo di individui obesi. Il TNF- $\alpha$  ha un ruolo cruciale nello stato infiammatorio legato all'obesità (Hotamisligil, Arner, Caro, Atkinson e Spiegelman, 1995). Sia in animali che in soggetti obesi, infatti, è stata osservata un'infiltrazione di macrofagi nel tessuto adiposo che hanno un ruolo cruciale nella produzione di citochine proinfiammatorie, quali: TNF- $\alpha$ , interleuchina-6 (IL-6) e IL-1 $\beta$ , che portano all'attivazione della chinasi IKK $\beta$  che, a sua volta, attiva la via di trasduzione del segnale del fattore nucleare  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) fosforilando le proteine I $\kappa$ B. L'attivazione di I $\kappa$ B consente la traslocazione di NF- $\kappa$ B dal citoplasma al nucleo, dove inizia la trascrizione dei geni bersaglio (Shoelson, Lee, & Goldfine, 2006). Un'infiammazione cronica di basso grado e un'attivazione del sistema immunitario, osservate nell'obesità viscerale, possono avere un ruolo nella patogenesi dei disturbi metabolici correlati all'obesità (Shoelson et al., 2006). Questi disturbi metabolici aumentano il rischio di sviluppo di diabete mellito di tipo 2 (T2DM) e malattie cardiovascolari. Il T2DM è la patologia metabolica più diffusa al mondo ed è caratterizzata principalmente da resistenza all'insulina oltre che da una ridotta secrezione di insulina. La resistenza all'insulina è correlata sia a difetti a carico del recettore insulinico (IR), sia all'alterazione della via post-recettore. Quando l'insulina si lega al proprio recettore, avviene un cambio conformazionale del recettore e autofosforilazione di specifici residui di tirosina sul substrato IRS-1 del recettore insulinico. Ciò innesca una cascata di eventi che porta all'attivazione della via PI3K/Akt che svolge un ruolo cruciale nel mediare l'uptake del glucosio e la soppressione della gluconeogenesi. In uno stato proinfiammatorio associato all'obesità, i meccanismi molecolari coinvolti nella via di segnale dell'insulina vengono alterati. La proteina IRS-1 viene fosforilata sul residuo di serina, ad opera di

specifiche serino-chinasi, determinando una riduzione della sensibilità all'insulina. È stato evidenziato che la soppressione dell'infiammazione dipendente da IKK $\beta$  / NF- $\kappa$ B riduce la resistenza all'insulina e lo sviluppo di T2DM sia negli animali che nell'uomo (B. C. Lee & Lee, 2014; Yuan et al., 2001).

Negli ultimi anni si è assistito ad un crescente interesse verso diverse molecole di origine naturale grazie alla loro bioattività dimostrata sia *in vitro* che *in vivo*. In particolare, nella presente tesi è stato preso in esame un estratto di antocianine (ACN), composti polifenolici naturali presenti in alimenti tipici della dieta mediterranea, quali frutta e verdura per i quali, studi *in vitro* ed *in vivo*, evidenziano importanti proprietà antiossidanti, antinfiammatorie, antiiperglicemiche (He et al., 2010; Ferrari et al., 2016; Tsuda, et al., 2003).

Ancora, la nostra attenzione si è concentrata sulla *Glycyrrhiza glabra*, pianta appartenente alla famiglia delle Fabaceae, nota nella medicina tradizionale per le proprietà terapeutiche di radici e stoloni per il trattamento di disturbi respiratori, iperdipsia, epilessia, febbre, ulcere gastriche, reumatismi, malattie della pelle, malattie emorragiche e ittero (Batiha et al., 2020; Fenwick et al., 1990; Tanaka et al., 2008; Zhang e Ye, 2009); di contro le foglie di questa pianta sono sempre state considerate prodotti di scarto ricevendo scarso interesse. In realtà negli ultimi anni sono stati caratterizzati nelle foglie di *Glycyrrhiza glabra*, vari metaboliti, principalmente polifenoli, in particolare flavonoidi, e sono stati ritrovati nove nuovi diidrostilbeni per i quali si sono dimostrate interessanti attività biologiche come quelle antiossidanti, antinfiammatorie e antigenotossiche (Biondi et al., 2003, 2005, Siracusa et al., 2011, 2018). Inoltre, elevate quantità di D-pinitolo, un ciclitolo, sono state evidenziate nelle foglie di *Glycyrrhiza glabra*, questa sostanza può anche essere ottenuta come molecola pura per semplice precipitazione (Biondi et al., 2005) da estratti di foglie di *Glycyrrhiza glabra*; gli inositoli sono polialcoli ciclici presenti in organismi vegetali e animali, che hanno evidenziato in numerosi studi proprietà insulino-sensibilizzanti attraverso la modulazione del pathway insulinico PI3K/Akt (Cheng et al., 2019). I due principali stereoisomeri dell'inositolo, myo- e il D-chiro-inositolo, giocano un ruolo importante

in malattie frequentemente associate a insulino-resistenza, come la sindrome metabolica, la sindrome dell'ovaio policistico e la preeclampsia (Gateva et al., 2018, Croze e Soulage 2013; Laganà et al., 2018; Scioscia et al., 2015). Il D-pinitolo, la forma 3-O-metilata del D-chiro-inositolo, si è mostrato utile nel trattamento del T2DM migliorando il controllo glicemico e riducendo i parametri metabolici associati al rischio cardiovascolare (Kim et al., 2012) e ha dimostrato prevenire la disfunzione endoteliale legata all'insulino-resistenza (Nascimento et al., 2006).

Le foglie della *Glycyrrhiza glabra*, ricche in D-pinitolo, rappresentano un materiale di scarto della lavorazione della liquirizia, pertanto il loro uso potrebbe rappresentare una fonte conveniente non soltanto di D-pinitolo, ma anche di altri principi attivi polifenolici, anche perché, rispetto alla coltivazione di altre piante, come per esempio il carrubo, la *Glycyrrhiza glabra*, richiede meno tempo e denaro.

## Scopo del lavoro

In base a queste premesse, nel nostro lavoro è stato valutato l'effetto protettivo *in vitro* di un estratto ricco in antocianine (ACN) nei confronti dell'infiammazione ed insulino-resistenza indotta da FFA in adipociti murini 3T3-L1.

In maniera analoga, abbiamo voluto valutare i possibili effetti biologici di un estratto metanolico di foglie di *Glycyrrhiza glabra* (GGLME) ricco in D-pinitolo e flavonoidi (flavanoni, diidrostilbeni, flavoni, flavonoli). In particolare, abbiamo studiato il potenziale effetto protettivo di GGLME nei confronti dell'infiammazione indotta da FFA in adipociti murini 3T3-L1. Inoltre, è stato valutato l'effetto di GGLME nei confronti dell'insulino-resistenza indotta da FFA in cellule endoteliali della vena del cordone ombelicale umano (HUVEC).

## Materiali e Metodi

### Reagenti

Il metanolo per analisi, l'acido cloridrico sono stati acquistati da Carlo Erba (Milano, Italia). Metanolo per cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), etanolo e diclorometano erano di grado ELSD o del grado di purezza più elevato disponibile in commercio; acqua e acetonitrile per HPLC, il persolfato di potassio, sono stati acquistati da VWR International (Milano, Italia). Ossido di deuterio (D<sub>2</sub>O), acido 3-(trimetilsilil) propionico-2,2,3,3-d<sub>4</sub>, sale di sodio (99 atomi % D), dimetilsolfossido sterile hybri-max (DMSO), Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), soluzione tampone fosfato di Dulbecco (DPBS), tripsina-EDTA, buffer HEPES, siero fetale bovino (FBS), siero fetale di vitello (FCS), L-glutammina, soluzione di penicillina/streptomina, desametasone, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), rosiglitazone, cloruro di sodio, reattivo di Bradford, albumina sierica bovina (frazione BSA V), acido palmitico (PA), insulina, Oil-Red-O, ponceau S, tween 20, ditiotreitolo (DTT), idrossido di sodio, SYBR green JumpStart Taq Ready Mix, acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico (trolox); acido linoleico e tutti gli altri

reagenti, se non diversamente specificato, sono stati acquistati da Sigma Aldrich (Milano, Italia). Il grado di purezza degli standard era di circa il 95% (p/p). Il D-pinitolo come standard di riferimento puro è stato ottenuto da Fluka (Milano, Italia). L'acrilammide/bis-acrilammide è stata acquistata da Fisher BioReagents. Le membrane di nitrocellulosa Hybond-P PVDF, latte scremato in polvere e il sistema di rilevamento ECL plus sono stati acquistati da Amersham Biosciences (Milano, Italia). Gli anticorpi primari sono stati tutti acquistati da Santa Cruz Biotechnology. Il kit RNA totale E.Z.N.A. è stato acquistato da OMEGA bio-tek (VWR). Il Quanti-IT RNA è stato acquistato da Invitrogen GIBCO (Milano, Italia).

## **Campioni testati negli esperimenti**

### ***Estratto antocianine (ACN)***

L'estratto ACN (Medox®, Biolink Group AS, Sandnes, Norvegia) è un integratore alimentare disponibile in commercio, costituito da 17 antocianine (tutti glicosidi di cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina) estratte da mirtilli (*Vaccinium myrtillus*) e ribes nero (*Ribes nigrum*). I glicosidi di cianidina e delphinidina formano ~ 40-50% delle antocianine totali (Anwar et al., 2016). Per tutti gli esperimenti, l'estratto ACN è stato solubilizzato in DMSO e utilizzato immediatamente.

### ***Preparazione estratto metanolico di foglie di Glycyrrhiza glabra (GGLME)***

Le piante di *Glycyrrhiza glabra* sono state raccolte sulle rive del fiume Simeto a Catania, Sicilia, Italia, nel maggio del 2016. La pianta fresca (circa 1 kg) è stata pulita manualmente, sono state prese le foglie, le quali sono state essiccate in ambiente privo di umidità, lontano da fonti di calore e da luce solare diretta per 15gg. Il materiale vegetale essiccato è stato triturato mediante un macinatore meccanico e sono stati così ottenuti 570 g di materiale vegetale secco.

Per ottenere l'estratto metanolico GGLME utilizzato nel nostro studio, il materiale vegetale secco è stato sgrassato per tre volte con n-esano. Il residuo è stato estratto tre

volte con acetato di etile quindi è stato ulteriormente estratto per tre volte con n-butanolo, l'ultima estrazione è stata effettuata con metanolo. Le procedure sono state effettuate a temperatura ambiente, al riparo dalla luce diretta. L'estratto metanolico è stato portato a secco mediante rotavapor (Heidolph Laborota 4000) e pesato (28 g); Quindi è stato conservato, ben sigillato, a +4 °C sotto atmosfera inerte. Per le analisi HPLC / DAD e HPLC / ESI-MS, aliquote dell'estratto GGLME sono state preparate di fresco: 5 – 10 mg sono stati ri-solubilizzati in metanolo. Per analisi ELSD, aliquote da 20 a 40 mg sono state poste in provette di vetro, sospesi in quantità appropriate di acqua o ossido di deuterio, sonicati per 5 min, centrifugati a 4000 rpm per 10 min e filtrati mediante filtri in PTFE, diametro 15 mm, dimensione dei pori 0,45 mm (Chemtek Analytica, Milano, Italia).

#### **Analisi HPLC / DAD e HPLC / ESI-MS**

Le analisi cromatografiche sono state eseguite con uno strumento UHPLC Ultimate3000 dotato di una pompa binaria ad alta pressione, un rivelatore a fotodiodi, un comparto colonna termostata e un iniettore di campioni automatizzato (Thermo Fisher Scientific, Inc., Milano, Italia). I dati raccolti sono stati elaborati tramite un Chromeleon Chromatography Information Management System v. 6.80. Le analisi cromatografiche sono state eseguite utilizzando una colonna a fase inversa (Gemini C<sub>18</sub>, 250 x 4.6 mm, dimensione delle particelle 5 µm, Phenomenex Italia srl, Bologna, Italia) dotata di una colonna Guardian<sup>TM</sup> Gemini C<sub>18</sub> 4 x 3.0 mm, con dimensione delle particelle di 5 µm (Phenomenex Italia srl, Bologna, Italia). I componenti dell'estratto metanolico di *G. glabra* sono stati eluiti usando un gradiente di B (2,5% di acido formico in acetonitrile) in A (2,5% di acido formico in acqua): 0 min: 5% B; 10 min: 15% B; 30 min: 25% B; 35 min: 30% B; 50 min: 90% B; 57 minuti quindi mantenuti per altri 7 minuti, 100% B. La velocità di flusso del solvente era di 1 ml/min, la temperatura è stata mantenuta a 25 ° C e il volume dell'iniettore selezionato era 10 µL. La quantificazione è stata effettuata a 280 nm per diidrotilbeni e flavanoni, utilizzando  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -diidro-3,5,4'-triidrossi-5'-isopentenilstilbene e naringenina per costruire le curve

di calibrazione (coefficiente di correlazione  $R_2 = 0,9997$  e  $0,9995$ , rispettivamente); a 330 nm per i derivati della vicenina-2 e dell'apigenina utilizzando una curva di calibrazione con l'apigenina (correlazione  $R_2 = 0,9995$ ), a 350 nm per i derivati della quercetina e del kaempferolo; La rutina (quercetina 3-O-rutinoside) è stata utilizzata come standard esterno in questo caso ( $R_2 = 0,9997$ ). Al fine di identificare in modo univoco i segnali cromatografici e/o per confermare l'assegnazione dei picchi, sono state eseguite anche analisi HPLC/ESI-MS. L'HPLC utilizzato era lo stesso descritto sopra, mentre gli spettri di massa ESI sono stati acquisiti da un Thermo Scientific Exactive Plu Orbitra MS (Thermo Fisher Scientific, Inc., Milano, Italia), utilizzando un'interfaccia di ionizzazione elettrospray riscaldata (HESI II). Gli spettri di massa sono stati registrati operando in modalità di ioni negativi secondo Pannitteri et al. (2017). Le analisi sono state sempre eseguite in triplicato.

#### **Analisi HPLC – ELSD**

Le analisi HPLC sono state eseguite utilizzando un sistema di cromatografia Varian 9010 dotato di un rivelatore Alltech 3300 ELSD e di una workstation PeakSimple v.3.29 per elaborare i dati ottenuti (Alltech Italia s.r.l., Milano, Italia). Una colonna SphereClone NH<sub>2</sub> (250 x 4.60 mm, dimensione delle particelle 5 µm; Phenomenex Italia, Bologna, Italia) è stata utilizzata per la separazione e la quantificazione del D-pinitolo, che è stato eluito utilizzando un programma isocratico del 30% di solvente A (metanolo) in solvente B (diclorometano) per 30 min con una portata di 1 ml/min. Condizioni ELSD: temperatura del tubo di deriva 52 °C, azoto del gas nebulizzatore, flusso di gas 1,5 L/min. Una soluzione acquosa di standard D-pinitolo (tempo di ritenzione: 7.20 min) è stata utilizzata per costruire una curva di calibrazione a sei punti ( $R_2 = 0,9998$ ).



## **Attività antiossidante**

### ***DPPH test***

L'attività scavenger sul radicale DPPH (2,2 difenil-1-picrilidrazil) è stata valutata secondo il metodo impiegato da Siracusa et al (2011). A 1,5 mL di DPPH (100  $\mu$ M) sono stati aggiunti 37,5  $\mu$ L di campione a differenti concentrazioni. Un uguale volume di solvente impiegato per solubilizzare gli estratti è stato aggiunto al controllo. Dopo 20 minuti di incubazione al buio, a temperatura ambiente, l'assorbanza è stata registrata a 517 nm mediante spettrofotometro UV-Vis (Shimadzu, Giappone). Il trolox (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico) è stato usato come controllo positivo ed i risultati sono stati espressi come mM di trolox equivalenti per mg di campione (mM TE/mg). Ogni determinazione è stata effettuata in duplicato e ripetuta almeno tre volte.

### ***TEAC test***

L'attività scavenger sul radicale ABTS<sup>+</sup> è stata valutata secondo il metodo usato da Buenger et al (2006). La miscela di reazione è stata preparata mescolando una soluzione acquosa di ABTS 1,7 mM con una soluzione acquosa di persolfato di potassio 4,3 mM. La miscela è stata incubata per 12 ore al buio, a temperatura ambiente. Successivamente, questa miscela di ABTS<sup>+</sup> blu-verde è stata diluita fino a dare un'assorbanza di 0,7 ( $\pm$  0,02) a 734 nm. 50  $\mu$ L del campione, a differenti concentrazioni, sono stati aggiunti a 1 mL della soluzione di ABTS<sup>+</sup>. Dopo incubazione al buio per 6 minuti, l'assorbanza è stata misurata a 734 nm. I risultati sono stati espressi come mM di trolox equivalenti per mg di estratto (mM TE/mg). Ogni determinazione è stata effettuata in duplicato e ripetuta almeno tre volte.

### ***FRAP test***

La capacità antiossidante del campione in esame è stata valutata anche in base alla sua abilità nel ridurre lo ione ferrico a ferroso ( $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ ) formando, in presenza di TPTZ [2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina], un complesso di colore blu ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) che ha un

assorbimento massimo a 593 nm. La reazione è pH-dipendente (pH 3.6) e l'assorbanza decresce in modo proporzionale alla concentrazione ed all'attività del campione in esame. Il reagente FRAP è stato preparato miscelando buffer acetato (300 mM – pH 3,6) /TPTZ (10 mM) / FeCl<sub>3</sub> • 6H<sub>2</sub>O (20 mM) nella proporzione 10:1:1 v/v/v rispettivamente.

50 µL di campione a differenti concentrazioni sono stati aggiunti a 1 mL di reagente FRAP e incubati a 20 °C per 4 minuti. Il solfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>) è stato usato come standard. L'assorbanza è stata misurata a 593 nm utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis (Shimadzu, Giappone) e i risultati sono stati espressi come mM di FeSO<sub>4</sub> equivalenti per mg campione (mM FeSO<sub>4</sub> Eq/mg estr). Ogni determinazione è stata effettuata in duplicato e ripetuta almeno tre volte.

### ***ORAC test***

Il metodo impiegato in Dávalos e coll. (2004) con alcune modifiche, è stato impiegato per valutare la capacità antiossidante dei campioni in esame, come capacità di scavenging nei confronti del radicale alchilperossido ROO•.

La reazione è stata eseguita in tampone fosfato 75 mM (pH 4). Un'aliquota (200 µL) della soluzione contenente diverse concentrazioni dei campioni in esame e 1,2 mL di soluzione di fluoresceina (70 nM) sono state poste in cuvetta; la miscela è stata preincubata per 15 minuti a 37°C. La soluzione del di 2-2'azobis-2-aminidinopropano (AAPH) cloridrato, generatore di radicali, è stata preparata al momento (12 mM) e 600 µL sono stati aggiunti rapidamente alla miscela.

Mantenendo la soluzione alla temperatura di 37° C, la fluorescenza del campione è stata monitorata per 80 minuti alle lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione, rispettivamente, di 485 nm e di 520 nm.

La soluzione di fluoresceina, AAPH e il solvente usato per solubilizzare il campione è stata usata come bianco di riferimento; il trolox, a diverse concentrazioni, è stato usato come standard. Tutte le miscele di reazione sono state preparate in triplicato e sono state eseguite almeno tre analisi indipendenti per ciascun campione. L'area sotto la

curva (AUC) è stata calcolata per ciascun campione integrando la relativa curva di fluorescenza. L'AUC netta è stata calcolata sottraendo l'AUC del bianco. I valori finali di ORAC sono stati determinati mediante l'equazione di regressione lineare delle concentrazioni di trolox ed espressi come  $\mu\text{M}$  trolox eq per mg di estratto ( $\mu\text{M TE/mg}$ ). I risultati sono espressi come media  $\pm$  DS di tre diversi esperimenti.

### ***Bleaching $\beta$ -carotene***

Il metodo descritto da Dehimi et al (2016), con qualche modifica è stato impiegato per stimare la capacità del campione in esame di inibire lo sbiancamento del  $\beta$ -carotene dovuto alla sua reazione con i radicali che si formano dalla perossidazione dell'acido linoleico (radicali perossilici). Per preparare la miscelata di  $\beta$ -carotene ed acido linoleico, 1 mg di  $\beta$ -carotene è stato solubilizzato in 10 mL di cloroformio (grado HPLC), quindi 5 mL di questa soluzione sono stati aggiunti a 40  $\mu\text{L}$  di acido linoleico e 400  $\mu\text{L}$  di Tween 40. Il cloroformio è stato rimosso mediante rotavapor e dopo sono stati aggiunti lentamente 100 mL di acqua distillata ossigenata al residuo per formare un'emulsione. 8 mL dell'emulsione sono stati aggiunti a 200  $\mu\text{L}$  di campione a differenti concentrazioni; Il butilidrossitoluene (BHT) è stato utilizzato come standard, l'emulsione di  $\beta$ -carotene come controllo positivo e l'emulsione senza  $\beta$ -carotene come controllo negativo. L'assorbanza è stata misurata immediatamente ( $t = 0$  min) a 470 nm e i campioni sono stati posti in bagnetto a 50°C. L'ossidazione dell'emulsione è stata monitorata misurando l'assorbanza a 470 nm dopo un'ora dall'inizio della reazione e dopo 2 ore.

L'attività antiossidante del campione è stata valutata in termini di inibizione dello sbiancamento del  $\beta$ -carotene utilizzando la seguente formula:

$$\text{Bleaching } \beta\text{-carotene (\%)} = ([S - C_{120}] / [C_0 - C_{120}]) * 100$$

dove  $C_0$  e  $C_{120}$  sono i valori di assorbanza del controllo a 0 e 120 min, rispettivamente, ed S è l'assorbanza del campione a 120 min. I risultati sono stati espressi come valori  $\text{IC}_{50}$  (mg/mL) e riportati come media  $\pm$  deviazione standard. Il saggio è stato eseguito in triplicato.

### ***Attività SOD mimetica***

La capacità scavenger sull'anione superossido è stata valutata secondo il metodo descritto da Tomaino et al (2010) con piccole modifiche.

20 µL di ciascuna soluzione dei campioni testati, a diverse concentrazioni, sono stati aggiunti a 1,5 mL della miscela di reazione contenente 500 µL di NADH, 500 µL di NBT e 500 µL di PMS. Tutti i reagenti sono stati preparati in Tris-HCl (16 mM, pH 8). Dopo incubazione per 2 minuti a temperatura ambiente, l'assorbanza è stata misurata a 560 nm. I risultati sono stati espressi come valori IC<sub>50</sub> (mg/mL). Ogni determinazione è stata effettuata in duplicato e ripetuta almeno tre volte.

### ***Inibizione della degradazione dell'albumina sierica bovina (BSA) indotta da HClO***

La capacità dell'estratto di inibire la degradazione dell'albumina indotta dall'ipoclorito è stata valutata mediante metodo elettroforetico. Il campione, costituito da differenti concentrazioni di estratto (0,75; 0,5; 0,25 mg/mL), albumina di siero bovino (BSA; 1,25 mg/mL) e ipoclorito (177 mM) è stato denaturato in sample buffer 4X (tris HCl 260 mM, sodio dodecil solfato 9,2%, glicerolo 40%, blu di bromofenolo 0,04%) e β-mercaptoetanololo e incubato a 37 °C per 15 minuti. Quindi i campioni sono stati posti su gel di acrilammide/bis-acrilammide al 10% e sottoposto a SDS-PAGE. Il trolox a diverse concentrazioni (3, 2,25, 1,5 mM) è stato utilizzato come standard. Successivamente, il gel è stato colorato con Blue di Comassie (30 minuti in agitazione) ed il colorante in eccesso è stato eliminato mediante lavaggi con una soluzione di acido acetico diluito, metanolo e acqua. L'analisi quantitativa è stata eseguita mediante densitometria utilizzando il software ImageJ ed i risultati sono stati espressi come valori IC<sub>50</sub> (mg/mL) e 90% L.C. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

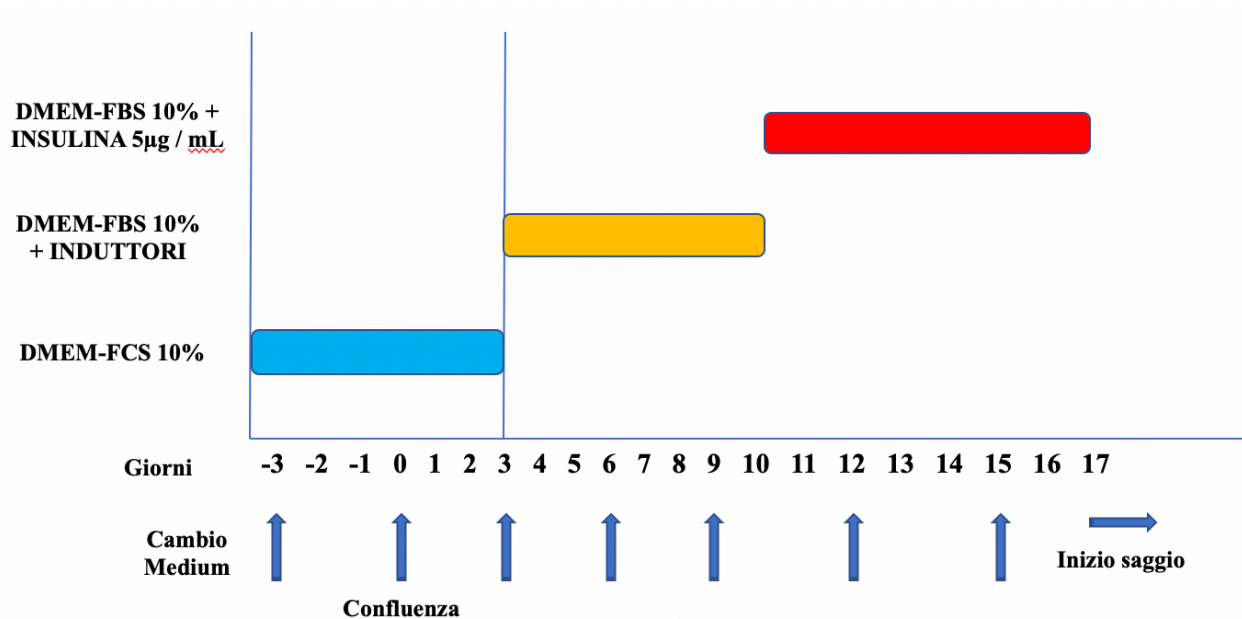
## **Colture cellulari**

### ***Preadipociti murini 3T3-L1***

La linea cellulare di pre-adipociti 3T3-L1 deriva dall'espansione clonale di cellule murine 3T3. Queste cellule presentano una morfologia tipica di fibroblasti e, mediante

l'impegno di agenti stimolanti, sono in grado di differenziarsi in adipociti maturi. Completato il differenziamento, queste cellule, sono in grado di accumulare trigliceridi e costituire così depositi lipidici. Per via della loro capacità di differenziamento, esse costituiscono un ottimo modello *in vitro* per studiare i meccanismi alla base dell'adipogenesi, per valutare la biochimica degli adipociti, e le potenziali applicazioni di diversi composti nel trattamento di alcune patologie come l'obesità. Inoltre, le 3T3-L1, sono semplici da coltivare e poco costose rispetto a linee primarie isolate da tessuto adiposo.

La linea cellulare di pre-adipociti 3T3-L1, acquistata dall'American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), è stata coltivata in DMEM addizionato con FCS al 10%, HEPES buffer 25 mM, L-glutammina 4 mM, penicillina/streptomicina 100 U/mL e mantenuta a 37°C, in atmosfera umidificata con il 5% di CO<sub>2</sub>. Per preparare i monolayer di 3T3-L1, le cellule sono state seminate in piastre multiwell con una densità di semina di  $14 \times 10^4$  cellule per cm<sup>2</sup> e, dopo tre giorni dal raggiungimento della confluenza, sono state incubate per 7 giorni con medium DMEM addizionato con FBS al 10%, HEPES buffer 25 Mm, penicillina/streptomicina 100 U/mL ed L-glutammina 4 mM ed un mix di agenti stimolanti la differenziazione (desametasone 1 µM, IBMX 0,5 mM, rosiglitazone 2 µM, ed insulina 5 µg/mL) (Figura 1). Trascorso il tempo di induzione, le cellule sono state coltivate per i successivi sette giorni, fino a differenziazione completata, in medium DMEM con FBS al 10% ed insulina (5 µg/mL) (Figura 1). In tutti gli esperimenti le cellule sono state utilizzate non oltre il 20° passaggio per mantenere elevata la capacità di differenziamento.



**Figura 1: schema di differenziamento delle cellule 3T3-L1.** Fino a tre giorni post-confluenza, le cellule vengono mantenute in DMEM con FCS, L-glutammina e penicillina/streptomicina. La differenziazione viene avviata incubando i preadipociti in DMEM supplementato con FBS ed il mix di induttori (insulina 5 µM, DEX 1 µM, IBMX 0,5 mM e rosiglitazone 2 µM). Successivamente le cellule sono state mantenute, fino al completo differenziamento, in medium con FBS e insulina 5 µM.

### ***Cellule endoteliali HUVEC***

Le cellule endoteliali della vena del cordone ombelicale umano (Human Umbelical Vein Endothelial Cell-HUVEC) sono state isolate mediante digestione dell'interno della vena ombelicale con collagenasi, come descritto da Speciale et al (2013). Le cellule estratte sono state sedimentate mediante centrifugazione e risospese in medium, addizionato con FBS al 20 %, 1% L-glutammina, 20 mM Hepes, 100 U/mL penicillina/streptomicina, 50 mg/mL di fattore di crescita endoteliale cellulare e 10 µg/mL di eparina. Le cellule sono state seminate in fiasche, pretrattate con gelatina e mantenute a 37°C in atmosfera umidificata al 5% CO<sub>2</sub>. Il medium è stato sostituito ogni due giorni e, per ottenere le subcolture, le cellule sono state staccate mediante tripsina e seminate in una nuova fiasca. Le cellule sono state impiegate tra il secondo e il quarto passaggio.

### **Preparazione del complesso albumina (BSA) – acido palmitico (PA)**

Il PA è il principale acido grasso saturo presente nell'organismo umano ed essendo lipofilo non può circolare liberamente nel sangue, pertanto viene fisiologicamente veicolato con l'albumina. Per tale motivo, nei nostri esperimenti *in vitro*, per permettere l'uptake cellulare, il PA è stato coniugato con albumina sierica bovina (BSA) secondo il metodo descritto da Tripathy e coll. (2003). Brevemente, il PA è stato solubilizzato in etanolo assoluto e successivamente diluito, prima dell'uso, in medium con BSA al 10% senza acidi grassi liberi (FFA-free) a 60 °C per ottenere una soluzione finale di PA pari a 4 mM. La miscela è stata delicatamente agitata per solubilizzare l'acido grasso, il pH è stato aggiustato a 7,4 con NaOH 1N ed infine la soluzione è stata sterilizzata per filtrazione. Il rapporto molare tra acidi grassi e albumina è stato mantenuto < 3 per assicurare che l'acido grasso fosse legato all'albumina.

### **Trattamento cellule 3T3-L1**

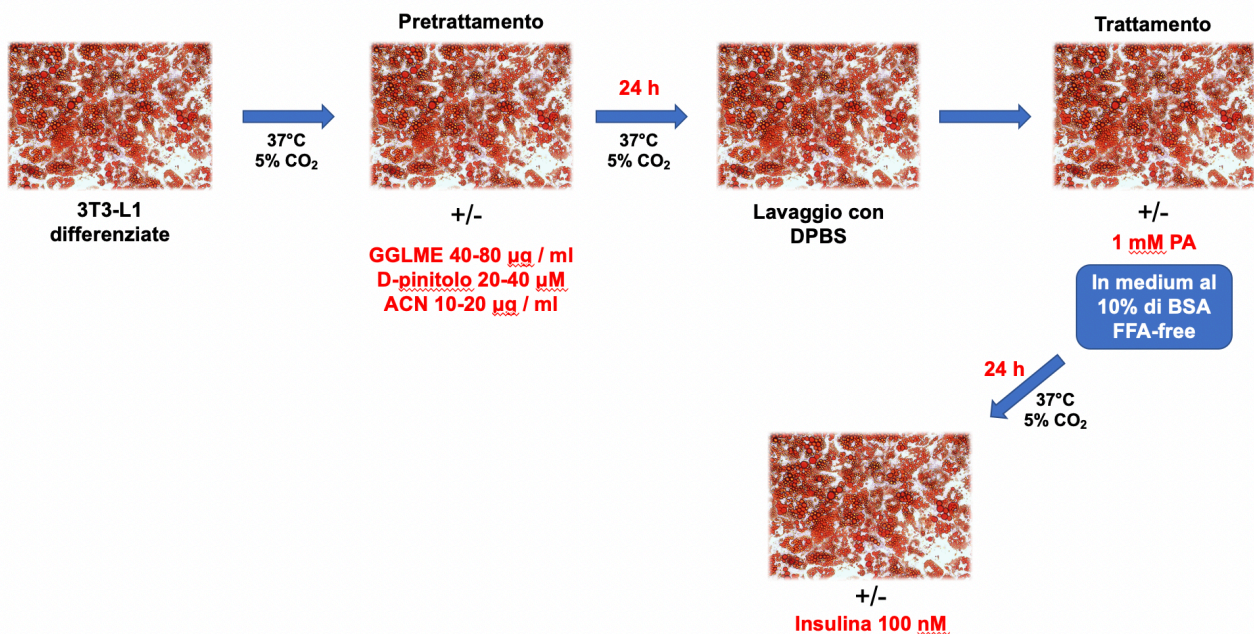
In tutti gli esperimenti, gli adipociti 3T3-L1, completamente differenziati, sono stati pretrattati con diverse concentrazioni dei campioni in esame per 24 ore.

L'estratto ACN è stato testato alle concentrazioni 10 e 20 µg/mL e GGLME alle concentrazioni di 40 e 80 µg/mL. Inoltre, sapendo che 40 µg/mL di GGLME contiene 40 µM (7,8 µg/mL) di D-pinitolo, quest'ultimo è stato testato alle concentrazioni di 20 e 40 µM (rispettivamente 3,9 e 7,8 µg/mL).

L'estratto ACN è stato solubilizzato in DMSO, mentre GGLME e D-pinitolo sono stati solubilizzati in acqua. Tutti i campioni sono stati solubilizzati al momento e immediatamente utilizzati. Per quanto riguarda l'esperimento con l'estratto ACN, la concentrazione finale di DMSO nel mezzo di coltura è stata sempre mantenuta uguale allo 0,1% v/v. Le cellule di controllo sono state trattate con solo DMSO alla concentrazione dello 0,1% (v/v).

Trascorse le 24 ore, le cellule sono state lavate con soluzione salina tamponata con fosfato (DPBS) e in seguito sono state esposte per 24 ore a PA (1 mM in medium al 10% di BSA FFA-free), in modo da mimare una condizione di lipotossicità.

Per lo studio della via di segnale dell'insulina, le cellule sono state stimolate con insulina 100 nM negli ultimi 15 minuti di trattamento con PA con l'obiettivo di valutare gli effetti dei campioni in esame sull'insulino-resistenza (Figura 2).

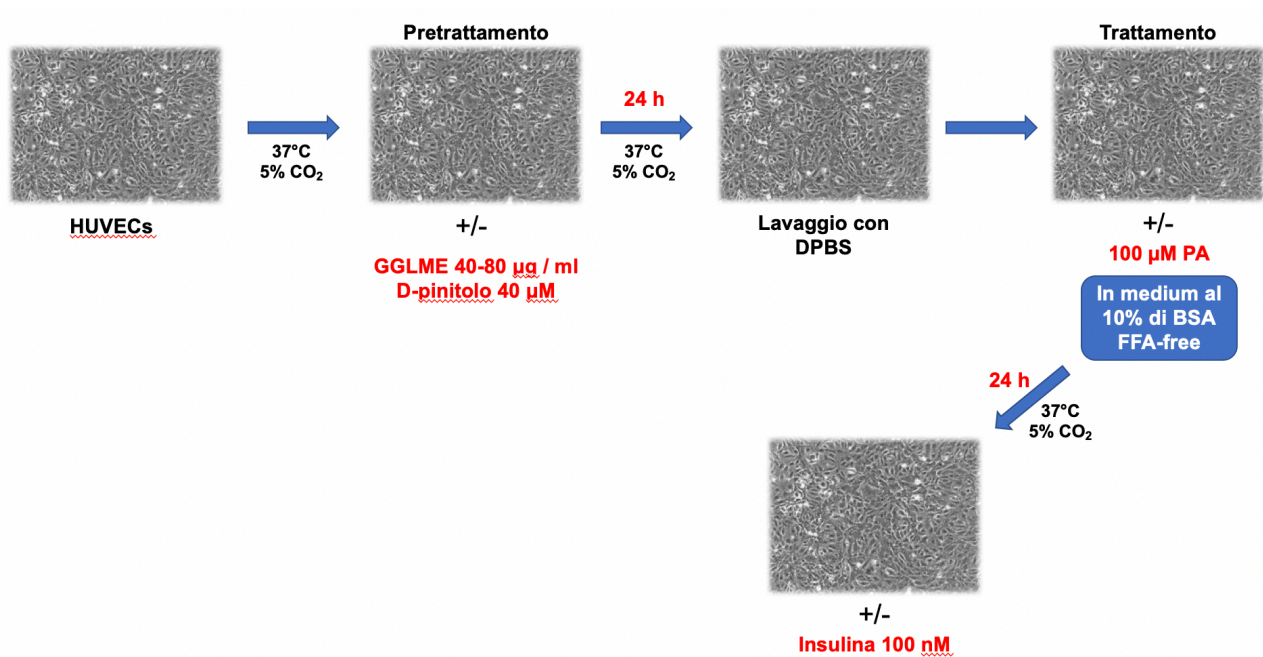


**Figura 2.** Modello sperimentale di induzione dell'ipertrofia in cellule 3T3-L1 e pretrattamenti con i composti in esame.

### Trattamento cellule HUVEC

Per tutti gli esperimenti il GGLME e il D-pinitolo sono stati solubilizzati in acqua e immediatamente utilizzati. Le cellule subconfluenti sono state pretrattate per 24 ore con GGLME (40 e 80 µg/mL) o D-pinitolo (40 µM) mentre le cellule di controllo sono state pretrattate solo con il veicolo (acqua). Trascorse le 24 h, le cellule sono state lavate con DPBS ed in seguito esposte per 3 ore a PA 100 µM in medium contenente il 10% di BSA FFA-free. Dopo questo tempo di esposizione, le HUVEC sono state trattate con insulina 100 nM per 15 min (Figura 3). I controlli senza PA sono stati preparati trattando le cellule con il solo veicolo (soluzione di etanolo / acqua 0,05% v/v rispettivamente) in medium con BSA senza FFA e quindi esposte a insulina.





**Figura 3.** Modello sperimentale di induzione dell'insulino resistenza in cellule HUVEC

### ***Test di citotossicità***

L'effetto citotossico sulle HUVEC è stato valutato mediante il test di esclusione dell'eritrosina B. In breve, 50 µL di sospensione cellulare sono stati diluiti con 50 µL di soluzione di eritrosina B (1 mg/mL in PBS) e caricati in un emocitometro per la conta cellulare. Le cellule danneggiate, al contrario di quelle non danneggiate, vengono colorate dall'eritrosina B a causa dell'aumentata permeabilità della membrana.

### **Analisi istologica dei lipidi intracellulari**

L'accumulo intracellulare di lipidi è stato valutato nelle cellule 3T3-L1 attraverso la colorazione Oil Red O (Zebisch et al., 2012). In breve, il colorante Oil Red O è stato solubilizzato in isopropanolo al 99% (0,3% p/v) e successivamente tre parti di questa soluzione sono state miscelate con due parti di acqua distillata. Le cellule sono state lavate con DPBS e fissate con formalina al 10%. Dopo 1 ora di incubazione, le cellule sono state lavate prima con DPBS e poi con isopropanolo al 60%. I depositi di lipidi sono stati colorati mediante incubazione delle cellule per 5 minuti con la soluzione colorante ed osservazione al microscopio ottico. Sono state selezionate e fotografate 5 aree del pozzetto e la colorazione di ogni sezione è stata quantificata mediante software

ImageJ (Mehlem, Hagberg, Muhl, Eriksson e Falkevall, 2013). I risultati sono stati espressi come variazione rispetto al controllo.

## **Valutazione dell'espressione genica**

### ***Estrazione dell'RNA***

L'RNA è stato estratto usando il Kit I Total RNA E.Z.N.A. (OMEGA bio-tek VWR) seguendo le istruzioni del produttore. Alla fine dell'estrazione, l'RNA è stato solubilizzato in un volume adeguato di acqua priva di nucleasi. Per facilitare la dissoluzione, la soluzione è stata riscaldata a 55 °C per 15 minuti.

### ***Verifica dell'integrità dell'RNA***

Dopo l'estrazione, la concentrazione totale di RNA è stata determinata utilizzando il kit di analisi Quant-iT<sup>TM</sup> RNA con il fluorimetro Qubit<sup>TM</sup> (Invitrogen, Milano). La qualità di RNA è stata valutata verificando l'integrità dell'RNA ribosomiale (28S e 18S rRNA) mediante elettroforesi su gel denaturante di agarosio. Brevemente, l'RNA totale (3µg) è stato diluito in *Loading Buffer 2X* (composto da formammide deionizzata, MOPS, formaldeide, glicerolo, blu di bromofenolo e acqua), in un rapporto 1:1. Il campione è stato riscaldato a 65°C per 10 minuti e poi lasciato raffreddare in ghiaccio per 5 minuti. Il campione è stato corso su un gel di agarosio all'1%, contenente formaldeide 0,66 M a 100 V, per circa 1 ora. Alla fine della corsa, l'RNA è stato visualizzato attraverso un transilluminatore, per evidenziare le bande 28S e 18S rRNA.

### ***Ottenimento del cDNA***

Per ottenere il cDNA, è stata effettuata la trascrizione inversa secondo il protocollo del produttore (Sigma, Codice prodotto M1302).

In provetta RNase e DNase free sono state inserite le seguenti soluzioni:

- 1 µL di dNTP mix 10 mM

- 1  $\mu\text{L}$  di primer Oligo(dT)<sub>23</sub> 70  $\mu\text{M}$
- Templato mRNA (1  $\mu\text{g}$ )
- acqua nuclease-free fino a raggiungimento del volume totale di 10  $\mu\text{L}$

La miscela è stata centrifugata per raccogliere tutte le sostanze sul fondo della provetta. Successivamente, il campione è stato tenuto a 70°C per 10 minuti per denaturare l'RNA, poi è stato raffreddato in ghiaccio e ulteriormente centrifugato.

Dopo sono state addizionate le seguenti soluzioni:

- 2  $\mu\text{L}$  di Buffer della trascrittasi inversa M-MLV 10X
- 1  $\mu\text{L}$  di M-MLV (virus della leucemia murina di Moloney) trascrittasi inversa
- 0,5  $\mu\text{L}$  di RNase Inhibitor (40 U/ $\mu\text{L}$ )
- di acqua nuclease free fino al raggiungimento del volume finale di 20  $\mu\text{L}$

Il campione è stato incubato a 37°C per 50 minuti per attivare l'enzima e sintetizzare il cDNA. Infine, il campione è stato incubato per 10 minuti a 85°C per denaturare la trascrittasi inversa e successivamente è stato centrifugato e congelato a -20°C.

### **PCR Real-Time**

I livelli di mRNA sono stati determinati mediante qPCR Real-Time (Applied Biosystems 7300 Real-Time PGR System, GA, USA) con chimica SYBR green (SYBR green JumpStart Taq Ready Mix-Sigma). La PCR Real-Time consente di misurare in tempo reale (ad ogni ciclo) la quantità di amplificato genico (PCR quantitativa - qPCR). È possibile effettuare la quantificazione dell'amplificato in tempo reale grazie ad un composto organico aromatico, il SYBR Green, che viene utilizzato per colorare gli acidi nucleici. Il SYBR Green si lega in maniera aspecifica al DNA a doppio filamento (dsDNA) emettendo una fluorescenza 10.000 volte di più rispetto a quando non è legato. Pertanto la fluorescenza emessa dal SYBR Green sarà

proporzionale alla quantità di dsDNA presente e aumenterà con l'amplificazione del gene bersaglio. Ogni campione di cDNA (1µl) viene sottoposto ad amplificazione, mediante l'utilizzo di coppie di primer altamente specifiche per i singoli geni (Tabella 1). Un campione controllo (NTC-No Template Control), contenente tutti i reattivi eccetto il cDNA, è stato utilizzato per poter verificare l'eventuale contaminazione dei reattivi. Tutte le reazioni di PCR Real-Time, sono state eseguite in triplicato, e normalizzate col colorante ROX. Questo colorante non interferisce con la PCR e una sua concentrazione costante nella piastra fornisce un segnale di fluorescenza proporzionale al volume di reagente aggiunto nei pozzetti. Per tale motivo, il ROX viene utilizzato come reference dye per eliminare eventuali errori di pipettaggio.

La miscela di reazione contiene:

- 12,5 µL SYBER Green JumpStart Taq ReadyMix
- ROX 1X
- Forward Primer 0,2 µM
- Reverse Primer 0,2 µM
- 1 µL di campione di cDNA ottenuto mediante retrotrascrizione

La miscela è stata vortexata e centrifugata per raccogliere i vari componenti sul fondo della provetta.

|             | Primer         | Amplicon Length                         | Amplicon T <sub>m</sub> | Reference |                              |
|-------------|----------------|---|-------------------------|-----------|------------------------------|
| <b>IL-6</b> | <b>Forward</b> | 5'-GAT GGA TGC TAC<br>CAA ACT GGAT-3'   | <b>85 bp</b>            | 57 °C     | Tsujimura<br>et al., 2011    |
|             | <b>Reverse</b> | 5'-CCA GGT AGC TAT<br>GGT ACT CCA GA-3' |                         |           |                              |
| <b>18S</b>  | <b>Forward</b> | 5'-GTA ACC CGT TGA<br>ACC CCA TT-3'     | <b>151 bp</b>           | 55 °C     | Lood <i>et al.</i> ,<br>2016 |
|             | <b>Reverse</b> | 5'-CCA TCC AAT CGG<br>TAG TAG CG-3'     |                         |           |                              |

**Tabella 1.** Sequenze di primer utilizzati per l'analisi PCR.

### *Espressione genica*

Per l'amplificazione, sono stati effettuati 40 cicli comprendenti le seguenti fasi:

- I. Denaturazione della doppia elica del DNA in due singole eliche: 94 °C per 15 secondi
- II. Fase di annealing e estensione: 60 °C per 60 secondi

Prima di effettuare i 40 cicli, è necessario effettuare un riscaldamento a 94 °C per 2 minuti, in modo da attivare l'enzima TAQ polimerasi. Al termine dei cicli di amplificazione, si effettua una fase di dissociazione, al fine di valutare la presenza di altri prodotti amplificati aspecifici e per determinare la temperatura di melting (T<sub>m</sub>) del prodotto amplificato di interesse. La T<sub>m</sub> è stata confrontata con quella ottenuta mediante l'utilizzo del programma DNA Star (Madison, USA). Questa temperatura di melting è specifica per ogni prodotto amplificato, e corrisponde alla temperatura in cui il DNA subisce una denaturazione pari al 50%, questo valore dipende dal contenuto di basi G e C presenti.

### **Elaborazione post-analisi**

Al termine dell'analisi, i dati sono stati elaborati mediante l'utilizzo del software SDS 1.3.1 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) ed espressi come threshold cycle (Ct), valore che indica il numero di cicli necessari in cui la fluorescenza rilevata supera

la linea soglia (threshold). Il relativo Ct per ogni campione, è inversamente proporzionale alla quantità di cDNA stampo contenuta nel campione iniziale: infatti minore è la quantità di materiale iniziale, più cicli saranno necessari affinché si raggiunga il valore soglia. Dopo aver ottenuto i valori di Ct per ciascun gene bersaglio e per il gene di riferimento (rRNA 18S) ne è stata calcolata la differenza ( $\Delta$ Ct).

L'efficienza dei primer per i geni analizzati corrispondeva a quella dei primer per il 18S (gene di riferimento). Questo gene di riferimento, ha lo scopo di normalizzare il valore di Ct per la quantità di RNA aggiunto nelle reazioni di DNA polimerasi. I valori di  $\Delta$ Ct sono stati quindi elaborati in unità di incremento rispetto al controllo utilizzando il metodo  $2^{-\Delta\Delta$ Ct (Livak and Schmittgen, 2001).

## **Analisi Western Blot**

### ***Estrazione delle proteine nucleari e citoplasmatiche***

Al termine dei trattamenti, le cellule sono state lavate con DPBS e staccate con tripsina-EDTA. Dopo queste operazioni, è stata aggiunta la stessa quantità di medium (750  $\mu$ l) per inattivare la tripsina e le cellule sono state raccolte in provetta e centrifugate a 15000 rpm per 5 minuti a 4° C. Il surnatante è stato rimosso ed il pellet è stato risospeso in 400  $\mu$ l di buffer ipotonico (BUFFER A), incubato in ghiaccio per 15 minuti e trattato con Igepal allo 0.6 %, il campione è stato vortexato per 15 secondi e mantenuto in ghiaccio per 3 minuti. Successivamente è stato centrifugato a 13000 rpm per 1 minuto a 4°C. Il surnatante, contenente la frazione citoplasmatica, è stato raccolto, mentre il pellet, contenente i nuclei, è stato lisato in 50  $\mu$ l di buffer ipertonico (BUFFER B) (Tabella 2). Il lisato è stato sottoposto a centrifugazione a 14000 rpm per 15 minuti a 4°C, e il surnatante, contenente la frazione nucleare, è stata raccolta. Le frazioni proteiche nucleari e citoplasmatiche sono state conservate a -20°C fino al momento dell'uso. La concentrazione delle proteine nei lisati è stata determinata mediante il reagente Bradford.

| COMPOSIZIONE BUFFER A:   | INIBITORI          | COMPOSIZIONE BUFFER B  | INIBITORI          |
|--------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
| HEPES 10 mM pH 7.9       | DTT 1 mM           | HEPES 20 mM pH 7.9     | DTT 1 mM           |
| KCl 10 mM                | APROTININA 2 µg    | NaCl 400 mM            | APROTININA 2 µg    |
| MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM | BENZAMIDINA 1 mM   | MgCl <sub>2</sub> 1 mM | BENZAMIDINA 1 mM   |
| GLICEROLO 5%             | LEUPEPTINA 1 µg/ml | EGTA 0,1 mM pH= 8      | LEUPEPTINA 1 µg/ml |
| H <sub>2</sub> O         | NaF 5 mM           | EDTA 0,1 mM pH= 8      | NaF 5 mM           |
|                          |                    | GLICEROLO 10%          |                    |
|                          |                    | H <sub>2</sub> O       |                    |

**Tabella 2.** Composizione dei buffer utilizzati per l'estrazione delle proteine nucleari e citoplasmatiche.

### ***Proteine totali***

Al termine dei trattamenti, le cellule sono state lavate con DPBS, raccolte con uno scraper e lisate con 50 µL di lysis buffer. Dopo 30 secondi di sonicazione, le proteine totali estratte sono state frantumate con un ago sottile e conservate a -20 °C. Prima di quantificare il contenuto proteico, i campioni sono stati centrifugati a 14000 rpm a 4 °C per 10 minuti. Le proteine ottenute sono state conservate a -80 °C fino al momento dell'uso. La concentrazione proteica nei lisati è stata determinata utilizzando il reagente Bradford.

### ***Determinazione del contenuto di proteine***

Il contenuto proteico è stato quantificato mediante il dosaggio colorimetrico di Bradford (Bradford, 1976) utilizzando come standard l'albumina sierica bovina. Il saggio di Bradford sfrutta il cambiamento del picco di assorbimento del colorante Coomassie Brilliant Blue quando si lega all'arginina e ai residui di aminoacidi idrofobici presenti nelle proteine. Il colorante legato in forma anionica è blu, e ha assorbanza massima a 595 nm. Nella sua forma cationica, il colorante non legato è verde e rosso. In breve, dopo aver aggiunto il colorante ai campioni si aspettano 5

minuti e poi si legge l'assorbanza a 595 nm. L'aumento dell'assorbanza è proporzionale alla quantità di colorante legata alle proteine. Tutte le analisi sono state eseguite in triplicato.

### ***Immunoblotting***

Per l'analisi di immunoblotting, 20 µg di lisato cellulare per campione sono stati denaturati in SDS-PAGE 4× sample buffer (costituito da Tris-HCl 260 mM, pH 8.0, SDS 9.2% (w/v), glicerolo 40% (v/v), blu di bromofenolo 0.04% e β-mercaptoethanol come agente riducente) e riscaldati a 95°C per 5 min. Dopo denaturazione, le proteine sono state separate mediante SDS-PAGE su gel di acrilammide/bisacrilammide al 10% e trasferite su membrana di nitrocellulosa (Hybond-P PVDF, Amersham Bioscience); Per verificare l'avvenuto trasferimento, la membrana è stata colorata con Ponceau S (0,1% w/v di Ponceau S in acido acetico al 5%). Dopo decolorazione della membrana, tramite lavaggi con TBST (Tris 10 mM, NaCl 100 mM e Tween 20 allo 0,01%), i siti di legame residui sulla membrana sono stati bloccati con latte senza grassi al 5% in TBST, overnight a 4°C. Le membrane sono state quindi trattate con specifici anticorpi primari overnight a 4°C: anticorpo monoclonale di coniglio anti pAkt ser473 (Cell Signaling Technology) (1:1000), anticorpo monoclonale di coniglio anti PI3K (Cell Signaling Technology) (1:1000), anticorpo monoclonale murino anti-β-actina (Cell Signaling Technology) (1:6000), anticorpo monoclonale murino anti-Lamin-B (Cell Signaling Technology) (1:1500), anticorpo monoclonale di coniglio anti-GLUT-1 (Cell Signaling Technology) (1:1000), anticorpo monoclonale di coniglio anti-NF-kB p65 (Santa Cruz Biotechnology) (1:1000), anticorpo monoclonale di coniglio anti-fosfo-IKK α/β (Cell Signaling Technology) (1:1000), anticorpo monoclonale di coniglio anti-eNOS (Cell Signaling Technology) (1:1000).

Successivamente, la membrana è stata lavata con TBST e incubata per 2 ore a temperatura ambiente con un anticorpo secondario con attività perossidasi (HRP): goat anti-rabbit Ig coniugato con HRP (Cell Signaling Technology) (1:6000), Goat anti-mouse IgM, coniugato HRP (Cell Signaling Technology) (1:6000) e visualizzato



con un sistema di rilevamento in chemiluminescenza ECL plus (Amersham Biosciences) impressionando delle lastre fotosensibili. L'analisi quantitativa è stata eseguita mediante densitometria. Il caricamento equivalente di proteine in ciascun pozzetto è stato confermato con colorazione di Ponceau e con la proteina housekeeping beta-actina o lamin-B.

### **Analisi statistica**

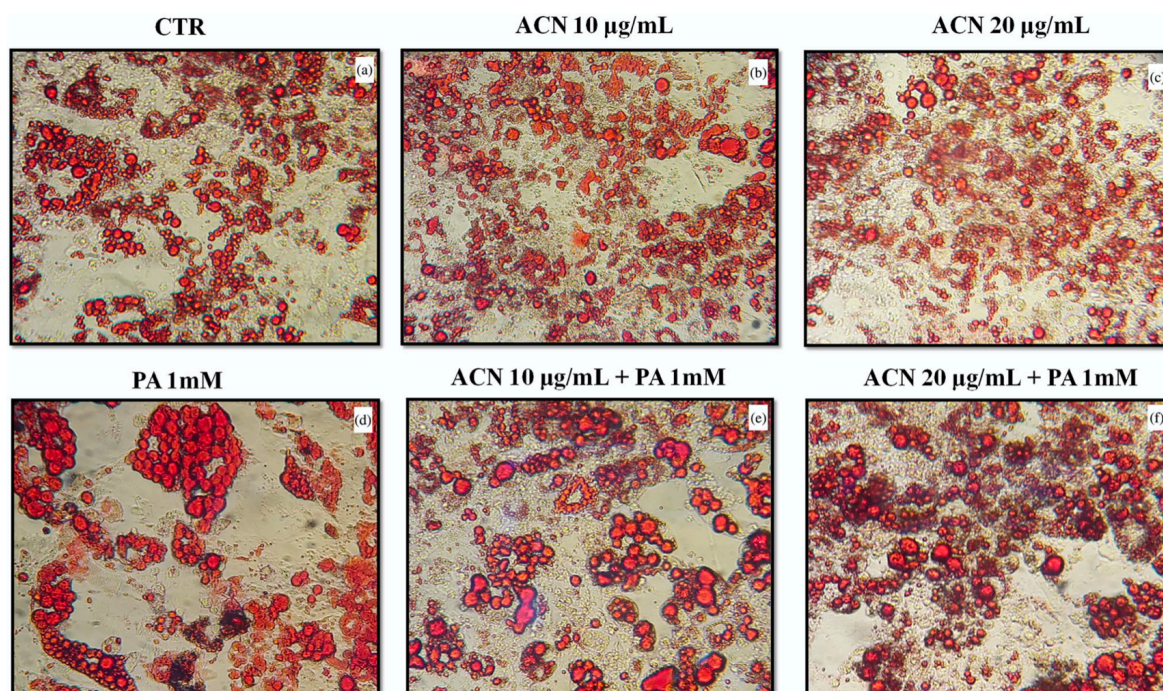
Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato e ripetuti almeno tre volte. I risultati sono espressi come media  $\pm$  SD di tre esperimenti e analizzati statisticamente da un test ANOVA a una via, seguito da HSD di Tukey, utilizzando il software statistico ezANOVA (<http://www.sph.sc.edu/comd/rorden/ezanova/home.html>). Le differenze nei gruppi e nei trattamenti sono state considerate significative per  $p < 0.05$ .

## RISULTATI

### Studio dell'effetto protettivo delle antocianine in adipociti ipertrofici

#### *Effetto protettivo dell'estratto di antocianine (ACN) nell'ipertrofia indotta da PA*

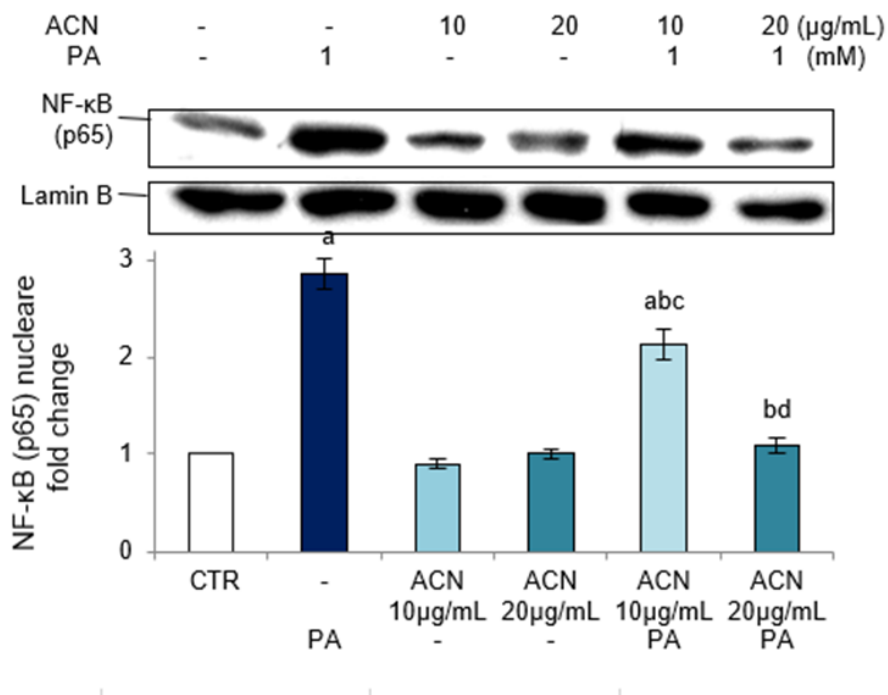
L'ipertrofia negli adipociti 3T3-L1 è stata indotta mediante esposizione ad alte concentrazioni di acido palmitico, per 24 ore. Per valutare l'effetto dell'estratto ACN sull'accumulo di lipidi indotto da PA è stata utilizzata la tecnica della colorazione istologica Oil Red O (Zebisch et al., 2012). I dati ottenuti hanno dimostrato che l'esposizione ad alte concentrazioni di PA induceva ipertrofia negli adipociti con un aumento dell'accumulo lipidico di  $1,38 \pm 0,17$  volte rispetto alle cellule controllo ( $p < .05$ ). Al contrario, il pretrattamento delle cellule con l'estratto ACN (Figura 4), alle diverse concentrazioni testate (10-20  $\mu\text{g/mL}$ ), ha portato ad una riduzione dose-dipendente sia del numero che delle dimensioni dei depositi di lipidi.



**Figura 4.** *Effetto dell'estratto ACN sui depositi di lipidi.* Colorazione Oil Red O: gli adipociti 3T3 - L1 completamente differenziati sono stati pretrattati per 24 ore con estratto ACN (10 e 20  $\mu\text{g/mL}$ ) ed esposti per 24 ore a PA 1 mM. Le cellule trattate con il solo veicolo sono state utilizzate come controllo (CTR). Le immagini sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti e sono state ottenute utilizzando un microscopio ottico (ingrandimento originale a  $\times 40$ ). (Muscarà et al., 2019).

### ***Effetto inibitorio dell'estratto ACN sull'attivazione di NF-κB indotta da PA***

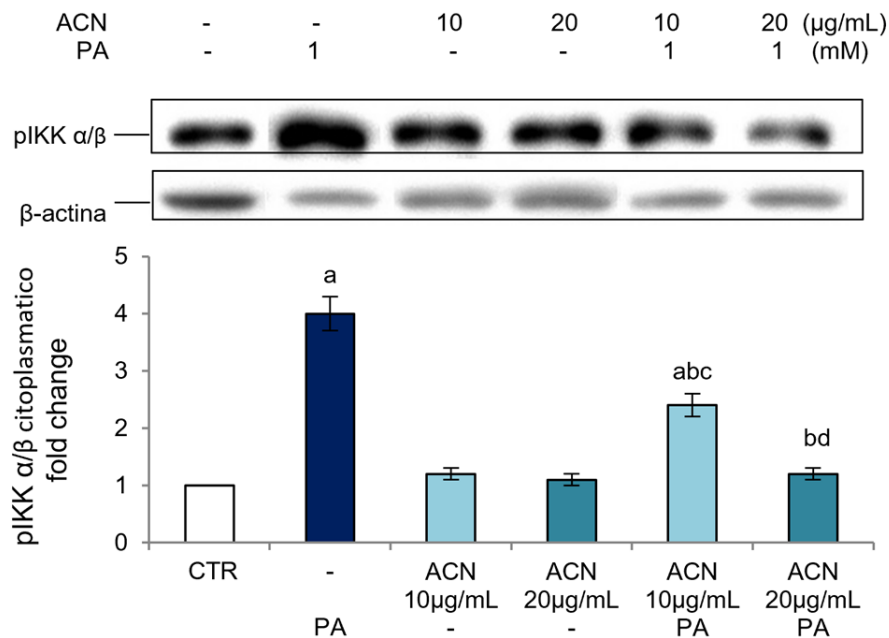
NF-κB è il principale fattore trascrizionale coinvolto nei processi infiammatori (Hayden e Ghosh, 2014) e la forma più comune di NF-κB è l'eterodimero p65/p50. La subunità p65 è responsabile dell'attivazione trascrizionale dei geni proinfiammatori. NF-κB risiede nel citoplasma come complesso inattivo legato alle proteine inibitrici IκB. IKK gioca un ruolo importante nell'attivazione di NF-κB mediante la fosforilazione di IκB e l'attivazione di questo fattore trascrizionale. NF-κB attivo trasloca nel nucleo e modula la trascrizione dei geni proinfiammatori. Quindi, per comprendere l'effetto dell'estratto ACN sull'infiammazione degli adipociti, è stata studiata la via di segnale di NF-κB. I risultati dimostrano che l'esposizione a PA ha indotto l'attivazione di NF-κB, come mostrato dall'aumento dei livelli nucleari di p65 (Figura 5), mentre il pretrattamento con l'estratto ACN ha impedito in modo significativo e dose-dipendente, la traslocazione nucleare di p65. Nelle cellule non esposte a PA, il pretrattamento dell'estratto ACN non ha avuto effetti sui livelli nucleari di p65.



**Figura 5.** Effetto dell'estratto ACN sui livelli nucleari di NF-κB (p65). Gli adipociti 3T3-L1 sono

stati pretrattati con estratto ACN (10 e 20 µg/mL) per 24 ore e successivamente esposti a 1 mM PA per 24 ore. Le cellule trattate con il solo veicolo sono state utilizzate come controllo (CTR). I livelli nucleari di NF-κB sono stati determinati mediante western blot. I risultati ottenuti dalla densitometria sono riportati come variazione rispetto al CTR ed espressi come media ± DS di tre esperimenti indipendenti. I livelli di NF-κB (p65) sono stati normalizzati ai corrispondenti valori di Lamin-B. <sup>a</sup>p < 0.05 vs. CTR; <sup>b</sup>p < 0.05 vs. PA; <sup>c</sup>p < 0.05 vs. ACN 10 µg/mL; <sup>d</sup>p < 0.05 vs. ACN 20 µg/mL; (mod. da Muscarà et al., 2019).

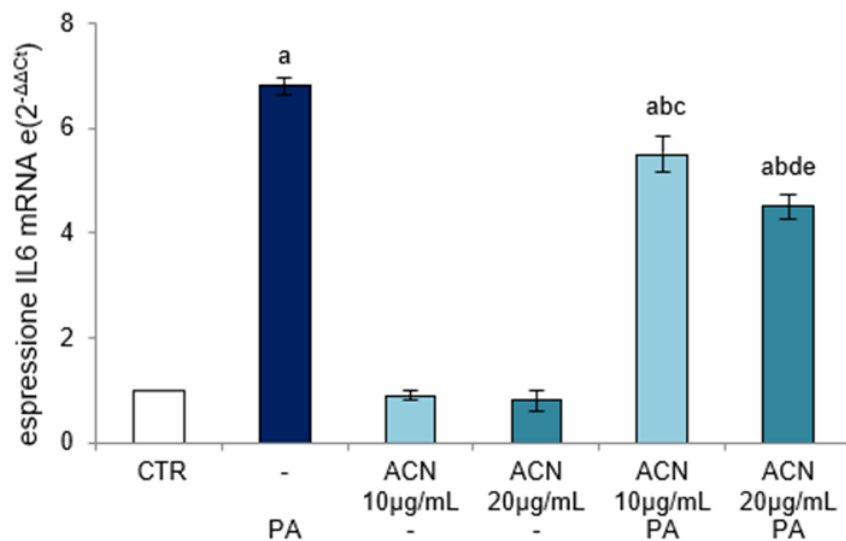
Per determinare se l'effetto protettivo dell'estratto ACN sul pathway di NF-κB fosse correlato all'inibizione di IKK, sono stati esaminati i livelli citoplasmatici di IKK fosforilata (cioè attivata). L'esposizione delle 3T3-L1 a PA ha aumentato la fosforilazione IKK, il principale attivatore di NF-κB, mentre il pretrattamento con l'estratto ACN è stato in grado di ridurre l'attivazione di IKK indotta dal PA, raggiungendo valori simili al controllo (Figura 6). Questi dati confermano il ruolo di IKK sull'attivazione di NF-κB e chiariscono anche il meccanismo con cui l'estratto ACN è in grado di inibire il pathway di NF-κB indotto da PA.



**Figura 6.** Effetto dell'estratto ACN sulla fosforilazione di IKK indotta da PA. Gli adipociti 3T3-L1 sono stati pretrattati con l'estratto ACN (10 e 20 µg/mL) per 24 ore e successivamente esposti a PA 1 mM per 24 ore. Le cellule trattate con il solo veicolo sono state utilizzate come controllo (CTR). I

livelli citoplasmatici di IKK fosforilata sono stati analizzati mediante western blot. I risultati della densitometria sono riportati come variazione rispetto al CTR ed espressi come media  $\pm$  DS di tre esperimenti indipendenti. I valori di intensità di p-IKK sono stati normalizzati ai corrispondenti valori di  $\beta$ -actina (b). <sup>a</sup>p < 0.05 vs. CTR; <sup>b</sup>p < 0.05 vs. PA; <sup>c</sup>p < 0.05 vs. ACN 10  $\mu$ g/mL; <sup>d</sup>p < 0.05 vs. ACN 20  $\mu$ g/mL. (mod. da Muscarà et al., 2019).

Inoltre, l'attività trascrizionale di NF- $\kappa$ B, è stata studiata valutando l'espressione genica di IL-6 tramite real time-PCR. Gli adipociti esposti a PA hanno mostrato una sovraespressione di IL-6 rispetto al controllo, mentre i valori di IL-6 sono diminuiti nelle cellule pretrattate con estratto ACN. Il pretrattamento con il solo estratto ACN non ha influenzato l'espressione genica di IL-6. Pertanto, i dati ottenuti dimostrano l'effetto protettivo dell'estratto ACN attraverso l'inibizione della via proinfiammatoria di NF- $\kappa$ B (Figura 7).



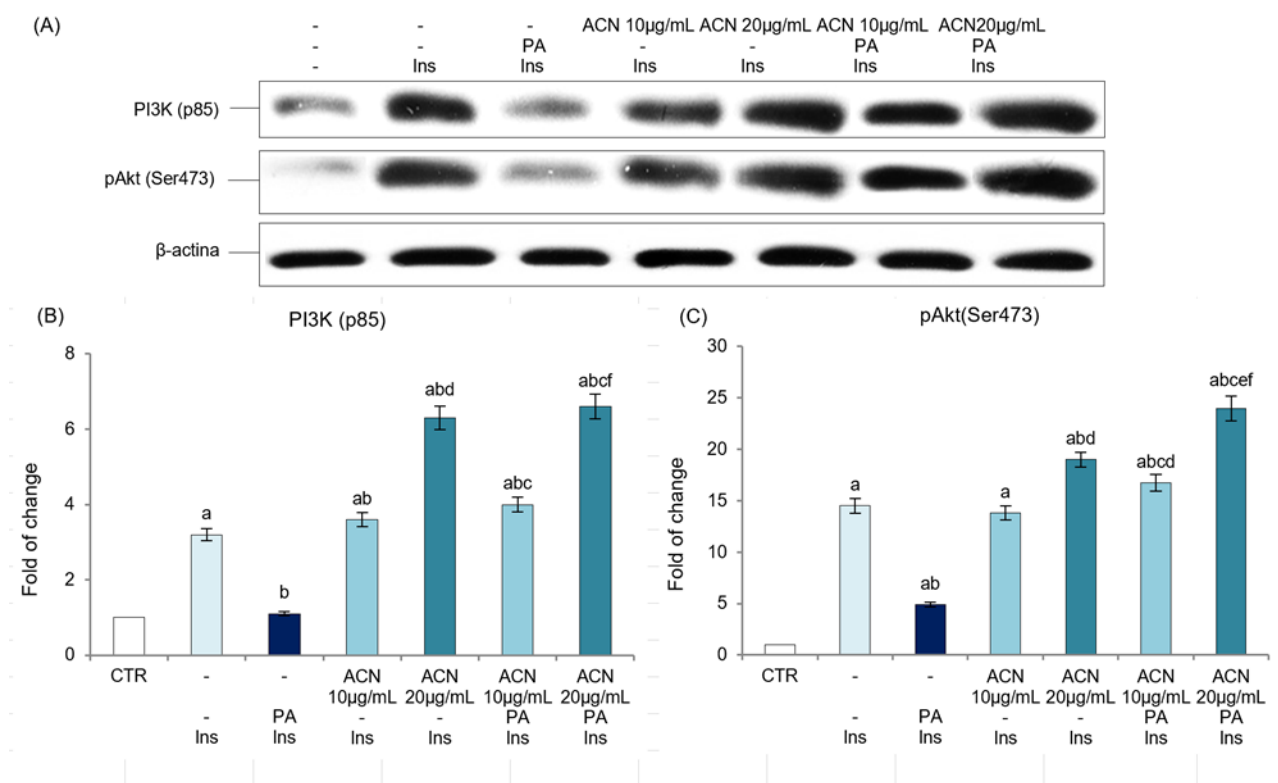
**Figura 7.** Effetto dell'estratto ACN sull'espressione genica IL-6 indotta da PA. Gli adipociti 3T3-L1 sono stati pretrattati con estratto ACN (10 e 20  $\mu$ g/mL) per 24 ore e successivamente esposti a PA 1 mM per 24 ore. Le cellule trattate con il solo veicolo sono state utilizzate come controllo (CTR). I valori di intensità di espressione genica di IL-6 sono espressi come  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  e normalizzati rispetto al controllo. L'rRNA 18S è stato utilizzato come gene housekeeping. <sup>a</sup>p < 0.05 vs. CTR; <sup>b</sup>p < 0.05 vs. PA; <sup>c</sup>p < 0.05 vs. ACN 10  $\mu$ g/mL; <sup>d</sup>p < 0.05 vs. ACN 20  $\mu$ g/mL; <sup>e</sup>p < 0,05 contro ACN 10  $\mu$ g/mL + PA. (mod. da Muscarà et al., 2019).

### ***Effetto dell'estratto ACN nei confronti dell'insulino-resistenza indotta da PA***

L'insulino-resistenza è una condizione patologica caratterizzata da una risposta insufficiente all'insulina da parte dei tessuti target (muscolo, fegato e tessuto adiposo). Il legame dell'insulina al proprio recettore induce un'autofosforilazione che innesca una cascata fosforilativa che coinvolge le proteine IRS-1, PI3K ed infine Akt. La proteina Akt, nota anche come protein chinasi B, svolge un ruolo centrale negli effetti metabolici dell'insulina, quale l'aumento della traslocazione dei trasportatori del glucosio (GLUT) sulla superficie cellulare permettendo quindi l'uptake di glucosio. Per valutare l'effetto dell'estratto ACN sulla via di segnale dell'insulina, alterata da PA, i livelli proteici di PI3K (p85), pAkt e GLUT-1 sono stati valutati mediante western blot, sulla linea cellulare 3T3-L1.

### ***Effetto dell'estratto ACN su PI3K e pAkt***

I dati ottenuti dimostrano che l'esposizione degli adipociti a PA ha ridotto i livelli di PI3K (p85) e pAkt confermando così che l'esposizione degli adipociti ad elevate concentrazioni di PA induce un'alterazione della via di segnale dell'insulina (Figura 8). Al contrario, il pretrattamento delle cellule 3T3-L1 con l'estratto ACN (10 e 20 µg/mL) ha aumentato, in maniera significativa e dose-dipendente, i livelli di PI3K(p85) e pAkt alterati dal PA (Figura 8). È interessante notare che l'estratto ACN, alla concentrazione di 20 µg/mL, è stato capace di aumentare i livelli di questi marker oltre quelli del controllo esposto ad insulina, sia in presenza che in assenza di PA. Questi risultati dimostrano quindi la capacità dell'estratto in esame di esercitare non solo un effetto protettivo nei confronti della lipotossicità esercitata dal PA ma soprattutto un importante effetto insulino-sensibilizzante.

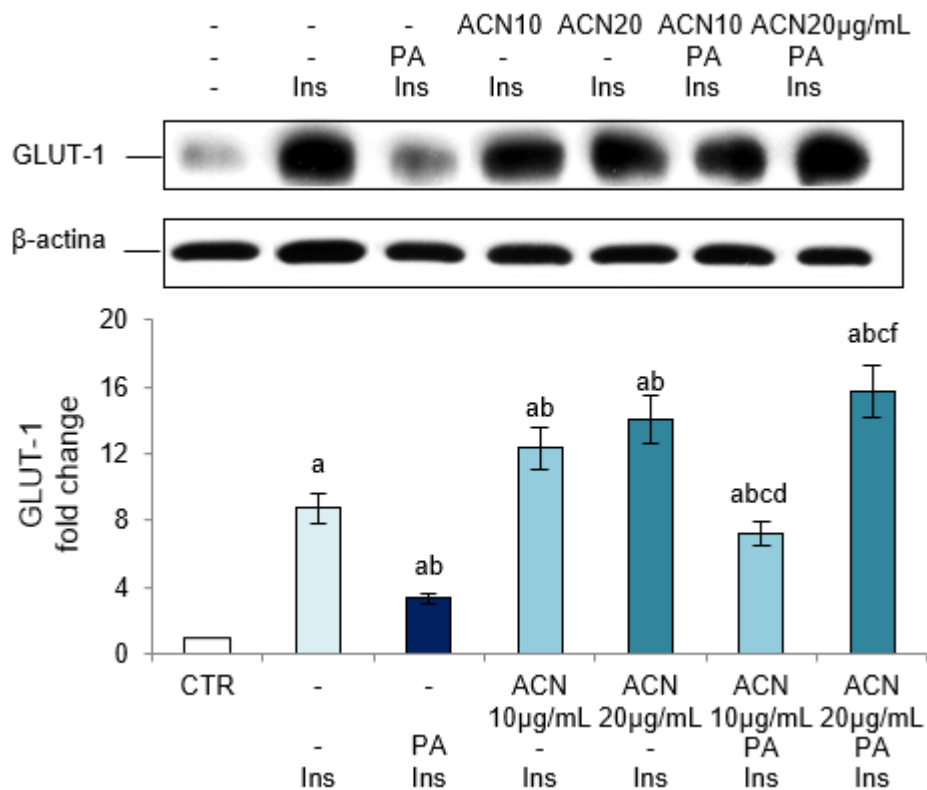


**Figura 8 A-B-C** Effetto dell'estratto ACN su (a, b) PI3K (p85) e (a, c) pAkt (Ser473). Gli adipociti 3T3-L1 sono stati pretrattati con estratto ACN (10 e 20 µg/mL) per 24 ore, esposti a PA 1 mM per 24 ore e infine incubati con insulina 100 nM per 15 min. Le cellule trattate con i soli veicoli sono state utilizzate come controlli (CTR). Le proteine totali sono state analizzate mediante western blot (a). I risultati della densitometria sono riportati come variazione rispetto al controllo ed espressi come media ± DS di tre esperimenti indipendenti. I valori di (b) PI3K (p85), (c) pAkt sono stati normalizzati con i corrispondenti valori di β-actina. <sup>a</sup>p < 0.05 vs. CTR; <sup>b</sup>p < 0.05 vs. Ins; <sup>c</sup>p < 0.05 vs. PA + Ins; <sup>d</sup>p < 0.05 vs. ACN 10 µg/mL + Ins; <sup>e</sup>p < .05 vs. ACN 20 µg/mL + Ins; <sup>f</sup>p < .05 vs. ACN 10 µg/mL + PA + Ins. (mod. da Muscarà et al., 2019).

### **Effetto dell'estratto ACN sull'espressione della proteina GLUT-1**

Per confermare l'effetto dell'estratto ACN sulla modulazione dei trasportatori del glucosio, sono stati studiati i livelli proteici di GLUT-1. L'esposizione di adipociti a PA ha ridotto i livelli di GLUT-1 dimostrando una ridotta sensibilità all'insulina (Figura 9). Il pretrattamento dell'estratto ACN, molto probabilmente attraverso l'attivazione di Akt, ha portato a un aumento dose-dipendente dei livelli di GLUT-1 nelle cellule esposte a PA. Inoltre, il pretrattamento con il solo estratto ACN conferma un miglioramento della sensibilità degli adipociti all'insulina, come dimostrato dai

livelli di GLUT-1 più elevati rispetto a quelli riscontrati nelle cellule stimulate solo con insulina.



**Figura 9.** Effetto dell'estratto ACN sull'espressione della proteina GLUT-1. Gli adipociti 3T3-L1 sono stati pretrattati con estratto ACN (10 e 20 μg/mL) per 24 ore, esposti a PA 1 mM per 24 ore e infine incubati con insulina 100 nM per 15 min. Le cellule trattate con i soli veicoli sono state utilizzate come controlli (CTR). Le proteine totali sono state analizzate mediante western blot (a). I risultati della densitometria sono riportati come variazione rispetto al controllo ed espressi come media ± DS di tre esperimenti indipendenti. I valori di intensità di GLUT-1 sono stati normalizzati con i corrispondenti valori di β-actina. <sup>a</sup>p < 0.05 vs. CTR; <sup>b</sup>p < 0.05 vs. Ins; <sup>c</sup>p < 0.05 vs. PA + Ins; <sup>d</sup>p < 0.05 vs. ACN 10 μg/mL + Ins; <sup>f</sup>p < .05 vs. ACN 10 μg/mL + PA + Ins. (mod. da Muscarà et al., 2019).



## DISCUSSIONI

Gli antociani sono composti bioattivi, la cui assunzione si è mostrata utile nell'infiammazione e insulino-resistenza nell'uomo (R. Naseri et al., 2018; T. Belwal et al., 2017). Test *in vitro* mostrano che queste molecole migliorano la funzione degli adipociti e li proteggono dallo stress metabolico (Jennings, Welch, Spector, Macgregor e Cassidy, 2014). I nostri dati dimostrano che il sovraccarico lipidico, conseguente all'esposizione ad acido palmitico, induce il processo infiammatorio negli adipociti 3T3-L1, come mostrato dalla fosforilazione IKK e dalla traslocazione nucleare di NF- $\kappa$ B. È interessante notare che i risultati ottenuti hanno evidenziato che il pretrattamento con l'estratto ACN ha inibito la via NF- $\kappa$ B, indotta da PA, in modo dose dipendente. La maggiore concentrazione testata dell'estratto ACN (20  $\mu$ g/mL) è stata in grado di ripristinare i livelli citoplasmatici di IKK e nucleari di NF- $\kappa$ B portandoli ai valori del controllo.

Questi risultati sono stati confermati a livello trascrizionale, perché l'mRNA di IL6 (la cui espressione è modulata da NF- $\kappa$ B) è stato indotto dall'esposizione a PA e ridotto dal pretrattamento con l'estratto ACN. Tuttavia, l'effetto di ACN sulla risposta infiammatoria indotta da FFA è stato raramente dimostrato, quindi, al momento, non è possibile associare un meccanismo molecolare specifico negli effetti protettivi osservati. Comunque, recenti evidenze suggeriscono che l'attivazione di una risposta adattativa antiossidante cellulare, mediata dal fattore nucleare eritroide-2 (Nrf2) sembra essere il principale meccanismo attraverso il quale le antocianine inibiscono il pathway di NF- $\kappa$ B. Infatti, dati precedentemente ottenuti dal nostro laboratorio supportano l'ipotesi di un crosstalk tra Nrf2 e NF- $\kappa$ B ed in particolare l'effetto inibitorio del pathway di Nrf2 sull'attività trascrizionale di NF- $\kappa$ B (Ferrari et al., 2016; Fratantonio et al., 2015, 2017; Speciale et al., 2013).

Poiché la disfunzione degli adipociti associata all'ipertrofia è correlata all'insorgenza di insulino-resistenza, abbiamo studiato il pathway dell'insulina. Nel nostro studio abbiamo dimostrato che il pretrattamento con l'estratto ACN può esercitare effetti positivi sulla via insulinica alterata da PA negli adipociti. ACN, infatti, ha mostrato la

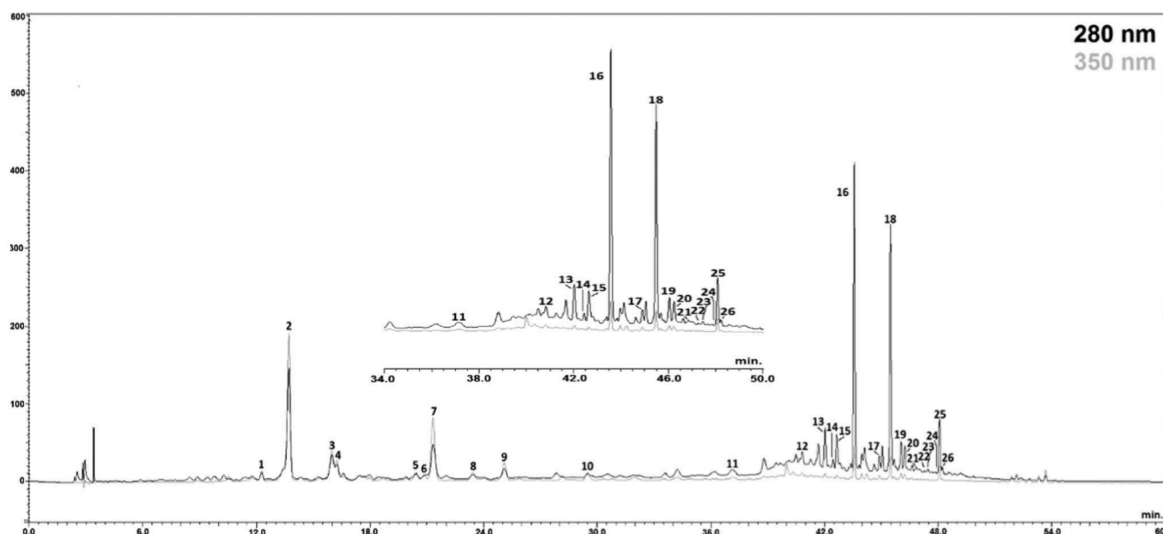
capacità di ripristinare i livelli di PI3K e di pAkt alterati da PA negli adipociti e questo effetto è stato osservato anche alla concentrazione più bassa testata (10 µg/mL). Inoltre, l'estratto ACN è stato in grado di attivare il pathway dell'insulina con valori superiori rispetto al controllo anche in assenza di PA, supportando così un effetto insulino-sensibilizzante di queste molecole. Questi dati sono supportati da precedenti studi *in vitro*, su cellule non adipose, che hanno dimostrato la capacità delle antocianine di attivare il pathway dell'insulina (Fratantonio et al., 2017; Belwal et al., 2017) modulando la fosforilazione attivante di IRS-1 sul residuo di tirosina e quindi, a cascata, l'asse PI3K/Akt. In particolare questo meccanismo sembra essere correlato all'attivazione del pathway di Nrf2 poiché l'inibizione di questo fattore di trascrizione annulla l'effetto insulino-sensibilizzante (Fratantonio et al., 2017).

# STUDIO DELL'EFFETTO DI UN ESTRATTO DI FOGLIE DI *GLYCYRRHIZA GLABRA* (GGLME) SULLA LIPOTOSSICITÀ INDOTTA DA ACIDO PALMITICO (PA) IN ADIPOCITI E CELLULE ENDOTELIALI

## Caratterizzazione quali - quantitativa di GGLME

L'analisi cromatografica dell'estratto metanolico di foglie di *Glycyrrhiza glabra* ha mostrato un interessante profilo fitochimico. Il cromatogramma HPLC/DAD di GGLME, visualizzato a 280 e 350 nm, è mostrato in Figura 10, mentre l'elenco dei picchi, i dati diagnostici e quantitativi sono riportati nella Tabella 3. Si evidenziano metaboliti polari, rappresentati principalmente da flavoni e flavonoli glicosilati, eluiti nell'intervallo tra 12 e 38 min, mentre flavanoni prenilati e diidrostilbeni tra 38 e 48 min (Figura 10, Tabella 3).

I principali componenti polifenolici presenti nell'estratto sono flavanoni (7,072 mg/100mg es) e diidrostilbeni (5,924 mg/100mg es) ed, in particolare, i costituenti principali sono rappresentati dalla pinocembrina (2,853 mg/100mg es) ed il licoflavanone (2,989 mg/100mg es) entrambi flavanoni, della classe dei flavoni è presente una quantità elevata di apigenina 6,8-di-C-glucoside (2,530 mg/100mg es).



**Figura 10.** HPLC-UV-DAD - profilo dell'estratto metanolico di foglie di *G. glabra* (a 280 e 350 nm) (Siracusa et al., 2020).

**Tabella 3.** Elenco picchi, dati quali-quantitativi dei metaboliti dell'estratto metanolico di foglie di *G. glabra* (Siracusa et al., 2020).

| picco | RT, min <sup>a</sup> | Composto  | classe         | Dati UV-Vis   | PM  | MS: ESI-, m/z <sup>b</sup>                               | mg/100mg estr |
|-------|----------------------|---|----------------|---------------|-----|--|---------------|
| 1     | 12.27                | Kaempferolo di-esoside  | flavonoli      | 271, 345      | 610 | 609* (M-1)   | 0,089         |
| 2     | 13.71                | Apigenina 6, 8 di-C-glucoside (Viceninina-2) <sup>d</sup>                                       | flavoni        | 270, 334      | 594 | 353, 473, 593* (M-1)                                     | 2,530         |
| 3     | 15.98                | Apigenina di-C- esoside pentoside <sup>c</sup>  | flavoni        | 270, 335      | 564 | 443, 563* (M-1)  | 0,565         |
| 4     | 16.24                | Apigenina di-C-esoside pentoside <sup>c</sup>   | flavoni        | 270, 335      | 564 | 443, 563* (M-1)  | 0,299         |
| 5     | 20.41                | Quercetina rhamno-glucoside (Rutin) <sup>d</sup>  | flavonoli      | 256, 354      | 610 | 301 (M-rut-1), 463 (M-rha-1), 609* (M-1)                 | 0,122         |
| 6     | 20.83                | Quercetina esoside pentoside  | flavonoli      | 254, 280, 352 | 596 | 595 (M-1), 462* (M-pentoside), 301 (M-pentoside-esoside) | 0,077         |
| 7     | 21.32                | Isoquercitrina <sup>d</sup>   | flavonoli      | 256, 355      | 464 | 301(M-glc-1),463* (M-1)                                  | 0,65          |
| 8     | 23.43                | Quercetina 3-O-glucoside 6" acetato <sup>d</sup>  | flavonoli      | 257, 293, 356 | 506 | 301 (M-AcO-esoside-1),505* (M-1), 1011 (2M-1)            | 0,102         |
| 9     | 25.08                | Kaempferol 3-O-glucoside (Astragalin) <sup>d</sup>  | flavonoli      | 266, 348      | 448 | 287* (M-glc-1), 447 (M-1)                                | 0,189         |
| 10    | 29.49                | Kaempferolo 7-O- glucoside <sup>d</sup>   | flavonoli      | 267, 344      | 448 | 447 (M-1)  | 0,075         |
| 11    | 37.12                | Pinocembrina 7-O- glucoside <sup>d</sup>  | flavanoni      | 282, 330      | 418 | 255* (M-esoside-1), 417 (M-1)                            | 0,344         |
| 12    | 40.82                | Naringenina <sup>d</sup>  | flavanoni      | 287, 335      | 272 | 271*(M-1)  | 0,189         |
| 13    | 42.03                | $\alpha,\alpha'$ -diidro-3,5,3',4'- tetraidrossi- 5'-isopentenilstilbene <sup>d</sup>           | diidrostilbeni | 280           | 314 | 313*(M-1), 627(2M-1)                                     | 1,480         |
| 14    | 42.45                | $\alpha, \alpha'$ -diidro- 3,5,3' triidrossi- 4'-metossistilbene <sup>d</sup>                   | diidrostilbeni | 278           | 260 | 123*, 259 (M-1)  | 0,218         |
| 15    | 42.65                | $\alpha, \alpha'$ -diidro- 3,5,3' triidrossi- 4'-metossi- 5'- isopentenil stilbene <sup>d</sup> | diidrostilbeni | 280           | 328 | 123, 327*(M-1),655 (2M-1), 983 (3M-1)                    | 1,644         |
| 16    | 43.57                | Pinocembrina  | flavanoni      | 289, 330      | 256 | 151, 255* (M-1)  | 2,853         |

|                              |       |   |                |          |     |                             |              |
|------------------------------|-------|---|----------------|----------|-----|-----------------------------|--------------|
| 17                           | 44.90 | $\alpha, \alpha'$ -diidro- 3,5 diidrossi- 4'-acetossi-5'-isopentenilstilbene <sup>d</sup>   | diidrostilbeni | 293, 335 | 340 | 219*, 339 (M-1), 679 (2M-1) | 0,492        |
| 18                           | 45.48 | Licoflavanone d   | flavanoni      | 286, 330 | 340 | 151, 339* (M-1), 679 (2M-1) | 2,989        |
| 19                           | 46.05 | $\alpha, \alpha'$ -diidro-3,5,4'- triidrossi- 5'-isopentenilstilbene <sup>d</sup>           | diidrostilbeni | 264, 340 | 298 | 297 (M-1)                   | 0,895        |
| 20                           | 46.25 | Acetossi derivati di a, a'-diidro-3,5,4'- triidrossi- 5'- isopentenilstilbene <sup>d</sup>  | diidrostilbeni | 265, 340 | 340 | 339* (M-1)                  | 0,861        |
| 21                           | 46.86 | sconosciuto   |                | 291, 335 | 340 | 339 (M-1)                   | 0,166        |
| 22                           | 47.31 | $\alpha, \alpha'$ -diidro-3,5,3',4'- tetraidrossi- 4,5'- diisopentenilstilbene <sup>d</sup> | diidrostilbeni | 280      | 382 | 191*, 381 (M-1),764 (2M-1)  | 0,015        |
| 23                           | 47.46 | $\alpha, \alpha'$ -diidro-3,5,4'- triidrossi- 4,5'- diisopentenilstilbene <sup>d</sup>      | diidrostilbeni | 279      | 366 | 191*, 365 (M-1), 731 (2M-1) | 0,109        |
| 24                           | 47.85 | $\alpha, \alpha'$ -diidro-3,3',4'- triidrossi- 5-O-isopentenil-6-isopentenilstilbene d      | diidrostilbeni | 282      | 382 | 191*, 381 (M-1),763 (2M-1)  | 0,044        |
| 25                           | 48.08 | Glabranina <sup>d</sup>   | flavanoni      | 293, 335 | 324 | 323* (M-1)                  | 0,626        |
| 26                           | 48.23 | Glabranin isomero <sup>c,d</sup>  | flavanoni      | 292, 340 | 324 | 323* (M-1)                  | 0,071        |
| <b>Flavanoni totali</b>      |       |   |                |          |     |                             | <b>7,071</b> |
| <b>Diidrostilbeni totali</b> |       |   |                |          |     |                             | <b>5,923</b> |
| <b>Flavoni totali</b>        |       |   |                |          |     |                             | <b>3,394</b> |
| <b>Flavonoli totali</b>      |       |   |                |          |     |                             | <b>1,303</b> |

a: media di tre analisi, b: picchi base segnati con un asterisco, c: isomeri corretti non identificati, d: iniettato con lo standard analitico.

## Determinazione

### D-pinitolo in GGLME

La quantificazione del D-pinitolo in GGLME è stata effettuata mediante HPLC / ELSD estrapolando i risultati da una curva di calibrazione di una soluzione acquosa di standard di D-pinitolo. Secondo l'analisi effettuata, il contenuto di D-pinitolo, nell'estratto metanolico delle foglie di *Glycyrrhiza glabra* siciliana è del 19,65% che corrisponde a una resa di circa l'1% in peso secco.

### Attività antiossidante

In considerazione dell'elevato contenuto in flavonoidi, in particolare flavanoni, flavonoli e diidrostilbeni, è stata valutata la capacità antiossidante / radical scavenger dell'estratto metanolico di foglie di *G. glabra* tramite differenti test (Tabella 4), utilizzando come standard di riferimento la quercetina, flavonolo con note attività antiossidanti.

|                   | <b>DPPH</b><br>mM TE / mg<br>± SD | <b>TEAC</b><br>mM TE /<br>mg ± SD | <b>FRAP</b><br>mM FeSO <sub>4</sub> E<br>/ mg ± SD | <b>ORAC</b><br>μM TE/mg |
|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|-------------------------|
| <b>GGLME</b>      | 0,61 ± 0,02                       | 1,23 ± 0,11                       | 0,74 ± 0,07  | 84,45 ± 9,31            |
| <b>Quercetina</b> | 0,56 ± 0,04                       | 1,34 ± 0,18                       | 0,841 ± 0,065                                      | 16,55 ± 0,81            |

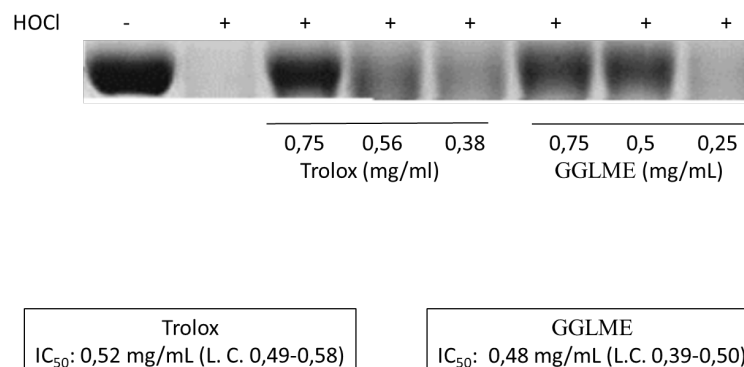
**Tabella 4.** Attività antiossidante dell'estratto metanolico GGLME. GAE: acido gallico equivalenti; TE: trolox equivalenti; FeSO<sub>4</sub>E: solfato ferroso equivalenti. I risultati sono espressi come media ± SD di tre differenti esperimenti.

Il GGLME, testato a differenti concentrazioni (1-0,125 mg/mL), ha mostrato di possedere una buona capacità antiossidante / radical scavenging nei test DPPH, TEAC, FRAP e una attività anche superiore allo standard di riferimento nel test dell'ORAC. L'estratto presenta una buona attività di scavenging O<sub>2</sub><sup>-</sup> ed ha dimostrato una elevata capacità protettiva per quanto riguarda la perossidazione lipidica (Tabella 5) nel test BCB.

L'estratto inoltre ha mostrato una buona azione inibente l'attività ossidante di HOCl nei confronti dell'albumina, rispetto al trolox usato come standard di riferimento (Figura 11).

|                   | SOD                     | <i>B-β-carotene</i>     |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|
|                   | EC <sub>50</sub> mg/ml  | ED <sub>50</sub> mg/ml  |
| <b>GGLME</b>      | 0,11<br>LC 0,09 – 0,12  | 0,80<br>LC 0,65 – 0,98  |
| <b>Quercetina</b> | 0,322<br>LC 0,316-0,434 | 0,956<br>LC 0,967-0,912 |

**Tabella 5.** Capacità di ridurre il radicale O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e saggio del β-carotene dell'estratto metanolico di foglie di *G. glabra* siciliana. I dati ottenuti da tre esperimenti indipendenti sono espressi come ED<sub>50</sub> e 90% L.C., la quercetina è stata utilizzata come standard di riferimento.



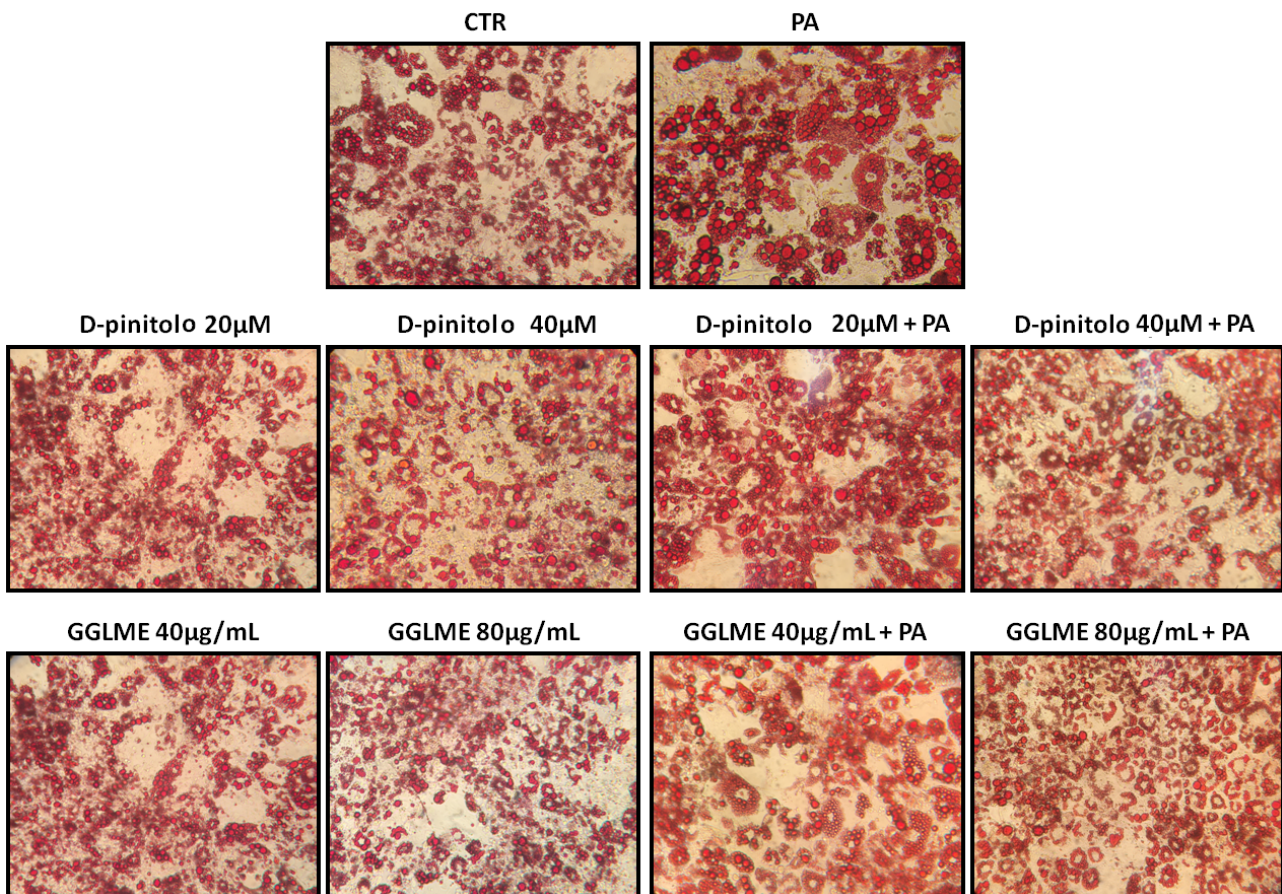
**Figura 11.** Inibizione della degradazione dell'albumina sierica bovina (BSA) indotta da HClO. BSA è stata incubata in assenza o in presenza di 177 mM HClO, e con quantità crescenti dell'estratto, quindi sottoposta a SDS-PAGE e sviluppata con Comassie Blue. L'analisi quantitativa è stata eseguita mediante densitometria su gel utilizzando il software ImageJ. Il trolox è stato utilizzato come controllo positivo / standard. L'immagine è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti e i risultati sono espressi come valori IC<sub>50</sub> (mg/mL) e 90% L. C.

## **Effetto protettivo di GGLME nei confronti dell'ipertrofia indotta da PA in adipociti murini**

Per valutare l'effetto protettivo di GGLME nei confronti della disfunzione adipocitaria indotta da elevate concentrazioni di PA, le cellule sono state pretrattate con differenti concentrazioni dell'estratto in esame per 24 ore e successivamente esposte a PA per ulteriori 24 ore. Inoltre, considerato che la concentrazione nell'estratto GGLME 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contiene 40  $\mu\text{M}$  (7,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) di D-pinitolo, l'effetto è stato confrontato con il D-pinitolo alle concentrazioni di 20  $\mu\text{M}$  (3,9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e 40 $\mu\text{M}$  (7,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

L'effetto di GGLME sull'accumulo intracellulare di lipidi, in seguito ad esposizione a PA, è stato valutato mediante colorazione istologica Oil Red O (Zebisch et al., 2012). I dati ottenuti mostrano che l'esposizione ad alte concentrazioni di PA ha causato ipertrofia negli adipociti 3T3-L1 rispetto alle cellule controllo (incremento di 1,4 volte vs CTR), dimostrato dall'aumento del numero e delle dimensioni dei vacuoli. Il pretrattamento delle cellule con GGLME o D-pinitolo (Figura 12) ha portato ad una riduzione dei depositi di lipidi in maniera dose-dipendente con un fold di 0,7 e 0,5 per il GGLME (rispettivamente 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e di 0,9 e 0,7 per il D-pinitolo (rispettivamente 20  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$ ).

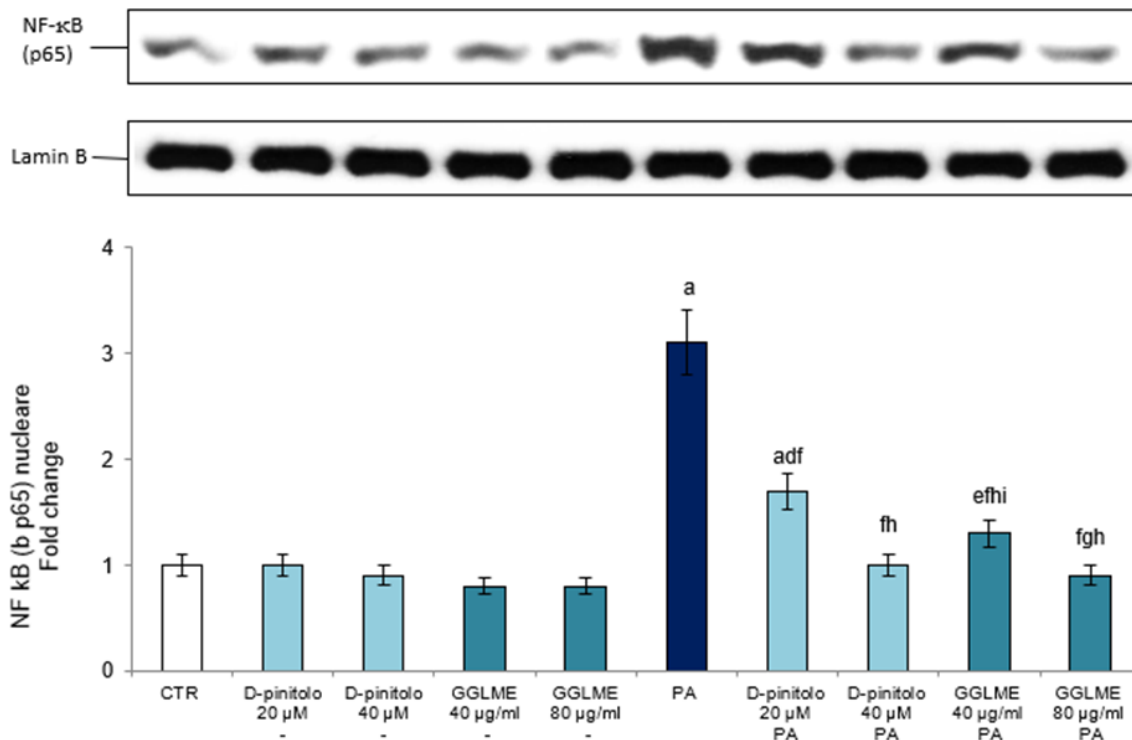




**Figura 12.** Effetto protettivo di GGLME e D-pinitolo contro l'ipertrofia indotta da PA in adipociti 3T3-L1. Colorazione Oil Red O: gli adipociti completamente differenziati sono stati pretrattati per 24 ore con GGLME (40 e 80 µg/mL) o D-pinitolo (20 e 40 µM) ed esposti per 24 ore a PA 1 mM. Le cellule trattate con i soli veicoli sono state utilizzate come controllo (CTR). Le immagini sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti e sono state ottenute utilizzando un microscopio ottico (ingrandimento originale a  $\times 40$ ).

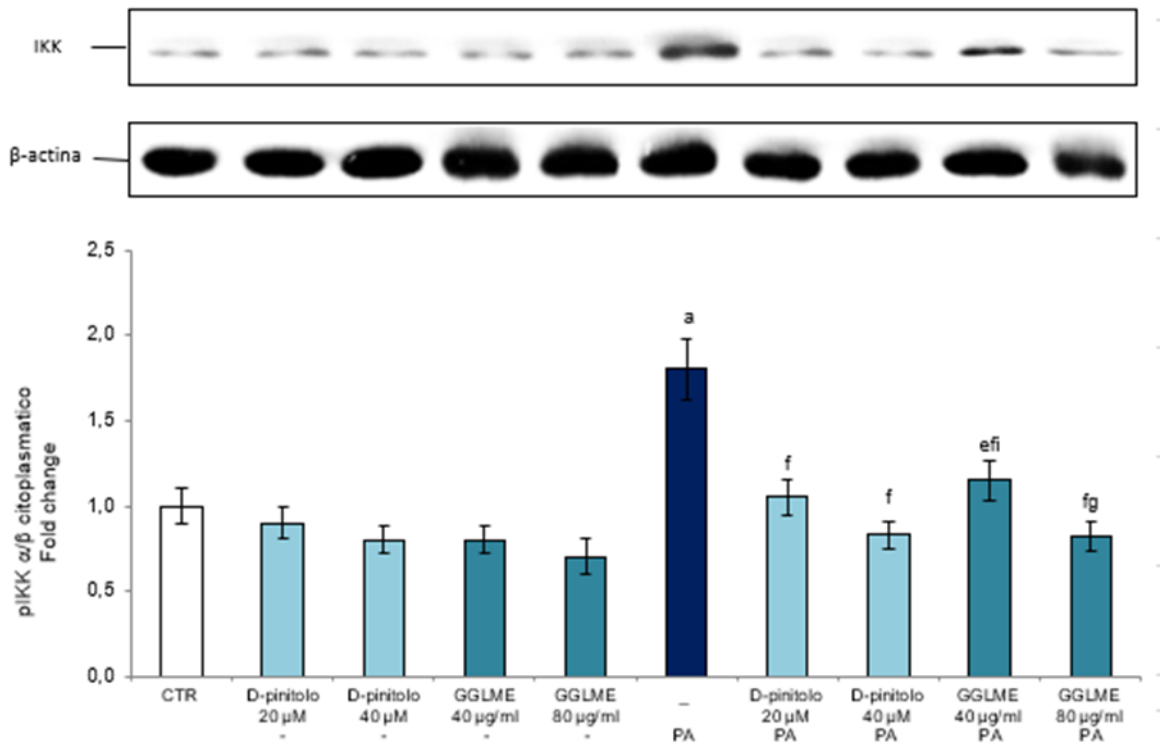
### **Effetto inibitorio di GGLME sull'attivazione della via infiammatoria di NF-κB indotta da PA**

Per valutare l'effetto di GGLME sull'infiammazione, è stato studiato il pathway di NF-κB. L'esposizione a PA ha indotto l'attivazione di NF-κB, come mostrato dall'aumento dei livelli nucleari di p65, mentre il pretrattamento con l'estratto di GGLME e il D-pinitolo hanno ridotto, in maniera dose-dipendente, tali livelli (Figura 13). Inoltre i dati mostrano che l'effetto ottenuto con la concentrazione di GGLME 40 µg/mL è leggermente inferiore a quello ottenuto con il D-pinitolo 40 µM.



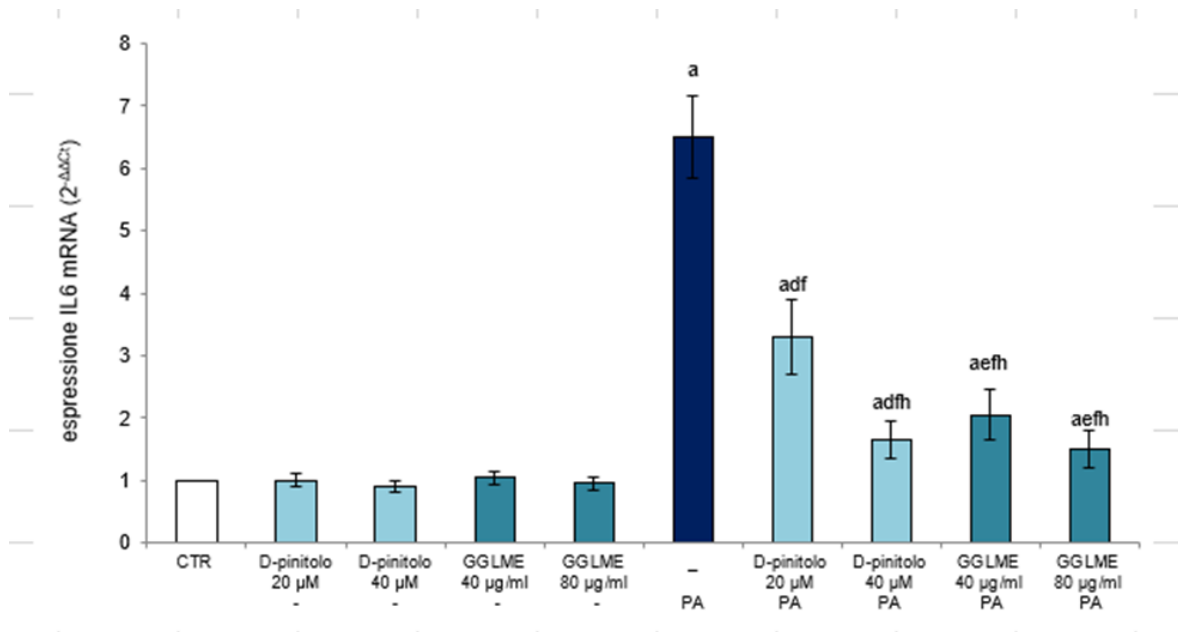
**Figura 13.** Effetto di GGLME e D-pinitolo sui livelli nucleari di NF-κB (p65). Gli adipociti 3T3-L1 sono stati pretrattati con GGLME (40 e 80 μg/mL) o con D-pinitolo (20 e 40 μM) per 24 ore e successivamente esposti a PA 1 mM per 24 ore. Le cellule trattate con il solo veicolo sono state utilizzate come controllo (CTR). L'immagine è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti. I risultati mediante densitometria sono riportati come variazione rispetto al CTR ed espressi come media ± DS di tre esperimenti indipendenti. I valori di intensità di NF-κB (p65) sono stati normalizzati ai corrispondenti valori di Lamin B. <sup>a</sup>p < 0.05 vs CTR, <sup>d</sup>p < 0.05 vs concentrazione corrispondente di D-pinitolo non esposta a PA, <sup>e</sup>p < 0.05 vs concentrazione corrispondente di GGLME non esposta a PA, <sup>f</sup>p < 0.05 vs PA; <sup>g</sup>p < 0.05 vs GGLME 40 μg/mL + PA, <sup>h</sup>p < 0.05 vs D-pinitolo 20 μM + PA; <sup>i</sup>p < 0.05 vs D-pinitolo 40 μM + PA.

Per valutare se l'effetto protettivo di GGLME e D-pinitolo, nei confronti dell'inflammatione indotta da PA, è correlato all'inibizione di IKK, sono stati esaminati i livelli citoplasmatici di IKK fosforilata. L'esposizione delle 3T3-L1 a PA ha causato l'aumento della fosforilazione di IKK, mentre il pretrattamento con GGLME o D-pinitolo ha portato ad una riduzione dell'attivazione di IKK indotta da PA (Figura 14). Anche in questo caso, l'effetto del GGLME 40 μg/mL è leggermente inferiore a quello del D-pinitolo 40 μM.



**Figura 14.** Effetto di GGLME e D-pinitolo sulla fosforilazione di IKK indotta da PA. Gli adipociti 3T3-L1 sono stati pretrattati con GGLME (40 e 80  $\mu$ g/mL) o con D-pinitolo (20 e 40  $\mu$ M) per 24 ore e successivamente esposti a 1 mM PA per 24 ore. Le cellule trattate con il solo veicolo sono state utilizzate come controllo (CTR). I risultati mediante densitometria sono riportati come variazione rispetto al CTR ed espressi come media  $\pm$  DS di tre esperimenti indipendenti. I valori di intensità di p - IKK  $\alpha$  /  $\beta$  sono stati normalizzati ai corrispondenti valori di  $\beta$  - actina. <sup>a</sup>p < 0.05 vs CTR, <sup>e</sup>p < 0.05 vs concentrazione corrispondente di GGLME non esposta a PA; <sup>f</sup>p < 0.05 vs PA, <sup>g</sup>p < 0.05 vs GGLME 40  $\mu$ g/mL + PA; <sup>i</sup>p < 0.05 vs D-pinitolo 40  $\mu$ M + PA.

Inoltre, l'attivazione del pathway di NF- $\kappa$ B è stata valutata anche a livello trascrizionale attraverso la determinazione dell'espressione genica di IL-6. I risultati confermano che il PA ha indotto una sovraespressione di IL-6 rispetto al controllo, mentre i valori di IL-6 sono diminuiti nelle cellule pretrattate con estratto di GGLME o D-pinitolo in maniera dose-dipendente. Un dato interessante è che l'attività trascrizionale di NF- $\kappa$ B modulata dal GGLME 40  $\mu$ g/mL è paragonabile a quella del D-pinitolo 40  $\mu$ M. Il pretrattamento con il solo estratto o con D-pinitolo non ha influenzato l'espressione genica di IL6 (Figura15).



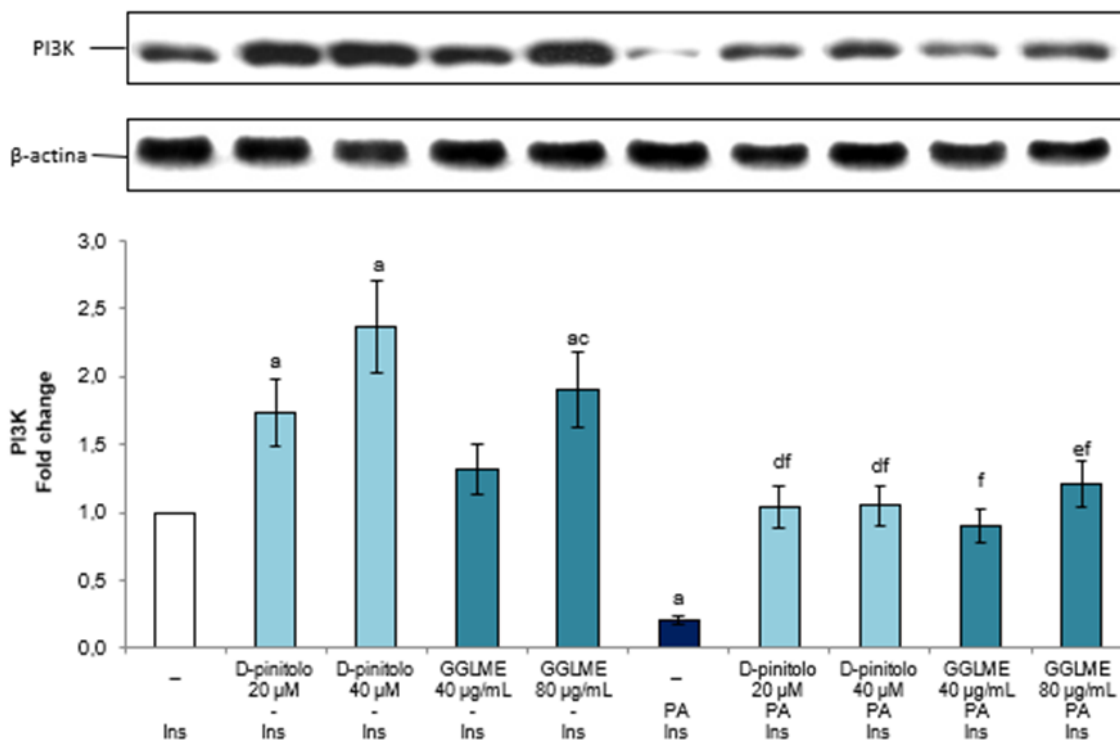
**Figura 15.** Effetto dell'estratto di D-pinitolo e GGLME sull'espressione genica IL-6 indotta da PA. Gli adipociti 3T3-L1 sono stati pretrattati con D-pinitolo (20 e 40  $\mu$ M) o con GGLME (40 e 80  $\mu$ g/mL) per 24 ore e successivamente esposti a 1 mM PA per 24 ore. Le cellule trattate con i soli veicoli sono state utilizzate come controlli (CTR). I valori di intensità di espressione genica di IL-6 sono espressi come  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  e normalizzati rispetto al controllo. L'rRNA 18S è stato utilizzato come gene housekeeping. <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs CTR, <sup>d</sup> $p < 0.05$  vs concentrazione corrispondente di D-pinitolo non esposto a PA, <sup>e</sup> $p < 0.05$  vs concentrazione corrispondente di GGLME non esposto a PA, <sup>f</sup> $p < 0.05$  vs PA, <sup>h</sup> $p < 0.05$  vs D-pinitolo 20  $\mu$ M + PA.

## Effetto dell'estratto GGLME nei confronti dell'insulino-resistenza indotta da PA

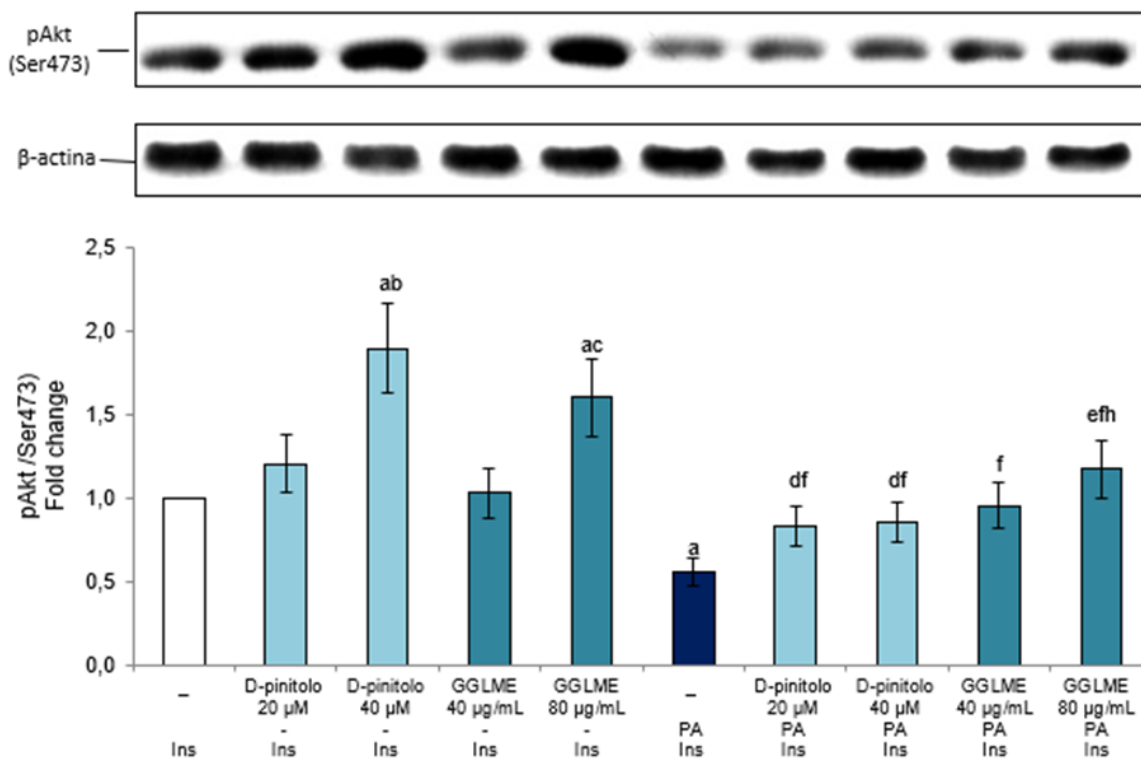
### Effetto di GGLME sull'asse PI3K/Akt

I risultati ottenuti dimostrano che l'esposizione degli adipociti a PA ha ridotto i livelli di proteina PI3K (p85), mentre sia il pretrattamento con GGLME che quello con D-pinitolo ha ripristinato tali livelli (Figura 16 A). Stesso trend è stato osservato per pAkt poiché, negli adipociti pretrattati con GGLME o D-pinitolo per 24 ore prima dell'esposizione a PA, i livelli di tale proteina vengono riportati a quelli del controllo (Figura 16 B). L'effetto ottenuto con il GGLME 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  è paragonabile a quello ottenuto con il D-pinitolo 40  $\mu\text{M}$ . I risultati inoltre mostrano un effetto insulino-sensibilizzante sia del GGLME che del D-pinitolo poiché, in assenza di PA, si osserva un'attivazione dose-dipendente dell'asse PI3K/Akt.

A)



B)



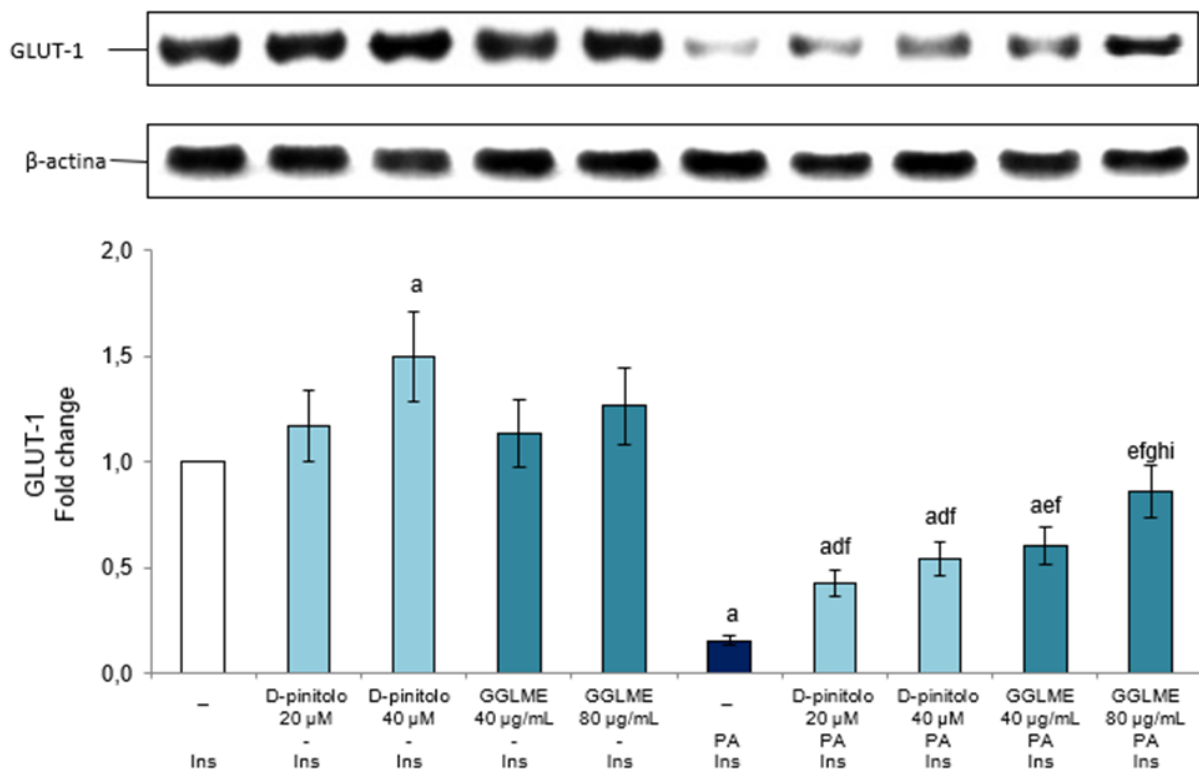
**Figura 16 A, B.** Effetto di GGLME e D-pinitolo su (A) PI3K e (B) pAkt (Ser473). Gli adipociti 3T3-L1 sono stati pretrattati con GGLME (40 e 80 μg/mL) o con D-pinitolo (20 e 40 μM) per 24 ore, esposti a PA 1 mM per 24 ore ed infine incubati con insulina 100 nM per 15 min. Le cellule trattate con i soli veicoli sono state utilizzate come controlli (CTR). I risultati della densitometria sono riportati come variazione rispetto al controllo ed espressa come media ± DS di tre esperimenti indipendenti. I valori di PI3K (p85) e pAkt (Ser473) sono stati normalizzati con i corrispondenti valori di β-actina.

<sup>a</sup>p < 0.05 vs insulina, <sup>b</sup>p < 0.05 vs D-pinitolo 20 μM, <sup>c</sup>p < 0.05 vs GGLME 40 μg/mL, <sup>d</sup>p < 0.05 vs concentrazione corrispondente di D-pinitolo non esposta a PA, <sup>e</sup>p < 0.05 vs concentrazione corrispondente di GGLME non esposta a PA, <sup>f</sup>p < 0.05 vs PA, <sup>h</sup>p < 0.05 vs D-pinitolo 20 μM + PA.

### ***Effetto di GGLME sull'espressione della proteina GLUT-1***

Per confermare l'effetto di GGLME e D-pinitolo sulla modulazione dell'uptake del glucosio indotta da insulina, sono stati studiati i livelli proteici del trasportatore GLUT-1. L'esposizione degli adipociti a PA ha ridotto i livelli di GLUT-1 dimostrando una ridotta sensibilità all'insulina, mentre il pretrattamento con GGLME o D-pinitolo ha portato ad un aumento dose-dipendente dei livelli di GLUT-1 nelle cellule esposte a PA. Anche in questo caso, l'effetto ottenuto dal GGLME 40 μg/mL e D-pinitolo 40

$\mu\text{M}$  è paragonabile. Inoltre, il pretrattamento solo con GGLME o D-pinitolo conferma un aumento della sensibilità degli adipociti all'insulina, come dimostrato dai livelli di GLUT-1 più elevati rispetto a quelli riscontrati nelle cellule stimulate solo con insulina (Figura 17).

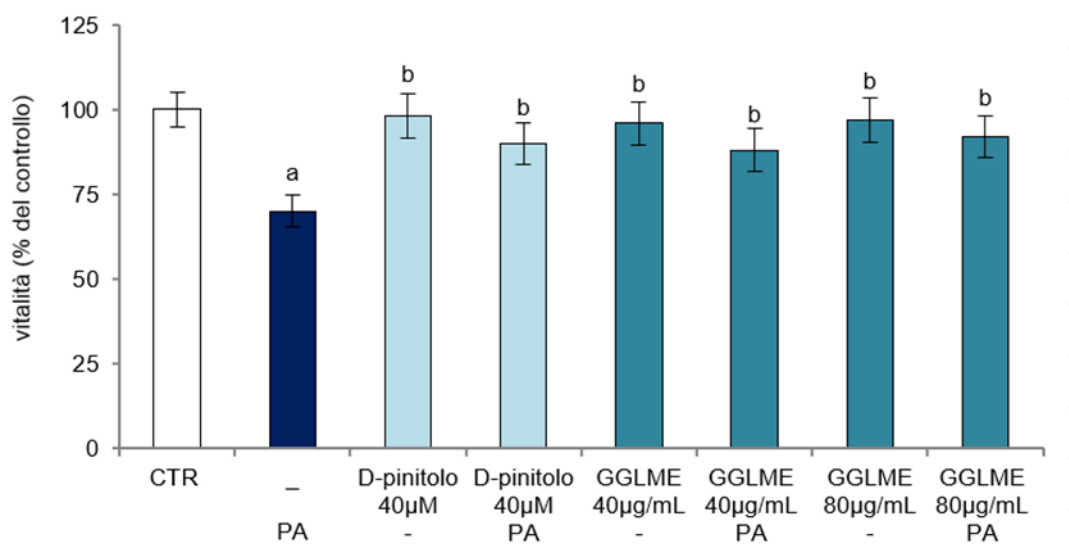


**Figura 17.** Effetto di GGLME e D-pinitolo sull'espressione della proteina GLUT-1. Gli adipociti 3T3-L1 sono stati pretrattati con GGLME (40 e 80  $\mu\text{g/mL}$ ) o con D-pinitolo (20 e 40  $\mu\text{M}$ ) per 24 ore, esposti a PA 1 mM per 24 ore e infine incubati con insulina 100 nM per 15 min. Le cellule trattate con i soli veicoli sono state utilizzate come controlli (CTR). I risultati della densitometria sono riportati come variazione rispetto al controllo ed espressi come media  $\pm$  DS di tre esperimenti indipendenti. I valori di intensità di GLUT-1 sono stati normalizzati con i corrispondenti valori di  $\beta$ -actina. <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs insulina, <sup>d</sup> $p < 0.05$  vs concentrazione corrispondente di D-pinitolo non esposta a PA, <sup>e</sup> $p < 0.05$  vs concentrazione corrispondente di GGLME non esposta a PA, <sup>f</sup> $p < 0.05$  vs PA, <sup>g</sup> $p < 0.05$  vs GGLME 40  $\mu\text{g/mL}$  + PA, <sup>h</sup> $p < 0.05$  vs D-pinitolo 20  $\mu\text{M}$  + PA, <sup>i</sup> $p < 0.05$  vs D-pinitolo 40  $\mu\text{M}$  + PA.

## Studio dell'effetto di GGLME sull'insulino-resistenza in cellule HUVEC esposte a PA

### Test di vitalità

La lipotossicità nelle HUVEC è stata indotta trattando le cellule ad elevate concentrazioni di PA per simulare un'esposizione eccessiva dell'endotelio ai FFA circolanti (Fratantonio et al., 2015, Gual et al., 2005). L'esposizione a PA ha mostrato un effetto citotossico nelle cellule endoteliali rispetto alle cellule di controllo (Figura 18). I pretrattamenti con GGLME o D-pinitolo sono stati in grado di proteggere in modo significativo le HUVEC dalla lipotossicità indotta da PA. Alle concentrazioni testate, il trattamento con solo GGLME o D-pinitolo non hanno influenzato la vitalità cellulare.



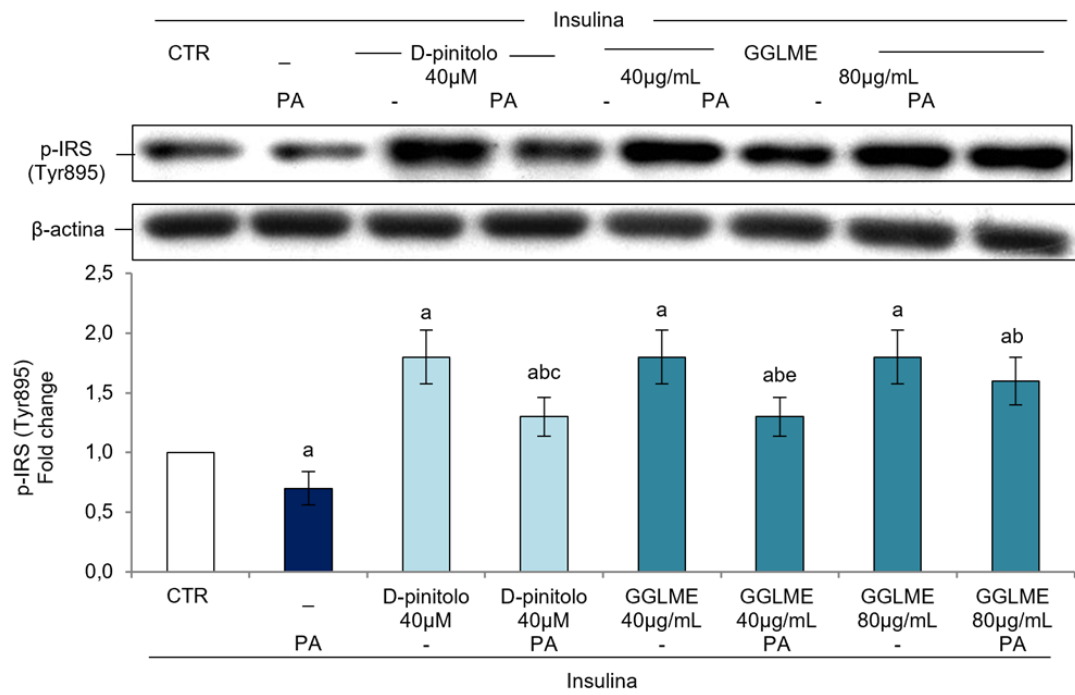
**Figura 18.** Test di esclusione dell'eritrosina B. Le cellule HUVEC sono state pretrattate per 24 ore con GGLME (40 e 80 µg/mL) o D-pinitolo (40 µM), esposte per 3 ore a PA 100 µM. Le cellule incubate solo con insulina sono state utilizzate come controllo (CTR). I dati rappresentano la percentuale di cellule vitali nei campioni trattati rispetto al CTR. I dati sono espressi come media ± SD di tre esperimenti indipendenti. <sup>a</sup>p < .05 vs CTR; <sup>b</sup>p < .05 vs PA.



### **Effetto di GGLME sulla fosforilazione attivante di IRS-1 in cellule HUVEC**

La compromissione della via di segnale IRS/PI3K/Akt/eNOS è uno dei principali meccanismi coinvolti nella resistenza all'insulina nelle cellule endoteliali. Questa alterazione causa una conseguente diminuzione della produzione di ossido nitrico (NO). L'NO è il più importante fattore vasodilatatore di origine endoteliale che contribuisce al mantenimento dell'omeostasi vascolare (Janus et al., 2016).

Nel nostro studio, abbiamo inizialmente valutato gli effetti della resistenza all'insulina indotta da PA concentrandoci sulla fosforilazione attivante (residuo Tyr895) della proteina IRS-1 come elemento chiave nella trasduzione del segnale insulinico. È noto infatti che l'aumento di citochine circolanti o FFA sono in grado di inibire il pathway dell'insulina attraverso la fosforilazione in serina di IRS-1 a discapito del residuo tirosinico (Fratantonio et al., 2017). Nelle nostre condizioni sperimentali, la fosforilazione del residuo Tyr895 di IRS-1 è stata ridotta dall'esposizione delle cellule endoteliali a PA (Figura 19). Entrambi i pretrattamenti di GGLME (in modo dose-dipendente) e di D-pinitolo però sono stati associati ad un aumento della fosforilazione di IRS-1(Tyr895). Inoltre, l'effetto osservato per GGLME 40 µg/mL è paragonabile a quello ottenuto con il D-pinitolo 40 µM. Infine, il solo trattamento con GGLME o D-pinitolo ha indotto un aumento della fosforilazione IRS-1(Tyr895) rispetto al controllo insulina dimostrando così un effetto insulino-mimetico dei campioni in esame.

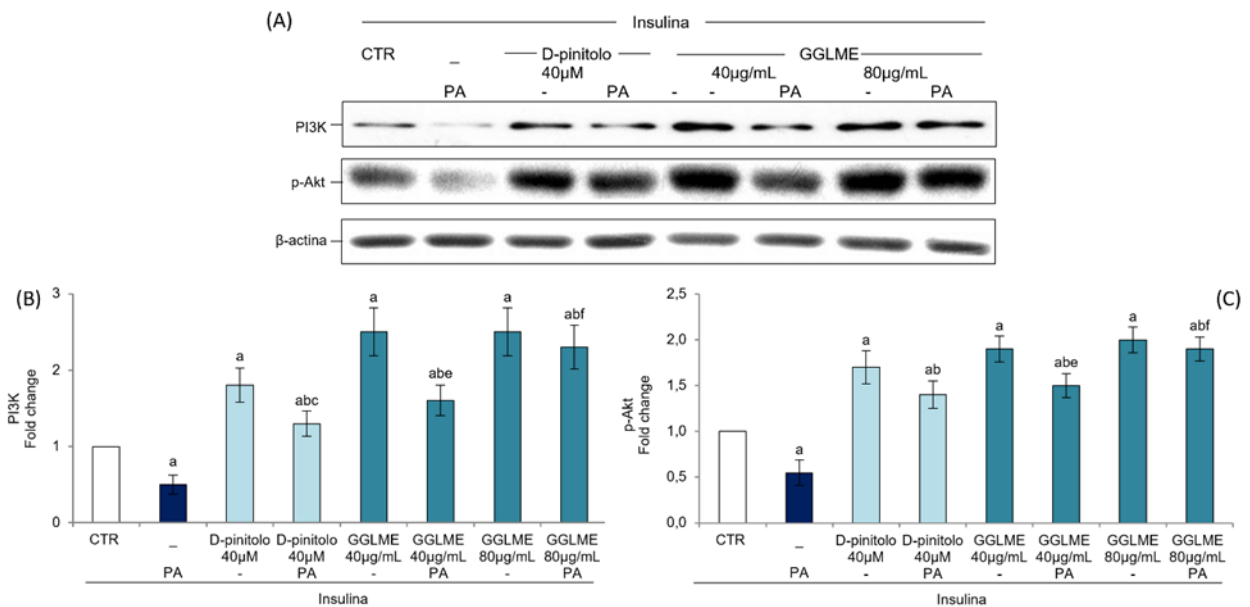


**Figura 19.** Effetto del pretrattamento con GGLME o D-pinitolo sulla fosforilazione della tirosina 895 di IRS-1. Le cellule HUVEC sono state pretrattate per 24 ore con GGLME (40 e 80 µg/mL) o D-pinitolo (40 µM), esposte per 3 ore a PA 100 µM e poi incubate con insulina 100 nM per 15 min. Le cellule incubate solo con insulina sono state utilizzate come controllo (CTR). L'immagine è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti. I risultati della densitometria sono riportati come variazione rispetto al controllo ed espressi come media ± DS di tre esperimenti indipendenti. I valori di intensità di sono stati normalizzati ai corrispondenti valori di β-actina. <sup>a</sup>p < .05 vs CTR; <sup>b</sup>p < .05 vs PA; <sup>c</sup>p < .05 vs D-pinitol (40 µM); <sup>e</sup>p < .05 vs GGLME (40 µg/mL). (Siracusa et al., 2020).

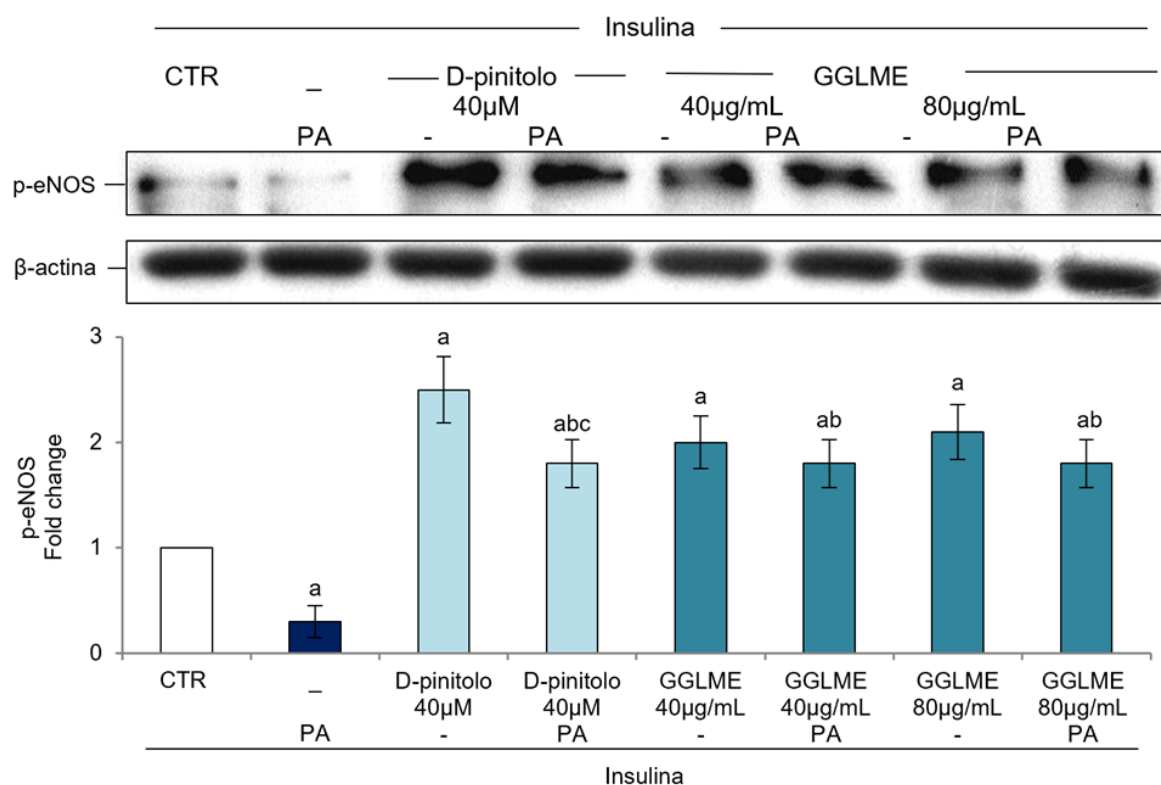
### Effetto di GGLME sulla via di segnale PI3K/Akt/eNOS in cellule HUVEC

L'insulina, oltre al suo ruolo metabolico, influisce sul mantenimento della funzione endoteliale grazie alla sua capacità di stimolare il rilascio di NO mediante la via IRS-1/PI3K/Akt che controlla l'attivazione a valle di eNOS (Potenza et al., 2005). Nelle nostre condizioni sperimentali, il PA ha ridotto i livelli di PI3K (Figura 20 B) attivati dall'insulina, così come la fosforilazione di Akt (Figura 20 C) ed eNOS (Figura 21), dimostrando un'alterazione del pathway insulinico di PI3K/Akt. Questi dati confermano quanto già osservato sulla fosforilazione della Tyr895 di IRS-1 riportata in Figura 19. È da notare che i pretrattamenti con GGLME o D-pinitolo contrastano, in modo dose-dipendente, l'effetto inibitorio del PA sull'attivazione dell'asse PI3K/Akt/eNOS (Figure 20 e 21). Inoltre, il trattamento con solo GGLME o D-pinitolo

ha aumentato l'espressione di PI3K, p-Akt e p-eNOS rispetto al controllo confermando l'effetto insulino-mimetico.



**Figura 20 A, B, C** Effetto del pretrattamento con GGLME o D-pinitolo sulla via PI3K/Akt. Le cellule HUVECs sono state pretrattate per 24 ore con GGLME (40 e 80  $\mu$ g/mL) o D-pinitolo (40  $\mu$ M), esposte per 3 ore a PA 100  $\mu$ M e poi incubate con insulina 100 nM per 15 min. Le cellule incubate solo con insulina sono state utilizzate come controllo (CTR). L'immagine (A) è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti. I risultati della densitometria (B e C) sono riportati come variazione rispetto al controllo ed espressi come media  $\pm$  DS di tre esperimenti indipendenti. I valori di intensità di sono stati normalizzati ai corrispondenti valori di  $\beta$ -actina. <sup>a</sup> $p < .05$  vs CTR; <sup>b</sup> $p < .05$  vs PA; <sup>c</sup> $p < .05$  vs D-pinitolo (40  $\mu$ M); <sup>e</sup> $p < .05$  vs GGLME (40  $\mu$ g/mL) (Siracusa et al., 2020).



**Figura 21.** Effetto del pretrattamento con GGLME o D-pinitolo sulla fosforilazione di eNOS. Le cellule HUVEC sono state pretrattate per 24 ore con GGLME (40 e 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o D-pinitolo (40  $\mu\text{M}$ ), esposte per 3 ore a PA 100  $\mu\text{M}$  e poi incubate con insulina 100 nM per 15 min. Le cellule incubate solo con insulina sono state utilizzate come controllo (CTR). L'immagine è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti. I risultati della densitometria sono riportati come variazione rispetto al controllo ed espressi come media  $\pm$  DS di tre esperimenti indipendenti. I valori di intensità di sono stati normalizzati ai corrispondenti valori di  $\beta$ -actina. <sup>a</sup> $p < .05$  vs CTR; <sup>b</sup> $p < .05$  vs PA; <sup>c</sup> $p < .05$  vs D-pinitolo (40  $\mu\text{M}$ ) (Siracusa et al., 2020).

## DISCUSSIONI

### Profilo fitochimico e proprietà antiossidanti

Numerosi studi hanno evidenziato le molteplici attività biologiche dei fitocomplessi derivati dalla *Glycyrrhiza glabra*, tra cui attività antiossidante ed antinfiammatoria, (Dastagir, 2016). Sebbene per molto tempo le parti più utilizzate della *G. glabra* siano state le radici, molti studi hanno riportato che, anche le sue parti aeree, solitamente trattate come rifiuti agrochimici, contenevano molti composti bioattivi, di origine flavonoidica, come diidrostilbeni (Biondi et al., 2005), pinocembrina (Lan et al., 2016) licoflavanone, formononetina, isoquercitrina, genisteina, prunetina, wighteone, 6-prenilnaringenina e lupiwighteone (Biondi et al., 2005).

Questi composti hanno dimostrato possedere numerose attività biologiche infatti, come riportato in letteratura i diidrostilbeni derivati dalle foglie di *Glycyrrhiza glabra* hanno rivelato una sostanziale attività antigenotossica, antiossidante e antinfiammatoria (Siracusa et al., 2011; Trombetta et al., 2014); la pinocembrina, ottenuta da estratti di foglie *Glycyrrhiza glabra* ha dimostrato attività antiproliferative, antiossidanti e antibatteriche (Rasul et al., 2013), e inoltre questo flavonoide sembra determini downregulation del fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- $\alpha$ ), interleuchina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interleuchina 6 (IL-6) dimostrando buone attività antinfiammatorie (Frattaruolo et al., 2019; Soromou et al., 2014;); recentemente anche il licoflavanone ha dimostrato inibire l'espressione indotta da LPS di TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6., oltre a ridurre i livelli di espressione di eNOS e COX2 nelle cellule RAW 264,7 stimulate da LPS, interferendo con la cascata infiammatoria mediata da NO e PGE<sub>2</sub> (Frattaruolo et al., 2019); inoltre Frattaruolo e collaboratori (2019) hanno dimostrato come il licoflavanone, ottenuto mediante estrazione da foglie essiccate di *Glycyrrhiza Glabra*, possa esercitare i suoi effetti antinfiammatori interferendo con crosstalk NF-kB / MAPK nei macrofagi attivati da LPS.

Ancora, il piceatannolo, uno stilbene analogo del resveratrolo, ripristina la via di segnale dell'insulina alterata da PA mediante l'attivazione dell'eme ossigenasi-1 (HO-1) nelle HUVEC (Jeong et al., 2015) e possiede un'attività antiinfiammatoria ed

insulino-sensibilizzante in adipociti esposti al TNF-alfa inibendo il pathway di NF-kB e attivando la via PI3K/Akt (Li et al., 2017). Allo stesso modo, la quercetina e la quercetina-3-O-glucuronide sono utili nel migliorare la disfunzione dell'endotelio e del tessuto adiposo, legata all'insulino-resistenza, attraverso l'attivazione di IRS-1 e di Akt nelle HUVEC e nelle 3T3-L1 rispettivamente (Guo et al., 2013; Wang et al., 2013; Li et al., 2015; Xu et al., 2014).

La caratterizzazione fitochimica del nostro campione di GGLM evidenzia la presenza nel nostro estratto di molti dei composti sopracitati. Infatti dai risultati ottenuti mediante analisi HPLC-UV-Vis-DAD, i principali componenti polifenolici presenti nell'estratto sono flavanoni (pinocembrina e licoflavanone), diidrostilbeni e flavoni (apigenina 6,8-di-C-glucoside).

Nel nostro estratto inoltre, tramite analisi HPLC/ELSD, è stata rilevata una sostanziale quantità di D-pinitolo, (19,65%), che corrisponde a una resa di circa l'1% in peso secco. Gli inositoli, compreso il D-pinitolo, stanno ricevendo particolare attenzione per i loro effetti benefici sulla salute dell'uomo, soprattutto antidiabetici e insulino-mimetici (Lambert, 2018; Bañuls et al., 2015; Gao et al., 2015; Sethi et al., 2008), come ampiamente discusso precedentemente. Pertanto c'è un crescente interesse nel ricercare nuove fonti naturali, preferibilmente a basso costo, di questi composti per poter sfruttare le loro attività biologiche.

Per questo motivo abbiamo valutato il possibile impiego dell'estratto GGLME come importante fonte di inositoli, riciclando un materiale di scarto della produzione della liquirizia, per ottenere una fonte economica di molecole bioattive.

Sono stati effettuati degli studi preliminari, per poter valutare l'attività antiossidante / radical scavenging del nostro estratto e sono stati presi in considerazione quattro diversi test semplici *in vitro* (DPPH test, TEAC test, FRAP test, ORAC test) basati su differenti meccanismi redox, questo perché un singolo test può riflettere solo la reattività chimica dell'antiossidante nelle condizioni specifiche applicate (differente solvente o pH dell'ambiente di reazione).

Tra questi test, l'ORAC è un test basato sulla reazione di trasferimento di atomi di

idrogeno (HAT) questo test generalmente non è adatto per misurare antiossidanti liposolubili.

Quindi, abbiamo utilizzato i saggi TEAC e DPPH che di solito sono classificati come reazioni ET (trasferimento elettronico) sebbene i due radicali impiegati possano essere neutralizzati mediante riduzione diretta tramite ET o mediante trasferimento di atomi di H., il test TEAC può essere utilizzato per evidenziare antiossidanti idrosolubili e liposolubili invece per quanto riguarda il DPPH test si evidenzia in particolare l'attività di molecole solubili in solventi organici.

Principio differente per il FRAP test che si basa sulla capacità dei vari antiossidanti di ridurre il complesso di Fe (III) 2,4,6- tripiridil-s-triazina (anche indicato come [Fe (III)- (TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup>) a Fe (II), [Fe (II)-(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> a pH 3.6. Tale reazione viene sfruttata per investigare prevalentemente tutti quei composti che presentano un potenziale redox più basso di 0.7 V che è il valore del potenziale redox della coppia [Fe (III)- (TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup>/[Fe (II)- (TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>. Lo svantaggio di tale metodo è che il valore della capacità antiossidante può risultare sistematicamente maggiore se nel campione analizzato sono presenti composti che non appartengono alla famiglia degli antiossidanti, il cui potenziale di riduzione è inferiore a quello della coppia redox Fe (III)/Fe (II). Nonostante tutto, il test risulta essere facile, veloce, economico e comunque ci fornisce informazioni di antiossidanti che possono reagire in un ambiente acido.

Infine, è stato utilizzato il metodo dello bleaching del β-carotene (BCB), il quale si basa sulla perdita del colore giallo del β-carotene dovuto alla sua reazione con i radicali che si formano dall'ossidazione dell'acido linolenico (perossidazione lipidica); Il test BCB ci permette di valutare la capacità di un composto di agire come un antiossidante 'chain-breaking' nel processo di perossidazione lipidica, ottenuta, in questo test, per riscaldamento. A differenza di tutti gli altri test, il test BCB viene eseguito in un sistema eterogeneo (emulsione), la presenza di due fasi, una idrofila e una idrofobica, potrebbe limitare il potere antiossidante di composti che non possono raggiungere la fase organica (dove avviene la lipoperossidazione).

Tutti insieme i risultati ci permettono di avere un quadro chiaro del comportamento antiossidante del fitocomplesso in relazione ai composti in esso contenuto.

Poiché i saggi di cui sopra rappresentano fonti di radicali "non fisiologiche", sono stati effettuati altri saggi per valutare le proprietà antiossidanti dell'estratto in esame, considerando specie reattive fisiologiche dell'ossigeno ( $O_2^-$ ) in particolare il test dell'attività SOD (superossido dismutasi) mimetica, che si basa sulla riduzione del nitroblue di tetrazolio determinata dall'anione superossido ( $O_2^-$ ). Questo saggio ci permette di comprendere anche la possibile attività antinfiammatoria del campione in esame. Infatti, l'anione superossido  $O_2^-$  è la principale specie reattiva dell'ossigeno e gioca un ruolo fondamentale nell'infiammazione; l'enzima SOD neutralizza l' $O_2^-$  trasformandolo in perossido di idrogeno, prevenendo così la formazione di composti altamente aggressivi come il perossinitrito e il radicale idrossile.

Infine, per valutare l'attività antiossidante dell'estratto in studio nei confronti di HClO abbiamo valutato l'inibizione della degradazione dell'albumina sierica bovina (BSA) indotta da HClO.

In tutti i test l'estratto ha evidenziato una buona capacità antiossidante radical scavenging paragonabile agli standard di riferimento utilizzati.

Considerando i risultati ottenuti e le caratteristiche di ogni test si evidenzia una buona attività per i test DPPH, FRAP, TEAC, minore rispetto all'ORAC test nel quale probabilmente i composti più polari, ampiamente presenti nell'estratto (flavoni e flavonoli), possono espletare meglio l'azione antiossidante in questo ambiente di reazione.

Anche per l'attività SOD mimetica si evidenzia una buona azione scavenger nei riguardi dell'anione superossido indice del fatto che sono presenti in esso molecole con una potenziale attività antinfiammatoria come accennato la classe dei flavanoni (pinocembrina, licoflavanone). L'azione protettiva dell'estratto si evidenzia anche nel test dell'inibizione della degradazione della BSA indotta da HClO in cui l'estratto possiede un'attività simile al trolox nota molecola con attività antiossidante.

Una volta ottenuti questi dati preliminari, abbiamo valutato il potenziale effetto



protettivo di GGLME nei confronti dell'inflammazione ed insulino-resistenza indotta da elevate concentrazioni di PA in adipociti, utilizzando lo stesso modello sperimentale precedentemente impiegato nello studio sull'estratto ACN.

I nostri dati dimostrano, per la prima volta, che il pretrattamento con GGLME ha inibito la via proinflammatoria di NF- $\kappa$ B, indotta da PA, in modo dose-dipendente. La maggiore concentrazione testata di GGLME (80  $\mu$ g/mL) ha ripristinato i valori di IKK e NF- $\kappa$ B riportandoli a quelli del controllo. Inoltre, i nostri dati evidenziano che mentre l'acido palmitico ha causato insulino-resistenza, dimostrata dall'inibizione del pathway di PI3K/Akt e dell'espressione di GLUT-1, il GGLME ha ripristinato il pathway dell'insulina. Inoltre i dati ci hanno permesso di osservare che l'effetto ottenuto con la concentrazione di GGLME 40  $\mu$ g/mL [contenente 40  $\mu$ M (7,8  $\mu$ g/mL) di D-pinitolo] è paragonabile a quello del D-pinitolo 40  $\mu$ M e ciò lascia ipotizzare che il contenuto di questo inositolo influenza prevalentemente l'attività antiinflammatoria e insulino-sensibilizzante dimostrata. Inoltre l'estratto GGLME, così come il D-pinitolo, ha indotto la via dell'insulina, anche in assenza di PA, con valori superiori al controllo esposto ad insulina dimostrando quindi un effetto insulino-mimetico.

I risultati ottenuti sugli adipociti sono stati confermati anche su un altro modello sperimentale che impiega le cellule endoteliali HUVEC esposte ad alte concentrazioni di PA (Fratantonio et al., 2015). L'esposizione delle cellule HUVEC a PA ha indotto un'alterazione del pathway insulinico PI3K/Akt, riducendo così la fosforilazione di eNOS e quindi la produzione di NO. A livello endoteliale infatti l'insulina regola il principale meccanismo dell'omeostasi del tono vascolare attraverso il rilascio di NO, il principale vasodilatatore di origine endoteliale e l'endotelina-1 (ET-1), un potente vasocostrittore (Fratantonio et al., 2017). I dati ottenuti pretrattando le cellule HUVEC con il GGLME dimostrano che l'estratto in esame è stato in grado di ripristinare la sensibilità all'insulina, alterata dal PA, aumentando a valle i livelli di eNOS. Gli effetti benefici del D-pinitolo sul sistema vascolare erano stati in parte dimostrati in un modello *in vivo* nei topi C57BL/6 nei quali il D-pinitolo esercitava un effetto ipotensivo, misurando la vasodilatazione dell'arteria mesenterica, mediato da NO

(Moreira et al., 2018). I nostri dati forniscono il supporto meccanicistico agli effetti osservati *in vivo*.

Anche nelle cellule endoteliali, i dati confermano in maniera univoca che l'effetto esercitato dal GGLME 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  è sovrapponibile a quello del D-pinitolo 40  $\mu\text{M}$  (7,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) supportando ulteriormente l'importante ruolo del D-pinitolo contenuto nell'estratto. Inoltre, sia l'estratto che il D-pinitolo inducono l'asse PI3K/Akt/eNOS anche in assenza di PA confermando l'effetto insulino-mimetico, già dimostrato negli adipociti.

Questi risultati trovano supporto dalla letteratura che riporta marcate attività insulino-mimetiche degli inositoli sia in studi *in vivo* che *in vitro* (Bevilacqua e Bizzarri, 2018). Sebbene i meccanismi coinvolti nell'attività insulino-sensibilizzante non sono stati ad oggi chiariti, i nostri dati supportano il coinvolgimento della via di segnale PI3K/Akt attivata dalla fosforilazione di IRS-1(Tyr) negli effetti osservati.

Tuttavia, il GGLME è ricco anche di altri metaboliti secondari, in particolare flavonoidi, diidrostilbeni e flavoni. Questi composti sono noti per le loro attività biologiche utili nelle malattie metaboliche come già descritto (Dragan et al., 2015).

Pertanto, sulla base dei dati presenti in letteratura, non è possibile escludere che l'effetto protettivo di GGLME, osservato nei confronti dell'infiammazione e dell'insulino-resistenza indotte da PA, sia parzialmente dovuto ai composti polifenolici in esso contenuti. Quindi un'interazione sinergica tra i componenti bioattivi di questo estratto (D-pinitolo e polifenoli) può contribuire a migliorare, anche in modo significativo, l'efficacia protettiva dell'estratto nella sua interezza.

## **Conclusioni**

In conclusione possiamo affermare che nei nostri studi, l'estratto ACN ha mostrato un effetto protettivo nei confronti dell'infiammazione ed insulino-resistenza negli adipociti e visti i risultati ottenuti, l'estratto potrebbe coadiuvare altre terapie nella prevenzione dell'infiammazione e insulino-resistenza legate all'obesità.

In maniera analoga all'estratto ACN, anche l'estratto metanolico di foglie di *Glycyrrhiza glabra*, ricco in D-pinitolo, ha mostrato un effetto protettivo nei confronti dell'infiammazione e insulino-resistenza negli adipociti. Inoltre, GGLME ha mostrato un effetto protettivo anche nei confronti delle disfunzioni endoteliali legate all'insulino-resistenza causate da lipotossicità. Questo effetto, probabilmente, è dovuto alle proprietà insulino-sensibilizzanti del D-pinitolo, ma anche alla presenza di composti polifenolici che possono svolgere un ruolo sinergico. In conclusione, GGLME potrebbe rappresentare una risorsa, anche relativamente economica, utile per la prevenzione ed il trattamento dei disturbi metabolici.

Ulteriori studi *in vivo* sono necessari per chiarire e confermare l'efficacia di questi estratti vegetali nella prevenzione di condizioni patologiche legate alla sindrome metabolica.

**Ringraziamenti:**

*Ringrazio tutto il gruppo di ricerca coordinato dalla prof.ssa Antonella Saija, con cui ho avuto l'opportunità e il piacere di lavorare in questi tre anni di Dottorato; un percorso che mi ha portata a crescere personalmente e mi ha arricchita professionalmente.*

*In particolare:*

*ringrazio il mio tutor, la prof.ssa Mariateresa Cristani, la quale mi ha guidata e supportata durante questo importante percorso.*

*Ringrazio le mie colleghe, Romina, Sofia e Claudia per la collaborazione e con le quali ho anche condiviso momenti di spensieratezza.*

*E infine, ma non in ordine di importanza, un ringraziamento particolare va ai miei familiari che mi hanno sempre sostenuta.*

## Bibliografia

- Adeva-Andany M., Martínez-Rodríguez J., Gonzalez-Lucan M., Fernandez-Fernandez C., Castro-Quintela E. **Insulin resistance is a cardiovascular risk factor in humans.** *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical research & Reviews* 13 1449-1455, **2019.**
- Abranches M.V., Esteves de Oliveira F.C., Lopes da Conceicao L. and Peluzo M. **Obesity and diabetes: the link between adipose tissue dysfunction and glucose homeostasis.** *Nutrition Research Reviews*, 28, 121-132, **2015.**
- Ahn CH, Hossain MA, Lee E et al. **Increased salt and drought tolerance by D-pinitol production in transgenic *Arabidopsis thaliana*.** *Biochem Biophys Res Commun* 504:315–320, **2018.**
- Akimoto T, Pohnert SC, Li P., Zhang M., Gumbs C., Rosenberg P.B., Williams R.S., Yan Z. **Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway.** *J Biol Chem* 280:19587–19593, **2005.**
- Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. **Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.** *Biochem. J.* 357 593–615, **2001.**
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB and Cohen P. **Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha.** *Curr. Biol.*, 7, 261–269, 1997.
- Altaf Q. A., Barnett, A.H., Tahrani A.A. **Novel therapeutics for type 2 diabetes: Insulin resistance.** *Diabetes Obes. Metab.* 17, 319–334, **2015.**
- Antonowski T., Osowski A., Lahuta L., Górecki R., Rynkiewicz A. and Wojtkiewicz J. **Health-Promoting Properties of Selected Cyclitols for Metabolic Syndrome and Diabetes.** *Nutrients* 11(10), 2314; **2019.**
- Anwar S., Fratantonio D., Ferrari D., Saija A., Cimino F. & Speciale A. **Berry anthocyanins reduce proliferation of human colorectal carcinoma cells by inducing caspase-3 activation and p21 upregulation.** *Molecular Medicine Reports*, 14(2), 1397–1403, **2016.**
- Arjumand, W.; Sultana, S. **Glycyrrhizic acid: a phyto chemical with a protective role against cisplatin-induced genotoxicity and nephrotoxicity.** *Life Sci.* 89, 422–429, **2011.**
- Ashwell M., Mayhew L., Richardson J., Rickayzen B. **Waist-to-Height Ratio Is More Predictive of Years of Life Lost than Body Mass Index.** *Plos One* volume 9, Issue 9 e103483, **2014.**
- Atilla E. **The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome.** *Obesity and Lipotoxicity*, 1-17, **2017.**
- Azhar Rasul, Faya Martin Millimouno, Wafa Ali Eltayb, Muhammad Ali, Jiang Li,

- and Xiaomeng Li. **Pinocembrin: A Novel Natural Compound with Versatile Pharmacological and Biological Activities.** *BioMed Research International*, 9, 2013.
- Banaszewski, K., Park, E., Edirisinghe, I., Cappozzo JC, Burton- Freeman BM. **A pilot study to investigate bioavailability of strawberry anthocyanins and characterize postprandial plasma polyphenols by Q-TOF LC/MS in humans.** *J. Berry Res.* 3, 113–126, 2013.
  - Banuls C, Rovira-Llopis S, Falcon R., Veses S., Monzò N., Víctor M. V., Rocha M., Hernandez-Mijares A. **Chronic consumption of an inositol-enriched carob extract improves postprandial glycaemia and insulin sensitivity in healthy subjects: a randomized controlled trial.** *Clin Nutr* 35:600–607, 2015.
  - Barroso I., Gurnell M, Crowley VE, Agostini M., Schwabek J. W., Soos M. A., LI Maslen G. Williams T. D. M., Lewis H., Schafer A. J., Chatterjee V. K. K. & O'Rahilly S. **Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension.** *Nature* 402:880–3, 1999.
  - Basu, A., Du, M., Leyva, M.J., Sanchez K, Betts NM, Wu M, Aston CE, Lyons TJ. **Blueberries decrease cardiovascular risk factors in obese men and women with metabolic syndrome.** *J. Nutr.* 140 (9), 1582– 1587, 2010a.
  - Basu A., Fu, D.X., Wilkinson M., Simmons B, Wu M, Betts NM, Du M, Lyons TJ. **Strawberries decrease atherosclerotic markers in subjects with metabolic syndrome.** *Nutr. Res.* 30 (7), 462–469, 2010b.
  - Basu, A., Nguyen, A., Betts, N.M., Lyons TJ. **Strawberry as a functional food: an evidence-based review.** *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54 (6), 790–806, 2014.
  - Bates, S.H.; Jones, R.B.; Bailey, C.J. **Insulin-like effect of pinitol.** *Br. J. Pharmacol.* 130, 1944–1948, 2000.
  - Batiha G.ES., Beshbishy A.M., El-Mleeh A., Mohamed M., Daim A. and Devkota H.P. **Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, and Pharmacological and Toxicological Activities of *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae).** *Biomolecules* 10, 352, 2020.
  - Belfiore A., Malaguarnera R., Vella V., Lawrence M. C., Sciacca L., Frasca F., Morrione A., Vigneri R. **Endocr Insulin Receptor Isoforms in Physiology and Disease: An Updated View.** *Rev.* 1;38(5):379-431, 2017.
  - Belwal T., Nabavi S.F., Nabavi S.M., and Habtemariam S. **Dietary Anthocyanins and Insulin Resistance: When Food Becomes a Medicine.** *Nutrients* 9(10), 1111, 2017.
  - Bevilacqua A. and Bizzarri M. **Inositols in Insulin Signaling and Glucose Metabolism.** *International Journal of Endocrinology*, 8, 2018.
  - Blumberg, J.B., Camesano, T.A., Cassidy, A., Kris-Etherton P, Howell A, Manach C,

- Ostertag LM, Sies H, Skulas-Ray A, Vita JA. **Cranberries and their bioactive constituents in human health.** *Adv. Nutr.* 4 (6),618–632, **2013.**
- Blume-Jensen, P., & Hunter, T. **Oncogenic kinase signaling.** *Nature* 411, 355– 365, **2001.**
  - Biondi DM, Rocco C, Ruberto G. **New Dihydrostilbene derivatives from the leaves of *Glycyrrhiza glabra* and evaluation of their antioxidant activity.** *J Nat Prod* 66:477-80, **2003.**
  - Biondi DM, Rocco C, Ruberto G. **Dihydrostilbene derivatives from *Glycyrrhiza glabra* leaves.** *J Nat Prod* 68: 1099-102, **2005.**
  - Bizzarri M., Fusco A., Dinicola S., Cucina A., Bevilacqua A. **Pharmacodynamics and pharmacokinetics of inositol(s) in health and disease.** *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*, 12(10):1181-96, **2016.**
  - Boles A. Kandimalla R., Reddy P. H. **Dynamics of diabetes and obesity: Epidemiological perspective.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1863, 1026-1036, **2017.**
  - Bradford, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254, **1976.**
  - Buenger J., Ackermann H., Jentzsch A., Mehling A., Pfitzner I., Reiffen K. A., Schroeder K. R., Wollenweber U. **An interlaboratory comparison of methods used to assess antioxidant potentials.** *Int. J. Cosmet. Sci.* 28 (2), 135e146, **2006.**
  - Burgering B., Coffey P. J. **Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction.** *Nature* 376, 599– 602, **1995.**
  - Burton-Freeman, B. **Postprandial metabolic events and fruit-derived phenolics: a review of the science.** *Br. J. Nutr.* 104 (Suppl.3), S1–14, **2010.**
  - Cassidy, A., O'Reilly E.J., Kay C., Sampson L, Franz M, Forman JP, Curhan G, Rimm EB. **Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults.** *Am. J. Clin.Nutr.* 93 (2), 338–347, **2011.**
  - Cassidy A., Mukamal K.J., Liu L., Franz M, Eliassen AH, Rimm EB. **High anthocyanin intake is associated with a reduced risk of myocardial infarction in young and middle-aged women.** *Circulation* 127 (2),188–196, **2013.**
  - Cassidy A., Huang, T., Rice M.S., Rimm EB, Tworoger SS. **Intake of dietary flavonoids and risk of epithelial ovarian cancer.** *Am. J. Clin. Nutr.* 100(5), 1344–1351, **2014.**
  - Chaubal R, Pawar PV, Hebbalkar GD, Tungikar VB, Puranik VG, Deshpande VH, Deshpande NR. **Larvicidal activity of *Acacia nilotica* extracts and isolation of D- pinitol: a bioactive carbohydrate.** *Chem Biodivers* 2:684–688, **2005.**

- Chen J, Dai GH. **Effect of D-pinitol isolated and identified from Robinia pseudoacacia against cucumber powdery mildew.** *Sci Hortic* 176:38–44, **2014**.
- Cheng J.Q., Lindsley CW, Cheng GZ, Yang H, Nicosia SV. **The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery.** *Oncogene*, Review 24(50):7482-92, **2005**.
- Cheng F., Han L., Xiao Y., Pan C., Li Y., Ge X., Zhang Y., Yan S. and Wang M. **D-chiro-Inositol Ameliorates High Fat Diet-Induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance via PKC $\epsilon$ -PI3K/AKT Pathway.** *J Agric. Food Chem* 67, 5957-5967, **2019**.
- Christou C, Poulli E, Yiannopoulos S., Agapiou A. **GC–MS analysis of D-pinitol in carob: syrup and fruit (flesh and seed).** *J Chromatogr B* 1116:60–64, **2019**.
- Choi J., Kang M., Kim J.H., Cho J., Kim G.H., Yoo H.W. **Identification and Functional Characterization of Two Novel Nonsense Mutations in the  $\beta$ -Subunit of *INSR* That Cause Severe Insulin Resistance Syndrome.** *Horm Res Paediatr*, 84; 73-78, **2015**.
- Chooi Y. C., Ding C., Magkos F. **The epidemiology of obesity.** *Metabolism Clinical and Experimental* 92, 6-10, **2019**.
- Condorelli R., La Vignera S., Mongioi L., Vitale S., Lagana A., Cimino L., Calogero A. **Myo-inositol as a male fertility molecule: Speed them up!.** *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci* 21 (Suppl. 2), 30–35, **2017**.
- Croze M.L. and Soulage C.O. **Potential role and therapeutic inter- ests of myo-inositol in metabolic diseases.** *Biochimie*, 95 (10), 1811–1827, **2013**.
- Czech M.P., **Mechanisms of insulin resistance related to white, beige, and brown adipocytes.** *Mol Metab*, 34:27-42; January **2020**.
- Dahan S., Roda G., Pinn D., Roth-Walter F., Kamalu O., Martin A. P. and Mayer L. **Epithelial: lamina propria lymphocyte interactions promote epithelial cell differentiation.** *Gastroenterology* 134:192–203, **2008**.
- Dastagir G., Rizvi M.A. **Review – *Glycyrrhiza glabra* L. (Liquorice).** *Park J Pharm Sci* 29(5), 1727-1733, **2016**.
- Datta S. R., Dudek H., Tao X., Master S., Fu H., Gotoh Y. & Greenberg M. E. **Akt phosphorylation of BAD couple survival signals to the cell-intrinsic death machinery.** *Cell* 91, 231–241, **1997**.
- Datta S. R., Brunet A. & Greenberg M. E. **Cellular survival: a play in three Akts.** *Genes Dev* 13, 2905–2927, **1999**.
- Dávalos A, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. **“Extending Applicability of the Oxygen Radical Adsorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay”.** *Journal of agriculture and food chemistry*, 52, 48-56, **2004**.



- Dehimi K., Speciale A., Saija A., Dahamna S., Raciti R., Cimino F., Cristani M. **Antioxidant and Anti-inflammatory Properties of Algerian *Thymelaea microphylla* Coss. and Dur. Extracts.** *Pharmacogn Mag.* 12(47):203-10, **2016.**
- Dehpour AR. **The protective effect of licorice components and their derivatives against gastric ulcer induced by aspirin in rats.** *J Pharm Pharmacol.* 46: 148-152, **1994.**
- Di Paola R., Menegazzi M., Mazzon E., Genovese T., Crisafulli C., Dal Bosco M., Zou Z., Suzuki H., Cuzzocrea S. **Protective effects of glycyrrhizin in a gut hypoxia (ischemia)-reoxygenation (reperfusion) model.** *Intensive Care Med.* 35, 687–697, **2009.**
- Doi SA, Towers PA, Scott CJ, Al-Shoumer KA. **PCOS: an ovarian disorder that leads to dysregulation in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis ?.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 118:4–16, **2005.**
- Duke JA. **Handbook of Medicinal Herbs.** Boca Raton, FL: CRC Press; **1985.**
- Dumschott K, Dechorgnat J, Merchant A. **Water deficit elicits a transcriptional response of genes governing D- pinitol biosynthesis in soybean (*Glycine max*).** *Int J Mol Sci* 20:2411–2422, **2019.**
- Dragan S., Andrica F., Serban MC., Timar R. **Polyphenols-rich natural products for treatment of diabetes.** *Current medicinal chemistry*, 22 (1), 14–22, **2015.**
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. **The metabolic syndrome.** *Lancet* 365:1415–28, **2005.**
- Edirisinghe I., Burton-Freeman B., Varelis P., Kappagoda T. **Strawberry extract caused endothelium-dependent relaxation through the activation of PI3 kinase/Akt.** *J. Agric. Food Chem.* 56 (20), 9383–9390, **2008.**
- Edirisinghe I., Banaszewski K., Cappozzo J., McCarthy D., Burton- Freeman BM. **Effect of black currant anthocyanins on the activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in vitro in human endothelial cells.** *J.Agric. Food Chem.* 59 (16), 8616–8624, **2011a.**
- Edirisinghe I., Banaszewski K., Cappozzo, J., Sandhya K, Ellis CL, Tadapaneni R, Kappagoda CT, Burton-Freeman BM. **Strawberry anthocyanin and its association with postprandial inflammation and insulin.** *Br. J. Nutr.* 106 (6), 913–922, **2011b.**
- Edirisinghe I., Burton-Freeman B. **Aging associated endothelial function: role of oxidative stress, inflammation and western diet.** *J. Nutr. Aging* 2 (4), 197–212, **2014.**
- Erlund I., Koli R., Alfthan G., Marniemi J., Puukka P., Mustonen P., Mattila P., Jula A. **Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol.** *Am. J. Clin. Nutr.* 87 (2), 323–331, **2008.**
- Evan G. I., & Vousden K. H. **Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer.** *Nature* 411, 342– 348, **2001.**

- Farooq A. and Zhou M. M. **Structure and regulation of MAPK phosphatases.** *Cell. Signalling* 16, 769-779, **2004.**
- Fenwick G.R., Lutomski J., Nieman C. **Liquorice, *Glycyrrhiza glabra* L. composition, uses and analysis.** *Food chemistry*, 38 (2), 119–143, **1990.**
- Ferrari D., Speciale A., Cristani M., Fratantonio D., Molonia M. S., Ranaldi G., ... Cimino, F. **Cyanidin-3-O-glucoside inhibits NF- $\kappa$ B signalling in intestinal epithelial cells exposed to TNF- $\alpha$  and exerts protective effects via Nrf2 pathway activation.** *Toxicology Letters*, 264, 51–58, **2016.**
- Fiore C., Eisenhut M., Krausse R., Ragazzi E., Pellati D., Armanini D., Bielenberg J. **Antiviral effects of Glycyrrhiza species.** *Phytother. Res.* 22, 141–148, **2008.**
- Fonteles M., Almeida M., Lerner J. **Antihyperglycemic effects of 3-o-methyl-d-chiro-inositol and d-chiro-inositol associated with manganese in streptozotocin diabetic rats.** *Horm. Metab. Res.* 32, 129–132, **2000.**
- Forester S.C., Waterhouse A.L. **Gut metabolites of anthocyanins, gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde, inhibit cell proliferation of Caco-2 cells.** *J. Agric. Food Chem.* 58 (9), 5320–5327, **2010.**
- Forester S.C., Choy Y.Y., Waterhouse A.L., Oteiza PI. **The anthocyanin metabolites gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6- trihydroxybenzaldehyde decrease human colon cancer cell viability by regulating pro-oncogenic signals.** *Mol. Carcinog.* 53 (6), 432–43, **2014.**
- Fratantonio D., Speciale A., Ferrari D., Cristani M., Saija A., Cimino F. **Palmitate-induced endothelial dysfunction is attenuated by cyanidin-3-O-glucoside through modulation of Nrf2/ Bach1 and NF- $\kappa$ B pathways.** *Toxicology letters*, 239 (3), 152–160, **2015.**
- Fratantonio D., Cimino F., Molonia MS., Ferrari D., Saija A., Virgili F., Speciale A. **Cyanidin-3-O-glucoside ameliorates palmitate-induced insulin resistance by modulating IRS-1 phosphorylation and release of endothelial derived vasoactive factors.** *Biochimica et biophysica acta (BBA) - molecular and cell biology of lipids*, 1862 (3), 351–357, **2017.**
- Frattaruolo L., Carullo G., Brindisi M., Mazzotta S., Bellissimo L., Rago V., Curcio R., Dolce V., Aiello F. and Cappello A.R. **Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Flavanones from *Glycyrrhiza glabra* L. (licorice) Leaf Phytocomplexes: Identification of Licoflavanone as a Modulator of NF- $\kappa$ B/MAPK Pathway.** *Antioxidants* 8, 186, **2019.**
- Frech M., Andjelkovic M., Ingley E., Reddy K.K., Falck J.R., Hemmings B.A. **High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the Pleckstrin homology domain**

- of RAC protein kinase B and their influence on kinase activity.** *J. Biol. Chem.* 272 8474–8481, **1997**.
- Fukui H., Goto K., Tabata M. **Two antimicrobial flavanones from the leaves of *Glycyrrhiza glabra*.** *Chem Pharmacol Bull* 36:4174-6, **1998**.
  - Garg A. **Acquired and inherited lipodystrophies.** *N Engl J Med* 350: 1220–34, **2004**.
  - Gateva A., Unfer V., Kamenov Z. **The use of inositol(s) isomers in the management of polycystic ovary syndrome: a comprehensive review.** *Gynecological endocrinology*, 34 (7), 545–550, **2018**.
  - Gerli S., Mignosa M., Di Renzo G. **Effects of inositol on ovarian function and metabolic factors in women with PCOS: A randomized double blind placebo-controlled trial.** *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 6, 151–159, **2003**.
  - Ghosh D., Konishi T. **Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function.** *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 16 (2), 200–208, **2007**.
  - Gluvic Z., Zaric B., Resanovic I., Obradovic M., Mitrovic A., Radak D., Isenovic E.R. **Link between Metabolic Syndrome and Insulin Resistance.** *Curr Vasc Pharmacol.* 15(1):30-39, **2017**.
  - González-Mauraza NH, Leon-González AJ, Espartero JL., Gallego-Fernández J.B., Sánchez-Hidalgo M., Martín-Cordero C. **Isolation and quantification of pinitol, a bioactive cyclitol, in *Retama* spp.** *Nat Prod Commun* 11:405–406, **2016**.
  - Gonzalez-Barrio, R., Borges, G., Mullen, W., Crozier A. **Bioavailability of anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with an ileostomy.** *J. Agric. Food Chem.* 58 (7), 3933–3939, **2010**.
  - Grundy SM, Brewer Jr HB, Cleeman JI, Smith Jr SC, Lenfant C. **Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition.** *Circulation* 109:433–8, **2004**.
  - Gual P., Le Marchand-Brustel Y. and Tanti J. F. **Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation.** *Biochimie* 87, 99–109, **2005**.
  - Guo X.D., Zhang DY., Gao XJ., Parry J., Liu K., Liu BL., Wang M. **Quercetin and quercetin-3-O-glucuronide are equally effective in ameliorating endothelial insulin resistance through inhibition of reactive oxygen species-associated inflammation.** *Molecular nutrition & food research*, 57 (6), 1037–1045, **2013**.

- Haleagrahara, N.; Varkkey, J.; Chakravarthi, S. **Cardioprotective effects of glycyrrhizic acid against isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats.** *Int. J. Mol. Sci.* 12, 7100–7113, **2011.**
- Hanada M., Feng J. **Hemmings Structure, regulation and function of PKB/AKT—a major therapeutic target.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1697 3 – 16, **2004.**
- Harris T.K. **PDK1 and PKB/Akt: Ideal Targets for Development of New Strategies to Structure-Based Drug Design.** *Life*, 55(3): 117–126, **2003.**
- Hayashi H, Yasuma M, Hiraoka N, Ikeshiro Y, Yamamoto H, Yesilada E, Sezik E, Honda G, Tabata M. **Flavonoid variation in the leaves of *Glycyrrhiza glabra*.** *Phytochemistry* 42:701-4, **1996.**
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. **Regulation of NF- $\kappa$ B by TNF family cytokines.** *Seminars in Immunology*, 26(3), 253–266, **2014.**
- He J., Giusti M.M. **Anthocyanins: natural colorants with healthpromoting properties.** *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 1, 163–187, **2010.**
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L., Gorgun CZ., Uysal K.T., Maeda K., Karin M. & Hotamisligil G.S. **A central role for JNK in obesity and insulin resistance.** *Nature.* 420:333–336, **2002.**
- Hotamisligil G.S., Shargill N.S., Spiegelman B.M. **Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance.** *Science* vol. 259, Issue 5091, pp. 87-91, **1993.**
- Hotamisligil G.S., Arner P., Caro J.F., Atkinson R.L. and Spiegelman B.M. **Increased Adipose Tissue Expression of Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$  in Human Obesity and Insulin Resistance.** *J Clin Invest*, 2409-2415, **1995.**
- Hotamisligil G.S. **Mechanism of TNF-  $\alpha$ -induced insulin resistance.** *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 107(2): 119-125, **1999.**
- Hua TC., Liu, BL. **Freeze-Drying of Pharmaceutical and Food Products, Chapter 2 Fundamentals of Freeze Drying.** *Woodhead Publishing*, 18–67, **2010.**
- Janus A., Szahidewicz-Krupska E., Mazur G. and Doroszko A. **Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction Constitute a Common Therapeutic Target in Cardiometabolic Disorders.** *Mediators of Inflammation*, 10, **2016.**
- Jennings A., Welch A. A., Spector T., Macgregor A., & Cassidy A. **Intakes of anthocyanins and flavones are associated with biomarkers of insulin resistance and inflammation in women.** *The Journal of Nutrition*, 144(2), 202–208, **2014.**
- Jeong S., Son Y., Lee JH., Cheong YK., Park S.H., Chung HT., Pae HO. **Resveratrol analog**

- piceatannol restores the palmitic acid-induced impairment of insulin signaling and production of endothelial nitric oxide via activation of anti-inflammatory and antioxidative heme oxygenase-1 in human endothelial cells.** *Molecular Medicine Reports*, vol 12, Issue 1, pp. 937-944, **2015**.
- Jianping Ye. **Mechanism of insulin resistance in obesity.** *Front Med*; 7(1): 14-24, **2013**.
  - Joseph S.V., Edirisinghe, I., Burton-Freeman, B.M. **Berries: antiinflammatory effects in humans.** *J. Agric. Food Chem.* 62 (18),3886– 3903, **2014**.
  - Kahn SE, McCulloch DK, Porte D. **Insulin secretion in the normal and diabetic human.** In: Alberti KGMM, Zimmet P, Defronzo RA, editors & Keen H, (hon) editor. *International Textbook of Diabetes Mellitus; (2<sup>nd</sup> ed) John Wiley & Sons*; p. 337–54, **1997**.
  - Kaku K., Osada H., Seki K., Sekiya S. **Insulin-like growth factor 2 (IGF-2) and IGF2 receptor gene variants are associated with fetal growth.** *Acta Paediatr*; 96(3): 363-7, **2007**.
  - Kang, M.J.; Kim, J.I.; Yoon, S.Y.; Kim, J.C.; Cha, I.J. **Pinitol from soybeans reduces postprandial blood glucose in patients with type 2 diabetes mellitus.** *J. Med. Food.* 9, 182–186, **2006**.
  - Kashilov I.K., Nurmukhamedov T.D. and Azimov M.M. **in: Problems in Pharmacology and Toxicology.** *A. Collection of Papers* [in russian], FAN, Tashkent pp. 66-68, **1975**.
  - Kawa, J.M.; Taylor, C.G.; Przybylski, R. **Buckwheat concentrate reduces serum glucose in streptozotocin-diabetic rats.** *J. Agric. Food Chem.* 51, 7287–7291, **2003**.
  - Kile BT, Schulman BA, Alexander WS, Nicola NA, Martin HM. Hilton DJ. **The SOCS box: a tale of destruction and degradation.** *Trends Biochem Sci* 27:235–41, **2002**.
  - Kim J.I., Kim J.C., Kang, M.J., Lee M.S., Kim J.J., Cha I.J. **Effects of pinitol isolated from soybeans on glycaemic control and cardiovascular risk factors in Korean patients with type II diabetes mellitus: A randomized controlled study.** *Eur. J. Clin. Nutr.* 59, 456–458, **2005**.
  - Kim H.J., Park K.S., Lee S.K., Min K.W., Han K.A., Kim Y.K., Ku B.J. **Effects of pinitol on glycemic control, insulin resistance and adipocytokine levels in patients with type 2 diabetes mellitus.** *Annals of nutrition and metabolism*, 60 (1), 1–5, **2012**.
  - Kitamura T., Kitamura Y., Kuroda S., Hino Y., Ando M., Kotani K., Konishi H., Matsuzaki H., Kikkawa U., Ogawa W., Kasuga M. **Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt.** *Mol. Cell. Biol.* 19, 6286– 6296, **1999**.
  - Krishnan HB, Natarajan SS, Bennett JO, Sicher RC. **Protein and metabolite composition of xylem sap from field-grown soybeans (*Glycine max*).** *Planta* 233:921–931, **2011**.

- Kurimoto, Y., Shibayama, Y., Inoue, S., Soga M, Takikawa M, Ito C, Nanba F, Yoshida T, Yamashita Y, Ashida H, Tsuda T. **Black soybean seed coat extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via the activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice.** *J.Agric. Food Chem.* 61 (23), 5558–5564, **2013**.
- Laganà A.S., Garzon S., Casarin J., Franchi M., Ghezzi F. **Inositol in polycystic ovary syndrome: restoring fertility through a pathophysiology-based approach.** *Trends in endocrinology & metabolism*, 29 (11), 768–780, **2018**.
- Lahuta LB, Szablin' ska J, Ciak M, Go' recki RJ. **The occurrence and accumulation of D-pinitol in fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.).** *Acta Physiol Plant*, 4:155–166, **2018**.
- Lambert C., Cubedo J., Padró T., Vilahur G., López-Bernal S., Rocha M., Hernández-Mijares A. and Badimon L. **Effects of a Carob-Pod-Derived Sweetener on Glucose Metabolism.** *Nutrients* 10, 271, **2018**.
- Lan Xi, Wang W., Li Q. and Wang J. **The Natural Flavonoid Pinocembrin: Molecular Targets and Potential Therapeutic Applications.** *Molecular Neurobiology* 53, 1794-1801, **2016**.
- Larner, J. **D-Chiro-Inositol—Its functional role in insulin action and its deficit in insulin resistance.** *Int. J. Exp. Diab. Res.* **2002**, 3, 47–60.
- Lazarenko, R.; Geisler, J.; Bayliss, D.; Larner, J.; Li, C. **D-chiro-inositol glycan stimulates insulin secretion in pancreatic  $\beta$  cells.** *Mol. Cell. Endocrinol.* 387, 1–7, **2014**.
- Lee J. and Pilch P.F. **The insulin receptor: structure, function, and signaling.** *American Journal of Physiological-Cell Physiology*, C319-C334, **1994**.
- Lee, I.T., Chan, Y.C., Lin, C.W., Lee WJ, Sheu WH. **Effect of cranberry extracts on lipid profiles in subjects with type 2 diabetes.** *Diabet. Med.* 25(12), 1473–1477, **2008**.
- Lee, B. C., & Lee, J. **Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842(3), 446–462, **2014**.
- Li, D., Zhang, Y., Liu, Y., Sun R, Xia M. **Purified anthocyanin supplementation reduces dyslipidemia, enhances antioxidant capacity, and prevents insulin resistance in diabetic patients.** *J. Nutr.* 145(4), 742– 748, **2015**.
- Li Y., Yang P., Chang Q., Wang J., Liu J., Lv Y., Wang T.T.Y., Gao B., Zhang Y., Yu L.L. **Inhibitory Effect of Piceatannol on TNF-alfa-Mediated Inflammation and Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 4, 192, **2017**.
- Lila, M.A. **Anthocyanins and human health: an *in vitro* investigative approach.** *J. Biomed. Biotechnol.* (5), 306–313, **2004**.

- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method.** *Methods* (San Diego, Calif.), 25(4), 402–408, **2001.**
- López-Sánchez JI, Moreno DA, García-Viguera C. **D-pinitol, a highly valuable product from carob pods: health-promoting effects and metabolic pathways of this natural super-food ingredient and its derivatives.** *AIMS Agric Food* 3:41–63, **2018.**
- Magkos F., Fraterrigo G., Yoshino J., Luecking C., Kirbach K., Kelly S.C., Fuentes L., He S., Okunade A.L., Patterson B.W and Klein S. **Effects of Moderate and Subsequent Progressive Weight Loss on Metabolic Function and Adipose Tissue Biology in Humans with Obesity.** *Cell Metabolism* 23, 591-601, **2016.**
- Magre J., Delpech M., Khallouf E., Dahi T.G., Maldergem L.V., Sobel E., Meier M., Mégarbané A., Group B.W., Lathrop M. and Capeau J. **Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13.** *Nat Genet* 28:365–70, **2001.**
- Manli X., Hu J., Zhao W., Gao X., Jiang C., Liu K., Liu B., Huang F. **Quercetin differently regulates insulin-mediated glucose transporter 4 translocation under basal and inflammatory conditions in adipocytes.** *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 931-941, **2014.**
- Manieri E, Sabio G. **Stress kinases in the modulation of metabolism and energy balance.** *J Mol Endocrinol* 55:R11–R22, **2015.**
- McCullough, M.L., Peterson, J.J., Patel, R., Jacques PF, Shah R, Dwyer JT. **Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults.** *Am. J. Clin. Nutr.* 95 (2), 454–464, **2012.**
- McGhie, T.K., Ainge, G.D., Barnett, L.E., Cooney JM, Jensen DJ. **Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats.** *J. Agric. Food Chem.* 51 (16),4539–4548, **2003.**
- McIntyre E. A. Walker M. **Genetics of type 2 diabetes and insulin resistance: knowledge from human studies.** *Clinical Endocrinology*, 57, 303-311, **2002.**
- Mehlem A., Hagberg C. E., Muhl L., Eriksson U. & Falkevall A. **Imaging of neutral lipids by Oil Red O for analyzing the metabolic status in health and disease.** *Nature Protocols*, 8(6), 1149–1154, **2013.**
- Mink P.J., Scrafford C.G., Barraj L.M., Harnack L., Hong CP., Nettleton JA., Jacobs DR Jr. **Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women.** *Am. J. Clin. Nutr.* 85 (3), 895–909, **2007.**

- Mlinar B., Marc J., Janez A., Pfeifer M. **Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases.** *Clinica Chimica Acta* 375, 20-35, **2006.**
- Moreira LN., Silva JF., Silva GC., Lemos V.S. and Cortes S.F. **Activation of eNOS by D-pinitol induces an endothelium-dependent vasodilatation in mouse mesenteric artery.** *Front Pharmacol* 9:528, **2018.**
- Moro, T.; Shimoyama, Y.; Kushida, M.; Hong, Y. Y.; Nakao, S.; Higashiyama, R.; Sugioka, Y.; Inoue, H.; Okazaki, I.; Inagaki, Y. **Glycyrrhizin and its metabolite inhibit Smad3-mediated type I collagen gene transcription and suppress experimental murine liver fibrosis.** *Life Sci.* 83, 531–539, **2008.**
- Mukae SY., Ohashi T., Matsumoto Y., Ohta S., Omura H. **D-Pinitol in fabaceae: an oviposition stimulant for the common grass yellow butterfly, *Eurema mandarina*.** *J Chem Ecol* 42: 1122–1129, **2016.**
- Muscarà C., Molonia M.S., Speciale A., Bashllari R., Cimino F., Occhiuto C., Saija A., Cristani M. **Anthocyanins ameliorate palmitate-induced inflammation and insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes.** *Phytotherapy Research*, 1-10, **2019.**
- Nakamura, Y., Matsumoto, H., Todoki, K. **Endotheliumdependent vasorelaxation induced by black currant concentrate in rat thoracic aorta.** *Jpn. J. Pharmacol.* 89 (1), 29–35, **2002.**
- Nandipati KC, Subramanian S, Agrawal DK. **Protein kinases: 1mechanisms and downstream targets in inflammation-mediated obesity and insulin resistance.** *Mol Cell Biochem* 426:27–45, 2017.
- Nascimento N.R., Lessa L.M.A., Kerntopf M.R., Sousa C.M., Alves R.S., Queiroz M.G.R., Price J., Heimark D.B., Larner J., Du X., Brownlee M., Gow A., Davis C., Fonteles M.C. **Inositols prevent and reverse endothelial dysfunction in diabetic rat and rabbit vasculature metabolically and by scavenging superoxide.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (1), 218–233, **2006.**
- Naseri R., Farzaei F., Haratipour P., Nabavi S.F., Habtemariam S., Farzaei M.H., Khodarahmi R., Tewari D., Momtaz S. **Anthocyanins in the Management of Metabolic Syndrome: A Pharmacological and Biopharmaceutical Review.** *Front. Pharmacol.* 9:1310, 2018.
- Negishi O, Mun'Im A, Negishi Y. **Content of methylated inositols in familiar edible plants.** *J Agric Food Chem* 63:2683–2688, **2015.**
- Nestler, J.E.; Jakubowicz, D.J.; Reamer, P.; Gunn, R.D.; Allan, G. **Ovulatory and metabolic effects of D-chiro-inositol in the polycystic ovary syndrome.** *N. Engl. J. Med.* 340, 1314–1320, **1999.**
- Ng M., et al. **Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in**



- children and adults 1980-2013: A systematic analysis.** *Lancet* 30; 384(9945): 766-781, 2014.
- Novotny J.A., Baer D.J., Khoo C., Gebauer SK Charron CS. **Cranberry juice consumption lowers markers of cardiometabolic risk, including blood pressure and circulating C-reactive protein, triglyceride, and glucose concentrations in adults.** *J. Nutr.* 145 (6),1185–1193, 2015.
  - Obolentseva G. V., Litvinenko V. I., Ammosov A. S., Popova T. P. and Sampiev A. M. **Pharmacological and Therapeutic Properties of Licorice Preparation (A Review).** *Pharmaceutical Chemistry Journal*, vol. 33, No. 8, 427-434 1999.
  - Ogiku M., Kono H., Hara M., Tsuchiya M., Fujii H. **Glycyrrhizin prevents liver injury by inhibition of high-mobility group box 1 production by Kupffer cells after ischemia-reperfusion in rats.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 339, 93–98, 2011.
  - O’Rahilly S. **Insights into obesity and insulin resistance from the study of extreme human phenotypes.** *European Journal of Endocrinology* 147 435-441, 2002.
  - Ormazabal V., Nair S., Elfeky O., Aguayo C., Salomon C., Zuniga F.A. **Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease.** *Cardiovasc Diabetol* 17:122, 2018.
  - Orthen B, Popp M. **Cyclitols as cryoprotectants for spi- nach and chickpea thylakoids.** *Environ Exp Bot* 44:125– 132, 2000.
  - Orton R.J., Stum O.E., Vyshemirsky V., Calder M., Gilbert D.R. and Kolch W. **Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway.** *Biochem. J.* 392, 249-261, 2005.
  - Ovaskainen, M.L., Torronen, R., Koponen, J.M., Sinkko H, Hellström J, Reinivuo H, Mattila P. **Dietary intake and major food sources of polyphenols in finnish adults.** *J.Nutr.* 138 (3), 562–566, 2008.
  - Owczarczyk-Saczonek A., Lahuta L. B., Ligor M., Placek W., Górecki R. J. and Buszewski B. **The Healing-Promoting Properties of Selected Cyclitols-A Review.** *Nutrients* 10, 1891, 2018.
  - Owczarczyk-Saczonek A., Lahuta, L.B., Placek W., Górecki R. J. **The potential benefits of plant cyclitols in the treatment of psoriasis.** *Pol. Ann. Med.* 25, 166–171, 2018.
  - Pal M., Febbraio MA., Lancaster GI. **The roles of c-Jun NH2-terminal kinases (JNKs) in obesity and insulin resistance.** *J Physiol* 594:267–279, 2016.
  - Paniagua JA. **Nutrition, insulin resistance and dysfunctional adipose tissue determine the different components of metabolic syndrome.** *World journal of diabetes* 7.19:483, 2016.

- Pereira Paes Menezes A, Cerini Trevisan SC, Barbalho SM. And Guiguer L. ***Tamarindus indica* L. A plant with multiple medicinal purposes.** *J Pharmacogn Phytochem* 5:50–54, **2016.**
- Perez-Jimenez, J., Hubert, J., Hooper, L., Cassidy A, Manach C, Williamson G, Scalbert A., **Urinary metabolites as biomarkers of polyphenol intake in humans: a systematic review.** *Am. J. Clin. Nutr.* 92 (4), 801–809, **2010.**
- Petersen Max C. and Shulman Gerald I. **Mechanisms of insulin action and insulin resistance.** *Physiol; Rev* 98: 2133–2223, **2018.**
- Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E. **Modulation of insulin action.** *Diabetologia* 47:170–84, **2004.**
- Poongothai G, Sripathi SK. **A review on insulinomimetic pinitol from plants.** *Int J Pharm Bio Sci* 4:992–1009, **2013.**
- Potenza M.A., Marasciulo F.L., Mitolo Chieppa D., Siro Brigiani G., Formoso G., Quon M.J., Montagnani M. **Insulin resistance in spontaneously hypertensive rats is associated with endothelial dysfunction characterized by imbalance between NO and ET-1 production.** *American journal of physiology-heart and circulatory physiology*, 289 (2), H813–822, **2005.**
- Pfeifer M. **Morbid obesity.** In: Omejc M, Repše S, editors. Workshop and Symposium Gastric Surgery-Standards and Novelties Proceedings of the symposium Klinični oddelek za abdominalno kirurgijo Kirurška klinika Klinični center Ljubljana: Ljubljana; p. 11–21, **2005.**
- Reaven G., Segal K., Hauptman J., Boldrin M., Lucas C. **Effect of Orlistat-Assisted Weight Loss in Decreasing Coronary Heart Disease Risk in Patients With Syndrome X.** *Am J Cardiol*, 87:827-831, **2001.**
- Rochlani Y., Pothineni N.V., Kovelamudi S. and Mehta J.L. **Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds.** *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease* 11(8), 215-225, **2017.**
- Rodriguez-Fragoso, L., Martinez-Arismendi, J.L., Orozco-Bustos, D., Reyes-Esparza J, Torres E, Burchiel SW. **Potential risks resulting from fruit/vegetable-drug interactions: effects on drug-metabolizing enzymes and drug transporters.** *J. Food Sci.* 76 (4), R112–R124, **2011.**
- Ruan H., Miles PD., Ladd CM., Ross K., Golub TR., Olefsky J.M. and Lodish H.F. **Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor- alpha: implications for insulin resistance.** *Diabetes* 51: 3176–88, **2002.**
- Saad MJ., Araki E., Miralpeix M., Rothenberg PL, White MF., Kahn CR. **Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance.** *J*

*Clin Invest* 90: 1839–49, **1992**.

- Sabio G., Davis RJ. **cJun NH2-terminal kinase 1 (JNK1): roles in metabolic regulation of insulin resistance.** *Trends Biochem Sci* 35:490–496, **2010**.
- Samuel V.T. and Shulman G. I. **Integrating Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links.** *Cell*, 148(5): 852-871, **2012**.
- Schindler JF, Monahan JB, Smith WG. **p38 pathway kinases as anti-inflammatory drug targets.** *J Dent Res.* 86:800–11, **2007**.
- Schlaepfer IR, Pulawa LK, Ferreira LD, James DE, Capell WH, Eckel RH. **Increased expression of the SNARE accessory protein Munc18c in lipid-mediated insulin resistance.** *J Lipid Res* 44:1174–81, **2003**.
- Schulz E., Gori T., Münzel T. **Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension.** *Hypertens. Res.* 34, 665–673. **2011**.
- Scioscia M., Karumanchi S.A., Goldman-Wohl D., Robillard P.Y. **Endothelial dysfunction and metabolic syndrome in preeclampsia: an alternative viewpoint.** *Journal of reproductive immunology*, 108, 42–47, **2015**.
- Scott P.H., Brunn G.J., Kohn A.D., Roth R.A., Lawrence Jr. **Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signalling pathway.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 7772–7777, **1998**.
- Seeram, N.P. **Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease.** *J. Agric. Food Chem.* 56 (3), 627–629, **2008**.
- Sethi G., Ahn K.S., Sung B. and Aggarwal B.B. **Pinitol targets nuclear factor- $\kappa$ B activation pathway leading to inhibition of gene products associated with proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis.** *Mol Cancer Ther* 7(6), 1604-1614, **2008**.
- Shan W.F., Chen B.Q., Zhu S.J., Jiang L., Zhou Y.F. **Effects of GLUT4 expression on insulin resistance in patients with advanced liver cirrhosis.** *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 12, 677–682, **2011**.
- Shoelson S. E., Lee J., & Goldfine A. B. **Inflammation and insulin resistance.** *The Journal of Clinical Investigation*, 116(7), 1793–1801, **2006**.
- Silva G., Braga F., Lima M., Pesquero J., Lemos V., Cortes S. ***Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO.** *J. Ethnopharmacol.* 137, 709–713. **2011**.
- Silva G.C., Braga F.C., Lemos V.S., Cortes S.F. **Potent antihypertensive effect of *Hancornia speciosa* leaves extract.** *Phytomedicine* 23, 214–219, **2016**.

- Siracusa L., Saija A., Cristani M., Cimino F., D'arrigo M., Trombetta D., Rao F., Ruberto G. **Phytocomplexes from liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) leaves: chemical characterization and evaluation of their antioxidant, anti-genotoxic and anti-inflammatory activity.** *Fitoterapia*, 82 (4), 546–556, **2011**.
- Siracusa L., Cimino F., Saija A. and Ruberto G. **Bioactive compounds from the leaves of Sicilian liquorice.** In: J.C. Taylor, ed *Advances in chemistry research*. Chapter 3, Vol. 44. New York, NY: Nova Science, 133–167, **2018**.
- Siracusa L., Occhiuto C., Molonia M.S., Cimino F., Palumbo M., Saija A., Speciale A., Rocco C., Ruberto G., Cristani M. **A pinitol-rich *Glycyrrhiza glabra* L. leaf extract as functional supplement with potential in the prevention of endothelial dysfunction through improving insulin signaling.** *Archives of Physiology and Biochemistry*, 1-10, **2020**.
- Solinas G., Becattini B. **JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response.** *Mol Metab* 6:174–184, **2016**.
- Soromou L.W., Jiang L., Wei M., Chen Na, Huo M., Chu X., Zhong W., Wu Q., Baldé A., Deng X. & Feng H. **Protection of mice against lipopolysaccharide-induced endotoxic shock by pinocembrin is correlated with regulation of cytokine secretion.** *Journal of Immunotoxicology* 11, issue 1 **2014**.
- Speciale, A., Anwar, S., Canali, R., Chirafisi, J., Saija, A., Virgili, F., & Cimino, F. **Cyanidin-3-O-glucoside counters the response to TNF- $\alpha$  of endothelial cells by activating Nrf2 pathway.** *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(11), 1979–1987, **2013**.
- Szkodziak P., Paszkowski T. **Statement of the Polish Gynecological Society on the application of *myo*-inozytol in patients with PCOS (polycystic ovary syndrome).** *Ginekol. Pol.* 85, 158–160, **2014**.
- Tanaka A., Horiuchi M., Umamo K., Shibamoto T. **Antioxidant and anti-inflammatory activities of water distillate and its dichloromethane extract from licorice root (*Glycyrrhiza uralensis*) and chemical composition of dichloromethane extract.** *Journal of the science of food and agriculture*, 88 (7), 1158–1165, **2008**.
- Tank J., Jordan J., Diedrich A., Schroeder C., Furlan R., Sharma A.M., Luft F.C., Brabant G. **Bound leptin and sympathetic outflow in nonobese men.** *J Clin Endocrinol Metab* 88:4955–9, **2003**.
- Tetik N., Yu'ksel E. **Ultrasound-assisted extraction of D- pinitol from carob pods using response surface methodology.** *Ultrason Sonochem* 21:860–865, **2014**.
- Tomaino A., Martorana M., Arcoraci T., Monteleone D., Giovanazzo C., Saija. A. **Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte)**

- seeds and skins.** *Biochimie* 92, 1115 – 1122, **2010.**
- Tripathy, D., Mohanty, P., Dhindsa, S., Syed, T., Ghanim, H., Aljada, A., Dandona, P. **Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in health subjects.** *Diabetes*, 52(12), 2882-2887, **2003.**
  - Trombetta D., Giofrè S.V., Tomaino A., Raciti R., Saija A., Cristina M., Romeo R., Siracusa L., Ruberto G. **Selective COX-2 inhibitory properties of dihydrostilbenes from licorice leaves – *in vitro* assays and structure/activity relationship study.** *Natural product communications*, 9 (12), **2014.**
  - Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H., & Osawa, T. **Dietary cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice.** *The Journal of Nutrition*, 133(7), 2125–2130, **2003.**
  - Tuncman G., Hirosumi J., Solinas G., Chang L., Karin M. and Hotamisligil G.S. **Functional *in vivo* interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance.** *PNAS*, vol. 103, no. 28, 10745, **2006.**
  - Unfer V, Nestler JE, Kamenov ZA, Prapas N, Facchinetti F. **Effects of Inositol(s) in Women with PCOS: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials.** *Int J Endocrinol.* 2016:1849162, **2016.**
  - Uysal K.T., Wiesbrock S.M., Hotamisligil G.S. **Functional Analysis of Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptors in TNF- $\alpha$ -Mediated Insulin Resistance in Genetic Obesity.** *Endocrinology*, Volume 139, Issue 12, pp. 4832-4838, **1998.**
  - Van Marken Lichtenbelt W.D., Vanhommerig J.W., Smulders N.M., Drossaerts J., Kemerink G.J., Bouvy N.D., Schrauwen P., Jaap Teule G.J. **Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men.** *N Engl J Med* 360:15, 1500-1508, **2009.**
  - Vara J.A.F., Casado E., de Castro J., Cejas P., Belda-Iniesta C., González-Barón M. **PI3K/Akt signalling and cancer.** *Cancer Treatment Reviews* 30, 193-204, **2004.**
  - Vichkanova S.A. and Rubinchik M.A. **Licorice Root** [in Russian]. *Meditsina, Moscow*, pp. 11-13, **1978.**
  - Virtanen K.A., Lidell M.E., Orava J., Heglind M., Westergren R., Niemi T., Taittonen M., Laine J., Savisto N.J., Enerback S. and Nuutila P. **Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults.** *N Engl J Med* 360:1518-1525, **2009.**
  - Wang Y.C., Yang Y.S. **Simultaneous quantification of flavonoids and triterpenoids in licorice using HPLC.** *J. Chromatog B* 850, 392-399, **2007.**
  - Wang, Q., Cheng XL., Zhang DY., Gao XJ., Zhou L., Qin XY., Xie GY., Liu K., Qin Y., Liu BL., Qin MJ. **Tectorigenin attenuates palmitate-induced endothelial insulin resistance**

- via targeting ROS-associated inflammation and IRS-1 pathway.** *Plos one*, 8 (6), e66417, 2013.
- Wedick N.M., Pan A., Cassidy A., Rimm EB., Sampson L., Rosner B., Willett W., Hu FB., Sun Q., van Dam RM. **Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women.** *Am. J.Clin. Nutr.* 95 (4), 925–933, 2012.
  - Wilcox G. **Insulin and Insulin Resistance.** *Clin Biochem; Rev.* 26(2): 19-39, 2005.
  - Xu J.W., Ikeda K., Yamori Y. **Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by cyanidin-3-glucoside, a typical anthocyanin pigment.** *Hypertension* 44 (2), 217–222, 2004.
  - Yazici D., Sezer H. **Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity.** *Med Biol* 960:277-304, 2017.
  - Yokozawa T., Liu, Z. W., Chen C. P. **Protective effects of Glycyrrhizae radix extract and its compounds in a renal hypoxia (ischemia)-reoxygenation (reperfusion) model.** *Phytomedicine* 6, 439–445, 2000.
  - Yuan M., Konstantopoulos N., Lee J., Hansen L., Li Z. W., Karin M. & Shoelson S. E. **Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk $\beta$ .** *Science*, 293(5535), 1673–1677, 2001.
  - Yu-Jin Kwon et al. **A Review of the pharmacological Efficacy and Safety of Licorice Root from Corroborative Clinical Trial Findings.** *J Med Food.* 23(1):12-20, 2020.
  - Yunfeng Gao, Mengna Zhang, Tianchen Wu, Mengying Xu, Haonan Cai, and Zesheng Zhang. **Effects of D-Pinitol on Insulin Resistance through the PI3K/Akt Signaling Pathway in Type 2 Diabetes Mellitus Rats.** *J. Agric. Food Chem.* 63, 26, 6019-6026, 2015.
  - Zebisch K., Voigt V., Wabitsch M., Brandsch M. **Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes.** *Analytical Biochemistry* 425, 88-90, 2012.
  - Zhang, Q. and Ye, M. **Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice).** *Journal of chromatography – A*, 1216 (11), 1954–1969, 2009.
  - Zhang X, Xu A, Chung SK, Cresser JH, Sweeney G, Wong RL, Lin A, Lam KS. **Selective inactivation of c-Jun NH2-terminal kinase in adipose tissue protects against diet-induced obesity and improves insulin sensitivity in both liver and skeletal muscle in mice.** *Diabetes*; 60:486– 495, 2011b.
  - Zhang C., Wu W., Xin X., Li X. and Liu D. **Extract of ice plant (Mesembryanthemum crystallinum) ameliorates hyperglycemia and modulates the gut microbiota composition in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats.** *Food Funct* 10:3252– 3261, 2019.
  - Zunino, S.J., Parelman, M.A., Freytag, T.L., Stephensen CB, Kelley DS, Mackey BE, Woodhouse LR, Bonnel EL. **Effects of dietary strawberry powder on blood lipids and**

**inflammatory markers in obese human subjects. *Br. J. Nutr.* 108 (5), 900–909, 2012.**