



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

**CORSO DI LAUREA IN SCIENZE FARMACEUTICHE
APPLICATE**

TESI DI LAUREA

**UTILIZZO DI FITOPREPARATI COME STRATEGIA
PER IL TRATTAMENTO DI PATOLOGIE CAUSATE
DA STRESS OSSIDATIVO**

RELATORE: CHIAR.MA PROF.SSA MARIANGELA GAROFALO

LAUREANDO: SAMIR DAVID EL KHAIRI

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

Abstract	2
1. Introduzione	3
1.1 Lo stress ossidativo.....	3
1.2 Le specie radicaliche e la loro origine.....	4
1.3 I sistemi antiossidanti.....	8
1.3.1 Antiossidanti endogeni.....	9
1.3.2 Antiossidanti esogeni non enzimatici.....	11
1.3.3 Antiossidanti sintetici.....	15
1.4 I possibili danni fisiologici da stress ossidativo.....	16
2. Patologie correlate allo stress ossidativo	21
2.1 Il diabete.....	21
2.1.1 Il diabete mellito.....	22
2.2 La correlazione con lo stress ossidativo.....	27
2.3 I rimedi.....	32
2.3.1 I rimedi sintetici: TRATTAMENTO FARMACOLOGICO DM1....	32
2.3.2 I rimedi sintetici: TRATTAMENTO FARMACOLOGICO DM 2..	33
2.3.3 I rimedi naturali.....	35
2.4 L'Alzheimer.....	47
2.4.1 Diagnosi di Alzheimer.....	50
2.5 La correlazione con lo stress ossidativo.....	51
2.6 I rimedi per l'Alzheimer.....	54
2.6.1 I rimedi sintetici.....	54
2.6.2 I rimedi naturali.....	55
3. Piante ad alto contenuto di antiossidanti	67
3.1 <i>Ginko biloba</i> L.....	67
3.1.1 La droga e i principi attivi.....	68
3.1.2 Proprietà e utilizzi.....	69
3.2 <i>Vaccinium myrtillus</i> L.....	73
3.2.1. La droga e i principi attivi.....	74
3.2.2. Proprietà e utilizzi.....	75
4. Conclusioni	77
5. Bibliografia	78

Abstract

Lo stress ossidativo è un processo che si sviluppa quando nell'organismo c'è uno squilibrio tra un'elevata produzione di specie reattive dell'ossigeno e un'inefficienza dei suoi sistemi antiossidanti. Inoltre, l'esposizione a sostanze esogene tossiche quali i metalli pesanti, il fumo e gli agenti inquinanti possono incrementarne la produzione. Nell'elaborato vengono descritti i principali sistemi antiossidanti endogeni-esogeni e i loro meccanismi di funzionamento al fine di poter prevenire, ridurre e inibire i processi ossidativi generati dalle specie radicaliche. Questi composti sono prodotti fisiologicamente dall'organismo umano, tuttavia, in grandi quantità, possono recare danno. Infatti, diversi studi affermano una correlazione diretta tra lo stress ossidativo e diverse patologie come il diabete, l'Alzheimer, l'ipertensione, l'artrite reumatoide, l'ictus e alcune neoplasie. Lo scopo principale del presente lavoro di tesi è stato quello di valutare, attraverso una attenta analisi della letteratura, i diversi aspetti dello stress ossidativo, le problematiche ad esso legate e le sostanze principalmente utilizzate come rimedio. L'analisi è stata focalizzata principalmente su due patologie: il Diabete e l'Alzheimer e su come queste ultime possano stimolare lo sviluppo di stress ossidativo. Nel caso del diabete, si è visto che l'iperglicemia, può essere controllata sia con la somministrazione di farmaci sintetici oppure attraverso l'utilizzo, sempre più diffuso, di fitopreparati. Infatti, è stato riportato come la berberina ottenuta da due piante officinali: *Berberis vulgaris* L. e *Coptis chinensis* L. e la galegina ottenuta da *Galega officinalis* L. abbia un effetto ipoglicemizzante e possa essere utilizzata per trattare il diabete mellito di tipo II. Nel caso invece dell'Alzheimer si è visto come lo stress ossidativo partecipi alla patogenesi, promuovendo la deposizione di placca β -amiloide e la formazione di grovigli neurofibrillari di tau iperfosforilata. Il principale rimedio farmacologico nel trattamento dell'Alzheimer consiste nell'utilizzare inibitori dell'acetilcolinesterasi, ad esempio il Donepezil. Diversi studi però affermano come la curcumina ottenuta dalla pianta *Curcuma Longa* L. e i ginsenosidi ottenuti dalla pianta *Panax ginseng* L. contribuiscano a prevenire le cause di patogenesi dell'Alzheimer e a migliorare le funzioni cognitive di persone affette da questa patologia. E' noto inoltre che l'utilizzo di fitopreparati possa aiutare a contrastare i sintomi e lo sviluppo di diverse patologie. Per questi motivi, sono state anche riportate le caratteristiche generali di due piante ad alto contenuto antiossidante: *Ginkgo biloba* L. e *Vaccinium myrtillus* L. Dagli studi riportati e discussi in questo lavoro si evince come i flavonoidi e i ginkgolidi presenti nel ginkgo conferiscano al fitopreparato un'azione antiossidante, vasoprotettiva e antidolorifica, la quale potrebbe contribuire a contrastare l'Alzheimer, la sindrome di Raynaud e problemi associati al diabete. Ugualmente i flavonoidi, tannini, antociani presenti nella pianta di mirtillo attribuiscono al fitopreparato proprietà antiossidanti, ipoglicemizzanti e antidiarroica utili per trattare Alzheimer, diabete e stress ossidativo.

1. Introduzione

1.1 Lo stress ossidativo

Il concetto di stress ossidativo è stato introdotto nel 1985 per la ricerca in biologia e medicina redox. Da allora è fiorita un'area di ricerca definita con il nome di *Redox Biology*. Questa ha trovato un enorme sviluppo in una vasta gamma di discipline e si sviluppa a partire dalla chimica e dalla biologia delle radiazioni, attraverso la biochimica e la fisiologia cellulare fino alla biologia generale e alla medicina (Sies, 2015).

Lo stress ossidativo si può definire come uno squilibrio tra livelli elevati di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e una bassa attività dei meccanismi antiossidanti. (Figura 1.1.)

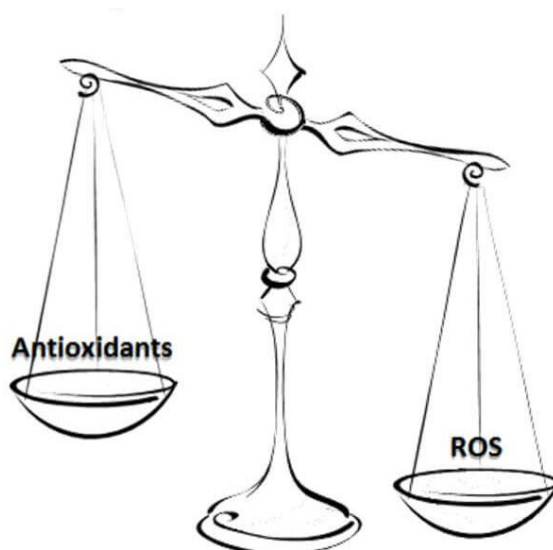


Figura 1.1. Stress ossidativo.

Un aumento dello stress ossidativo può causare danni alla struttura cellulare e può distruggere anche i tessuti. Tuttavia, i ROS sono necessari, infatti svolgono diversi ruoli fisiologici per un'adeguata funzione cellulare, come per esempio la produzione di energia da parte dei mitocondri e la segnalazione cellulare (Pizzino et al., 2017).

I ROS vengono generati come sottoprodotti del metabolismo dell'ossigeno ma, nonostante ciò, diversi fattori di stress ambientale come per esempio raggi UV, radiazioni ionizzanti, sostanze inquinanti, metalli pesanti ed alcuni xenobiotici (es. farmaci antiblastici) contribuiscono ad aumentare notevolmente la produzione di ROS, generando così lo squilibrio che porta al danno cellulare e tissutale (Pizzino et al., 2017).

Alcuni studi definiscono che l'invecchiamento, l'esercizio fisico e diverse condizioni patologiche, tra cui cancro, malattie neurodegenerative, malattie cardiovascolari, diabete, malattie infiammatorie e intossicazioni portano all'aumento dello stress ossidativo. Negli ultimi anni sono infatti state sfruttate diverse sostanze antiossidanti per il loro effetto

benefico contro lo stress ossidativo, come le Vitamina C-E, i flavonoidi e i polifenoli. Se da una parte si tende a descrivere lo stress ossidativo come dannoso per il corpo umano, dall'altra è anche vero che viene sfruttato come approccio terapeutico per trattare condizioni cliniche come il cancro, con un certo grado di successo clinico (Pizzino et al., 2017). Lo stress ossidativo non modulato può essere responsabile dell'induzione di diverse malattie (croniche/degenerative), causare patologie acute (es. traumi e ictus) e accelerare il processo di invecchiamento.

1.2 Specie radicaliche e la loro origine

Le specie reattive vengono classificate in radicali liberi dell'ossigeno, più generalmente noti come specie reattive dell'ossigeno (**ROS**) e l'insieme alle specie reattive dell'azoto (**RNS**). (Tabella 1.1.)

Tabella 1.1. Principali specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto.

Ossigeno singoletto	O ₂
Anione superossido	O ⁻ - 2
Perossido di idrogeno	H ₂ O ₂
Radicale idrossile	HO•
Radicale peridrossile	HO ₂ •
Radicale alcossile	RO•
Radicale idroperossile	ROO•
Acido ipocloroso.	HClO
Acido ipobromoso	HBrO
Ozono	O ₃
Monossido di azoto	NO
Diossido di azoto	NO ₂
Perossinitrito	NO

È noto che ROS/RNS svolgono un duplice ruolo nei sistemi biologici, poiché possono essere sia dannosi che benefici. Gli effetti benefici dei ROS coinvolgono ruoli fisiologici nelle risposte cellulari come, ad esempio, nella difesa contro agenti infettivi e nella funzione di un certo numero di sistemi di segnalazione cellulare. Al contrario, ad alte concentrazioni, i ROS possono essere mediatori del danno alle strutture cellulari, tra cui lipidi e membrane, proteine e acidi nucleici definendo così lo stress ossidativo (Valko et al., 2006). Il termine "specie reattive dell'ossigeno" viene applicato sia ai radicali liberi che ai loro intermedi non radicalici. I radicali liberi sono definiti come specie contenenti uno o più elettroni spaiati, ed è questo guscio elettronico incompleto che conferisce la loro

elevata reattività. I radicali liberi possono essere generati da molti elementi, ma nei sistemi biologici quelli più importanti sono quelli che coinvolgono l'ossigeno e l'azoto (Oxidative Stress, n.d.). La produzione di ROS si basa fondamentalmente su reazioni enzimatiche e non enzimatiche. Le reazioni enzimatiche in grado di generare ROS sono quelle coinvolte nella catena respiratoria, nella sintesi delle prostaglandine, nella fagocitosi e nel sistema del citocromo P450 (Pizzino et al., 2017). In condizioni fisiologiche, il radicale libero dell'ossigeno più comune è l'**anione superossido ($O_2^{\bullet-}$)** e la via respiratoria dei mitocondri viene considerata la fonte principale di produzione soprattutto quando il trasferimento di elettroni lungo gli enzimi della catena respiratoria non è efficiente, cioè quando avviene la dispersione di elettroni sull'ossigeno molecolare e questo porta alla formazione di $O_2^{\bullet-}$. La velocità di formazione è determinata dal numero di elettroni presenti sulla catena. La velocità è elevata in condizioni di iperossia e di glucosio elevato (come nel diabete) ma paradossalmente aumenta anche in condizioni di ipossia, quando la ridotta disponibilità di ossigeno provoca l'accumulo di elettroni nel complesso IV. Allo stesso modo, il superossido può anche essere generato all'interno dell'ER attraverso la fuoriuscita di elettroni dalla catena di trasporto degli elettroni più corta. Il radicale superossido è generato dall'enzima **NADPH** (Nicotinammide Adenina Dinucleotide Fosfato) **Ossidasi**, dal **citocromo P450** e da altre ossido-reduttasi (Oxidative Stress, n.d.). Una volta formato, è coinvolto in diverse reazioni che a loro volta generano **perossido di idrogeno (H_2O_2)**, **radicale ossidrilico (OH^\bullet)**, **perossinitrito ($ONOO^-$)**, **acido ipocloroso ($HOCl$)** e così via. Successivamente l'anione superossido viene eliminato dagli enzimi **Superossido Dismutasi**, che lo convertono in perossido di idrogeno che viene definito come un radicale non libero, quindi meno reattivo dell'anione superossido. Tuttavia, il perossido di idrogeno rientra nel termine di ROS poiché è coinvolto nella generazione e nella disintossicazione dei radicali liberi. H_2O_2 è una molecola non polare, in grado di diffondersi attraverso cellule e membrane, quindi, agisce ampiamente come secondo messaggero nelle vie di trasduzione del segnale. Il perossido di idrogeno viene a sua volta trasformato in acqua dagli enzimi **Catalasi** e **Glutazione Perossidasi**. (Figura 1.2.)

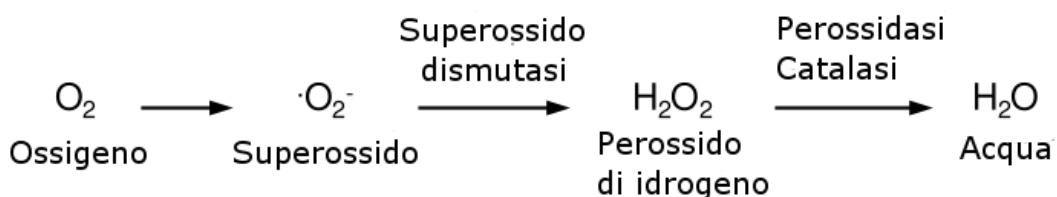


Figura 1.2. Reazione di eliminazione dell'anione superossido.

Inoltre, è importante che gli enzimi antiossidanti funzionino bene, poiché uno squilibrio tra le concentrazioni dell'anione superossido e perossido di idrogeno può portare alla formazione del radicale più pericoloso, lo **ione ossidrilico** ($\text{OH}\cdot$).

Il radicale ossidrilico ($\text{OH}\cdot$), è la molecola più reattiva tra tutte le specie di radicali liberi in vivo, si forma attraverso la **REAZIONE DI FENTON** che comporta l'interazione tra perossido di idrogeno, con Fe^{2+} oppure Cu (catalizzatori di reazione), generando così $\text{OH}\cdot$. (Figura 1.3.)



Figura 1.3. Reazione di Fenton.

Lo ione ossidrilico è una molecola molto reattiva e interagisce con qualsiasi molecola biologica vicina, inoltre non è noto nessun sistema scavenger per eliminare $\text{OH}\cdot$, per questo è molto pericoloso.

Il radicale **ossido nitrico** ($\text{NO}\cdot$), che svolge alcuni importanti ruoli fisiologici, è sintetizzato dall'ossidazione dell'arginina in citrullina da parte dell'**Ossido Nitrico Sintetasi** (NOS). (Figura 1.4.)

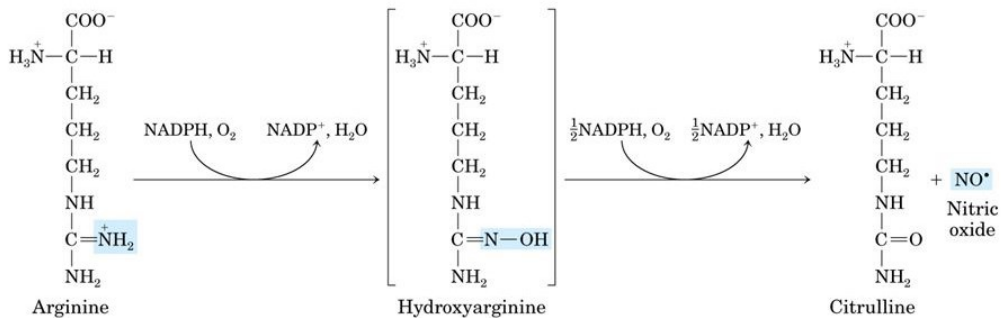


Figura 1.4. Reazione di sintetizzazione dell'ossido nitrico.

L'eccessiva generazione di superossido può anche portare a interazioni con l'ossido nitrico ($\text{NO}\cdot$) per formare il **perossinitrito** (ONOO^-), il quale è un potente pro-ossidante (Figura 1.5.) (*Oxidative Stress*, n.d.; Pizzino et al., 2017).

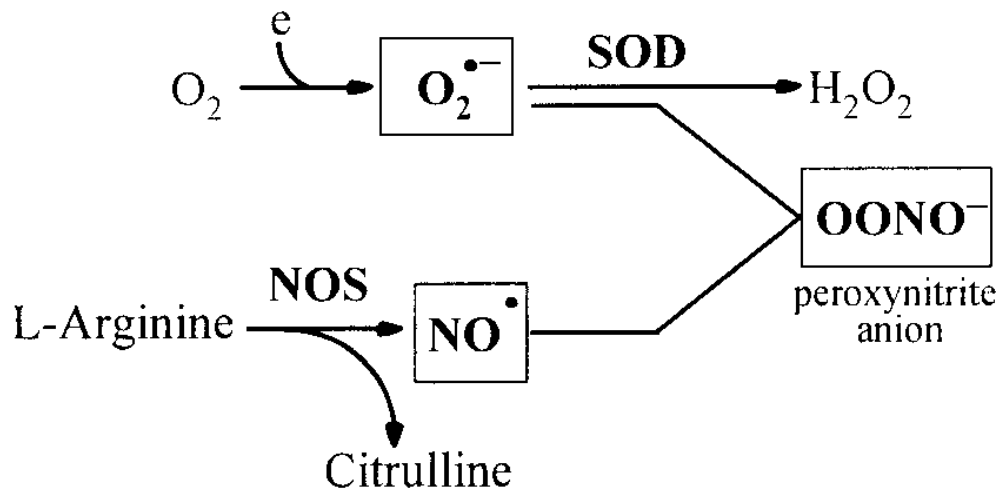


Figura 1.5. Reazione di formazione del perossinitrito.

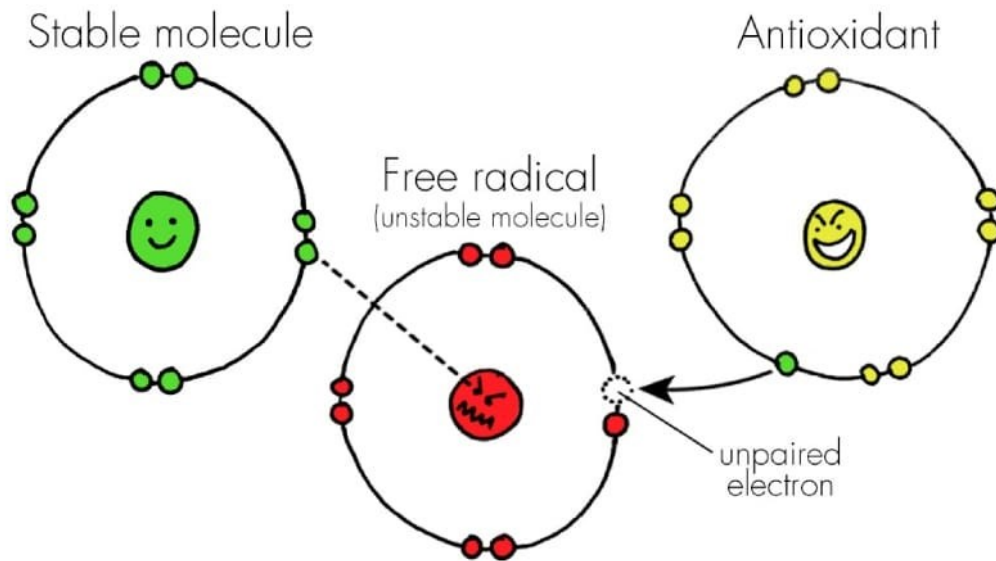
Anche reazioni non enzimatiche possono essere responsabili della produzione di radicali liberi, quando per esempio l'ossigeno reagisce con composti organici o quando le cellule sono esposte a radiazioni ionizzanti.

In conclusione, i radicali liberi possono essere generati sia da fonti endogene che esogene. L'attivazione delle cellule immunitarie, l'infiammazione, l'ischemia, l'infezione, il cancro, l'eccessivo esercizio fisico, lo stress mentale e l'invecchiamento sono tutti responsabili della produzione endogena di radicali liberi.

Mentre la produzione esogena di radicali liberi può verificarsi in seguito: all'esposizione a inquinanti ambientali, metalli pesanti (Cd, Hg, Pb, Fe e As), solventi chimici, assumendo alcuni farmaci (ciclosporina, tacrolimus), alla cottura dell'alimento (carne affumicata, olio usato), al fumo di sigaretta, all'alcol e alle radiazioni.

Quando questi composti esogeni penetrano nel corpo, vengono degradati o metabolizzati e i radicali liberi vengono generati come sottoprodotti (Pizzino et al., 2017).

1.3 I sistemi antiossidanti



Per definizione gli antiossidanti prevengono, inibiscono e riducono i processi di ossidazione andando ad eliminare gli intermedi dei radicali liberi, evitando così la propagazione della reazione a catena ossidativa. Gli antiossidanti sono stati ampiamente studiati nei campi della biologia, della medicina, dell'alimentazione e nelle scienze della nutrizione. Le comunità scientifiche hanno ben accettato l'efficacia degli antiossidanti endogeni generati nel corpo, mentre l'efficacia degli antiossidanti alimentari esogeni sono ancora discutibili. Ciò può essere attribuito a diversi fattori, per esempio una mancanza di comprensione di base sull'interazione degli antiossidanti esogeni nel corpo oppure la mancanza di accordo tra i diversi dosaggi antiossidanti che porta all'incapacità di correlare antiossidanti dietetici specifici per avere risultati benefici sulla salute (Kotha et al., 2022). Gli antiossidanti possono essere classificati in due modi, la prima classificazione li suddivide in base alla natura, antiossidanti naturali (tocoferoli-lectine-acido ascorbico) e antiossidanti sintetici (gallati-butilidrossianisolo); mentre la seconda classificazione li suddivide in base all'attività, antiossidanti primari (si ossidano al posto del substrato), antiossidanti secondari (riporta l'antiossidante primario ossidato nella sua forma ridotta) e antiossidanti chelanti (chelano ioni metallici (es. ferro) che inducono la reazione radicale. Quindi gli antiossidanti includono prevalentemente vari enzimi antiossidanti endogeni con i loro substrati/coenzimi e antiossidanti endogeni non enzimatici, insieme a fonti antiossidanti esogene (naturali e sintetiche) che mantengono l'equilibrio redox nel sistema biologico. L'attività antiossidante endogena è direttamente regolata dal fattore 2 correlato al fattore nucleare (Nrf2). È un fattore di trascrizione ubiquitario sensibile al redox che stimola l'espressione di promotori genici contenenti l'elemento di risposta antiossidante (ARE) coinvolti nella disintossicazione da ROS (Figura 1.6.) (Ashok et al., 2022).

Classification of Natural and Synthetic Antioxidants

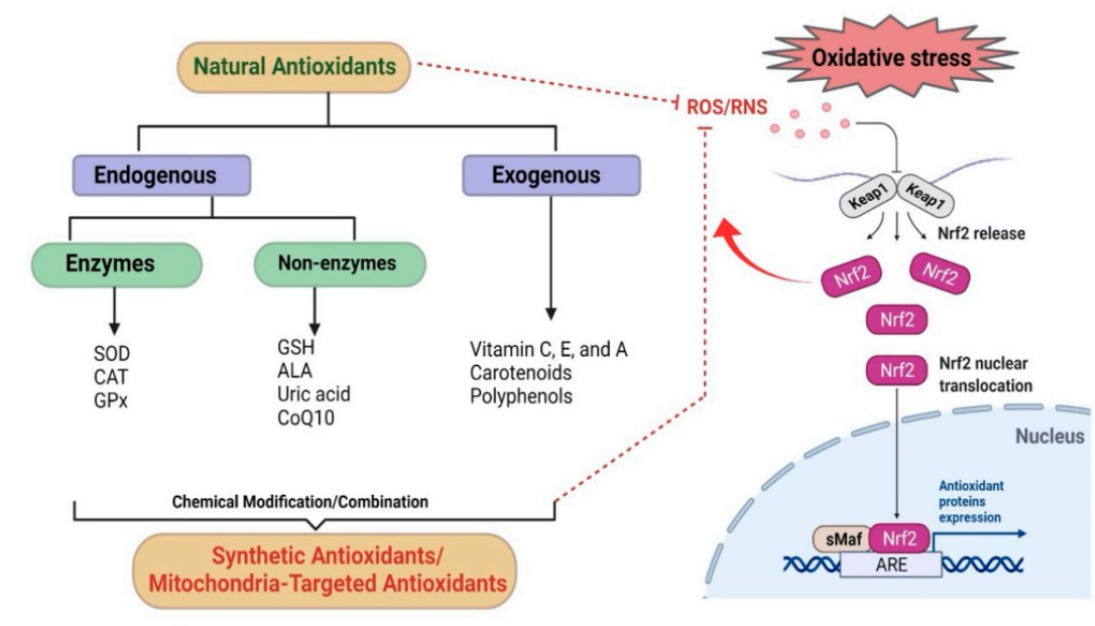


Figura 1.6. Classificazione degli antiossidanti.

1.3.1 Antiossidanti endogeni

Il meccanismo protettivo antiossidante intrinseco è composto da vari enzimi come Superossido Dismutasi (SOD), Catalasi (CAT), Glutazione Perossidasi (GPx-1) e da antiossidanti non enzimatici come gli antiossidanti tiolici (Glutazione, acido α -lipoico), Acido urico e Coenzima Q10 (Ashok et al., 2022).

Antiossidanti enzimatici: le difese enzimatiche possiedono tutte un metallo di transizione al centro, in grado di assumere valenze diverse mentre trasferiscono elettroni durante il processo di disintossicazione (Burton & Jauniaux, 2011).

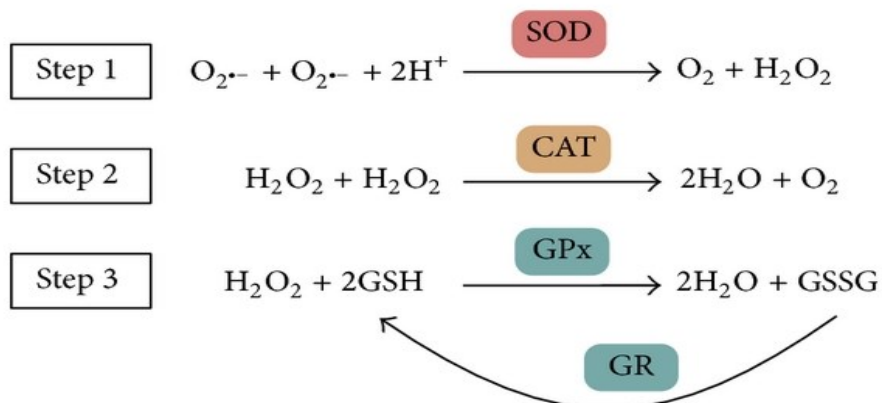


Figura 1.7. Reazioni di conversione ROS da parte di antiossidanti endogeni.

1. **Superossido Dismutasi:** enzima metallo proteico eterogeneo con quattro diversi tipi di metalli al centro (Cu, Zn, Fe, Mg e Ni). Possiede due isoforme, una nel citosol/spazio intermembrana (**Cu/Zn-SOD**) e una nella matrice mitocondriale (**Mn-SOD**), le quali convertono l'anione superossido ($O_2^{\bullet-}$) in perossido di idrogeno (H_2O_2) (Figura 1.7.) (Ashok et al., 2022; Burton & Jauniaux, 2011).
2. **Catalasi:** enzima contenente la porfirina tetrameric, si trova principalmente nel perossisoma e protegge le cellule convertendo il perossido di idrogeno (H_2O_2) in acqua e ossigeno, utilizzando un Fe o il Cofattore Mn. (Figura 1.7.) Questo meccanismo previene la formazione di H_2O_2 e abbassa il livello di ROS (Ashok et al., 2022).
3. **Glutazione Perossidasi:** enzima intracellulare, definito come il principale tampone redox tiolico. Viene sintetizzato nel citosol a partire dal **I-glutamato, I-cisteina e glicina**. Si trova principalmente nella matrice mitocondriale, con una piccola quantità nel citoplasma. L'enzima riduce i livelli di ROS mediante la conversione del perossido di idrogeno (H_2O_2) in acqua (H_2O) tramite l'ossidazione del glutatione (GSH), generando a sua volta H_2O e glutatione disolfuro (GSSG). (Figura 1.7.) Quindi l'attività del glutatione perossidasi dipende dalla presenza di glutatione ridotto (GSH), il quale dona idrogeno. Il glutatione disolfuro (GSSG) che si forma nella reazione, viene riconvertito in GSH grazie all'azione del **Glutazione Reduttasi** a scapito del NADPH. Quest'ultimo è generato attraverso **la via del pentoso fosfato** (Figura 1.8.) (Ashok et al., 2022; Burton & Jauniaux, 2011).

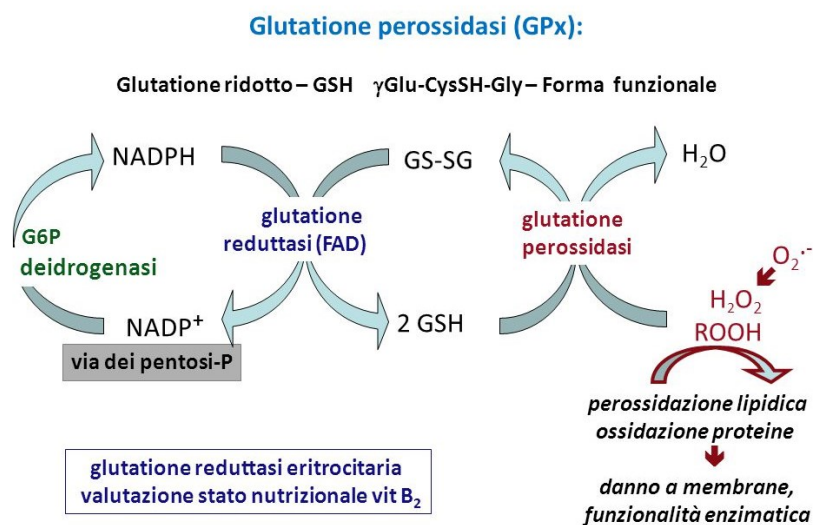


Figura 1.8. Reazione di riconversione del GSSG in GSH.

Antiossidanti non enzimatici:

Glutazione (GSH): tripeptide composto da tre amminoacidi (glicina-cisteina-acido glutammico) viene definito come l'antiossidante endogeno solubile in acqua più abbondante. Il GSH può neutralizzare direttamente i ROS, inoltre è un fattore importante nel metabolismo degli xenobiotici. Per mantenere un ambiente riducente intracellulare e contrastare la generazione eccessiva di ROS, il GSH lavora con tre gruppi di enzimi disintossicanti (Glutazione Perossidasi (GPx), Glutazione Reduttasi (GR) e Glutazione Ossidasi).

Acido α -lipoico (ALA): questa molecola viene classificata come molecole contenenti zolfo che catalizzano la **decarbossilazione ossidativa** degli α -chetoacidi (piruvato e l' α -chetoglutarato). Viene definito un antiossidante universale, l'acido lipoico ossidato e la sua controparte ridotta l'acido diidrolipoico (DHLA), possono eliminare i radicali liberi sia negli ambienti lipidici che in quelli acquosi.

Acido urico: antiossidante idrofilo prodotto durante il metabolismo dei nucleotidi purinici che rappresenta circa il 60% dell'attività totale di scavenging dei radicali liberi nel siero del sangue. L'acido urico è un efficace donatore di elettroni e scavenger di una varietà di ROS (\bullet OH, $O_2^{\bullet-}$, $OONO^-$, HClO).

Coenzima Q 10 (CoQ10): cofattore enzimatico antiossidante coinvolto nell'ETC mitocondriale, trasferisce gli elettroni nel complesso I e dal complesso II al complesso III. Il CoQ10 è un antiossidante liposolubile presente in tutte le membrane cellulari e inibisce la perossidazione lipidica. Inoltre, altri antiossidanti come la vitamina E e C, richiedono il CoQ10 per il loro riciclaggio e per la loro rigenerazione (Ashok et al., 2022).

1.3.2 Antiossidanti esogeni non enzimatici

Gli antiossidanti naturali esogeni possono essere considerati composti bioattivi, i quali provengono principalmente da alimenti (frutta, verdura, cereali) e da piante medicinali. Gli antiossidanti naturali presenti negli alimenti sembrano fornire benefici metabolici e sono associati a un minor rischio di sviluppare diversi problemi di salute. Il potere antiossidante di un alimento può essere espresso da un valore **ORAC** (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) che indica esattamente il potere antiossidante di ogni alimento (Figura 1.9.). Più è alto il livello ORAC, tanto maggiore è la capacità degli alimenti di indurre l'assorbimento dei radicali liberi nelle cellule.



Figura 1.9. Illustra la scala ORAC di alcuni alimenti naturali esogeni.

Le fonti alimentari contengono sistemi complessi di molteplici antiossidanti che includono le vitamine (A-C-E), carotenoidi e vari polifenoli che il corpo umano non può sintetizzare. Questi antiossidanti inibiscono la genesi delle reazioni a catena o rompono queste reazioni donando un elettrone alle specie radicaliche trasformandole in specie neutre, non dannose. Inoltre, gli antiossidanti esogeni aiutano a rafforzare/rifornire quelli endogeni, consentendo così l'eliminazione di ROS/RNS in eccesso (Ashok et al., 2022).

Acido ascorbico: chetolattone conosciuto con il nome comune di Vitamina C, rappresenta un efficiente donatore di elettroni, il quale converte i radicali liberi in molecole stabili nella fase acquosa del citoplasma. La vitamina C è dotata di un'elevata attività antiossidante, infatti, in presenza di ossigeno tende a ossidarsi in acido deidroascorbico, agendo così contro i radicali liberi. Inoltre, può reagire con radicali pericolosi bloccando le reazioni a catena:

RO° + ASCORBATO → ROH + RADICALE SEMIDEIDROASCORBATO (molecola relativamente inattiva). (Figura 1.10.)

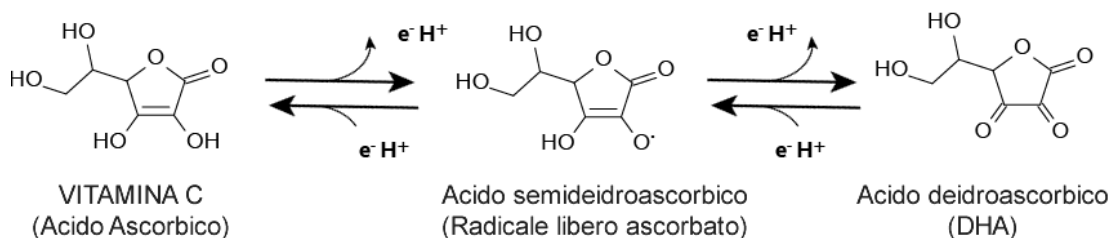


Figura 1.10. Reazione antiossidante dell'acido ascorbico.

L'acido ascorbico è coinvolto in varie funzioni, per esempio nel mantenimento dell'integrità del tessuto vascolare/connettivo, nell'assorbimento del ferro, nella biosintesi del collagene, nella neuroprotezione, nel funzionamento dei leucociti, ed è pure cofattore della dopamina beta-idrossilasi e quindi fa parte della biosintesi delle catecolamine.

Inoltre, la vitamina C protegge i fosfolipidi di membrana dal danno perossidativo ed è un ottimo scavenger di radicali liberi nel cervello.

Sebbene l'acido ascorbico non sia uno scavenger diretto dei radicali lipofili, agisce in sinergia con i tocoferoli nella rimozione dei radicali perossidi lipidici, rigenerando la vitamina E in combinazione con il glutathione ridotto (GSH) (Ashok et al., 2022; Mendonça et al., 2022).

Tocoferolo: definisce otto composti lipofili presenti in natura: 4 tocoferoli e 4 tocotrienoli (forme liposolubili della vitamina E).

Gli animali e l'uomo non possono sintetizzare la vitamina E, infatti essa viene assunta tramite il consumo di sostanze vegetali (es. frutti oleosi, semi, oli).

La vitamina E grazie alle sue proprietà apolari proteggere i lipidi dall'ossidazione, combatte la perossidazione lipidica delle membrane cellulari ed è in grado di fermare la catena radicalica formando un derivato a bassa reattività incapace di attaccare i substrati lipidici. Tutti i tocoferoli e i tocotrienoli sono potenti antiossidanti con attività di scavenging dei radicali lipoperossidici, attraverso la donazione di idrogeno dal gruppo fenolico.

Le forme naturali di vitamina E che possiedono una posizione 5 non sostituita (es. γ -tocoferolo), possono intrappolare gli elettrofili, comprese le specie reattive dell'azoto (NOS) mentre le forme di vitamina E con un gruppo metilico in posizione 5 (es. α -tocoferolo) non intrappolano gli elettrofili. Pertanto, la molecola γ -tocoferolo si è dimostrata migliore rispetto a α -tocoferolo nella disintossicazione di NO₂ e perossinitrito, la quale a sua volta genera il 5-nitro- γ -tocoferolo.

Vitamina A: micronutriente essenziale liposolubile che è coinvolto in molte funzioni fisiologiche nell'uomo, tra cui la differenziazione cellulare, l'integrità epiteliale, la crescita e lo sviluppo, la funzione immunitaria e la vista.

La vitamina A viene immagazzinata nel fegato ed è rappresentata da una famiglia di composti liposolubili: retinolo, retinale, acido retinoico e palmitato di retinile.

Carotenoidi: terpenoidi liposolubili contenenti doppi legami trans coniugati e sono i secondi pigmenti naturali più abbondanti sulla Terra, inoltre conferiscono colore alla frutta e verdura. Appartengono alla famiglia dei carotenoidi: i **caroteni** (licopene, β -carotene/ α -carotene) e le **xantofille** (astaxantina, fucoxantina, zeaxantina). Principalmente sono presenti in alcuni alimenti vegetali es. pomodori, carote, peperoni, zucche. Il β -carotene

è sempre presente nelle verdure e nella frutta gialla e verde, ed è la fonte primaria di Vitamina A, essendo il suo precursore si può trasformare in Vitamina A durante il metabolismo (Keijer et al., 2005). Si ritiene che la via più importante del suo metabolismo sia la scissione centrale del beta-carotene da parte della **beta-carotene-15,15'-diossigenasi**, che si traduce in due molecole retiniche. Successivamente, la reduttasi retinica può ridurre il retinale a retinolo (Figura 1.11.).

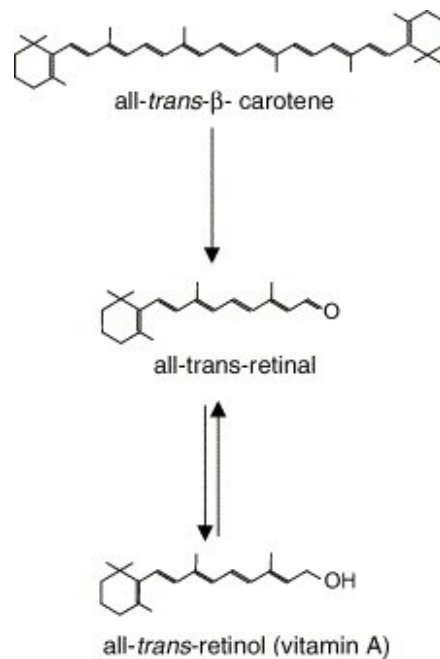


Figura 1.11. Conversione del beta carotene in Vitamina A.

I carotenoidi sono caratterizzati da un esteso sistema di elettroni π coniugati che aiuta nella stabilizzazione degli elettroni spaiati, agendo come scavenger e inibendo l'ossigeno singoletto, avendo così un ruolo chiave per evitare l'ossidazione dei lipidi (Ashok et al., 2022). Inoltre, l'assunzione di carotenoidi è stata associata a una riduzione di rischio nel sviluppare malattie croniche come cancro, malattie cardiovascolari, cataratta e degenerazione maculare (Mendonça et al., 2022).

Polifenoli: i composti polifenolici sono presenti nella frutta, verdura e pure in alcune bevande (succo d'uva, tè verde o caffè), questi composti possiedono proprietà antiossidanti, antinfiammatorie e neuroprotettive. In questo contesto, le piante medicinali sono state ampiamente utilizzate nel tempo per trattare diverse malattie, in quanto in foglie, steli, frutti, fiori, radici e nella corteccia, possiedono fitocostituenti naturali. Le piante rappresentano un'importante fonte di composti antiossidanti come: flavonoidi, acidi fenolici, tannini, antociani e altri composti fenolici che possono trattare e prevenire gli

effetti dell'ossidazione; quindi, le piante medicinali suscitano grande interesse nell'industria alimentare e farmaceutica (Mendonça et al., 2022).

Il monomero di base nei polifenoli è l'anello fenolico e possono essere classificati in acidi fenolici, flavonoidi, tannini, stilbene e lignani (Figura 1.12.) (Li et al., 2023).

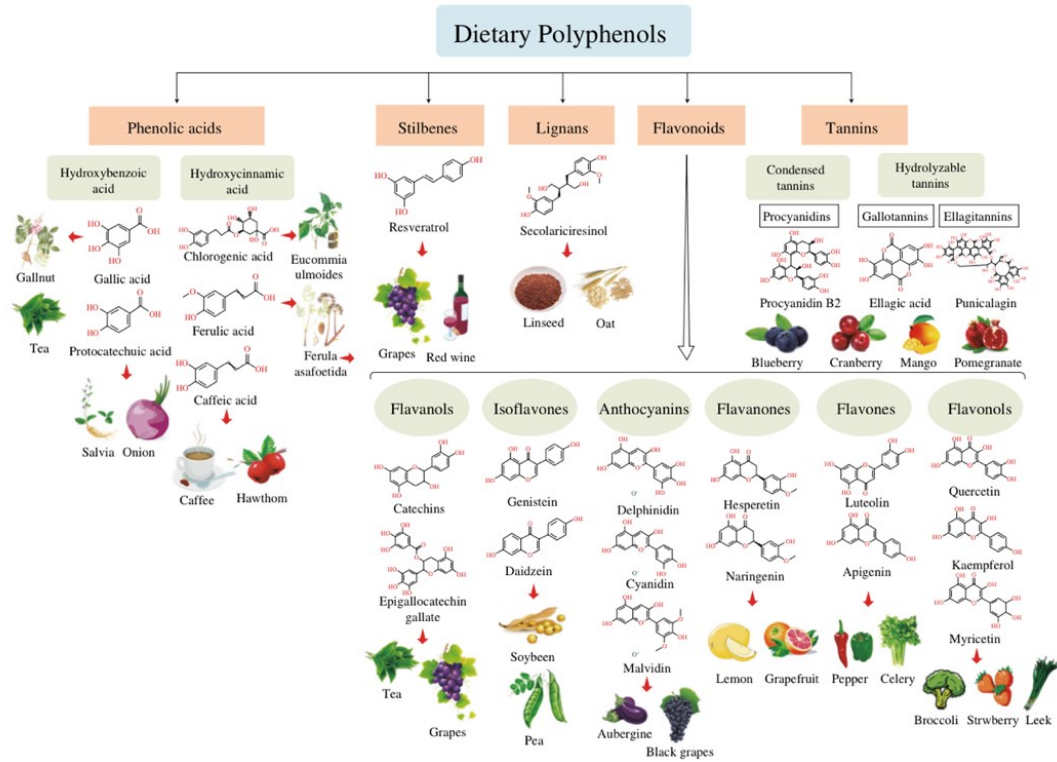


Figura 1.12. Classificazione delle varie classi di polifenoli.

Alcuni esempi di sostanze polifenoliche sono: gli antociani presenti nelle bacche di alcuni frutti (es. mirtillo), il resveratrolo che si trova nella buccia o nei semi dell'uva ed elevate quantità di catechine presenti nel tè verde. Altre sostanze polifenoliche molto studiate sono i calconi, l'epigallocatechina gallati e la quercetina. Tutte queste molecole antiossidanti disintossicano vari radicali liberi, eliminandoli o intrappolandoli, inoltre, i polifenoli vanno ad aumentare e regolare l'attività degli antiossidanti endogeni, prevenendo così l'ossidazione delle proteine e mostrano effetti neuroprotettivi e neurogenerativi (Ashok et al., 2022).

1.3.3 Antiossidanti sintetici

Gli antiossidanti sintetici si ottengono dalla modifica di alcuni antiossidanti naturali o dalla coniugazione con altre molecole efficaci (es. acido lipoico), in modo da migliorarne l'attività, la biodisponibilità e la stabilità metabolica. Gli antiossidanti sintetici più utilizzati nell'industria alimentare per prevenire l'ossidazione lipidica sono: **il butilidrossianisolo**

(*BHA*), il **butilidrossitoluene** (*BHT*), il **propil gallato** (*PG*) e il **tert-butil idrochinone** (*TBHQ*). Recenti ricerche sui derivati degli antiossidanti sintetici forniscono dati promettenti contro lo stress ossidativo e molteplici bersagli nelle malattie neurodegenerative. Ad esempio, il composto sintetico **1,3,4 ossadiazolo A3** mostra significativi effetti antiossidanti e neuroprotettivi. Allo stesso modo, è stato dimostrato che il derivato pirazolico sintetico della curcumina (**CNB-001**) sopprime la generazione di RNS con effetto antinfiammatorio (Ashok et al., 2022).

Anche i derivati sintetici di un composto fenolico naturale come l'estere fenilico dell'acido caffeico (**CAPE**) o la **cumarina** hanno dimostrato di proteggere i neuroni dopaminergici, inibendo la fosforilazione di p38, aumentando così la vitalità cellulare e promuovendo la risposta antiossidante (Ashok et al., 2022). La combinazione del nuovo composto sintetico contenente pirazolo 5-ammino-1-fenil-1H-pirazolo-4-carbonitrile con acido lipoico (**UPEI-800**), ha mostrato una neuroprotezione sinergica sia in un modello di ipossia in vitro che in un modello di ictus in vivo, riducendo il volume dell'infarto. Un ibrido sintetico di antiossidanti, cioè cumarina e licochalcone A (**LM-031**), ha dimostrato di inibire l'aggregazione A β nelle cellule A β -GFP SH-SY5Y, eliminare i ROS, promuovere la crescita dei neuriti e attivare il Nrf2- percorsi antiossidanti e antiapoptotici. I derivati sintetici del nitrone hanno mostrato effetti antiossidanti e neuroprotettivi in varie condizioni di malattie neurodegenerative (Ashok et al., 2022).

L'edaravone sintetico elimina i radicali \bullet OH liberi e i radicali OONO $^-$, che sono altamente associati a danno/morte neuronale nei disturbi cerebrovascolari come ictus ischemico e disturbi neurologici degenerativi. La molecola esercita effetti neuroprotettivi/antiossidanti e ritarda la progressione della malattia limitando l'entità della perossidazione lipidica e il danno della membrana cellulare causato dallo stress ossidativo. Negli ultimi anni sono stati sviluppati con successo antiossidanti mirati ai mitocondri, come il **idebenone** e **mitochinone** (analoghi sintetici di CoQ10). Queste due molecole hanno dimostrato un ruolo protettivo dai ROS mitocondriali, dai danni al DNA e dalla neuroinfiammazione e inoltre hanno dimostrato di prevenire la degradazione neuronale (Ashok et al., 2022).

1.4 I possibili danni fisiologici da stress ossidativo

Come detto in precedenza, se in eccesso, i radicali liberi e gli ossidanti danno luogo a un fenomeno noto come **stress ossidativo**, il quale può essere un processo dannoso per le diverse strutture cellulari, come le membrane, i lipidi, le proteine, le lipoproteine e il DNA (Figura 1.13.).

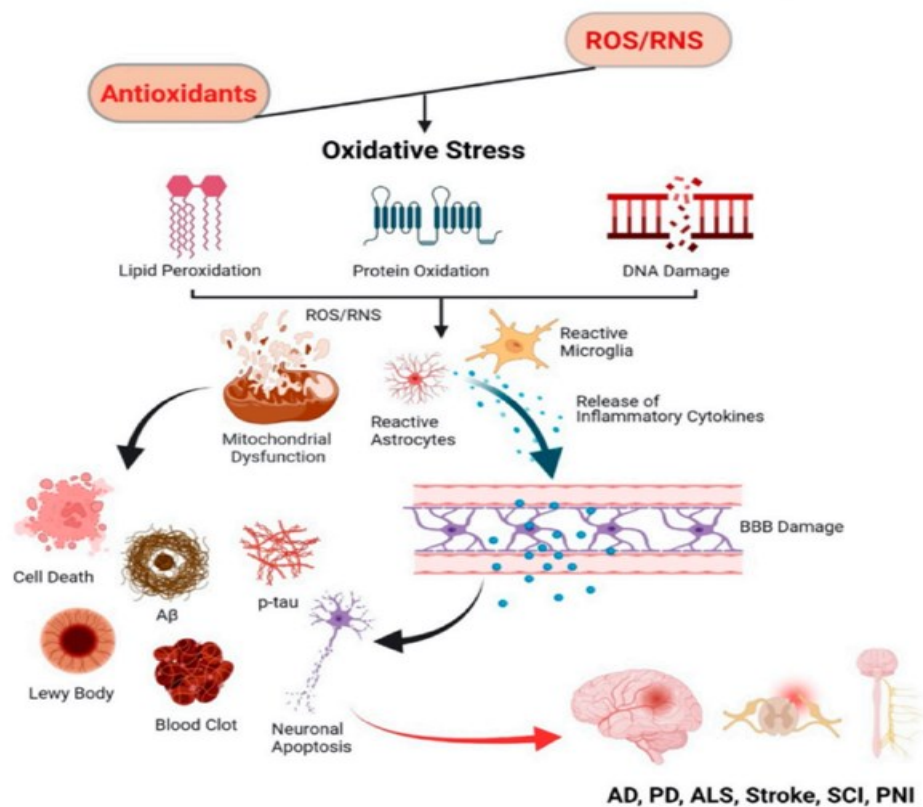


Figura 1.13. Schema che illustra i possibili danni in presenza di stress ossidativo.

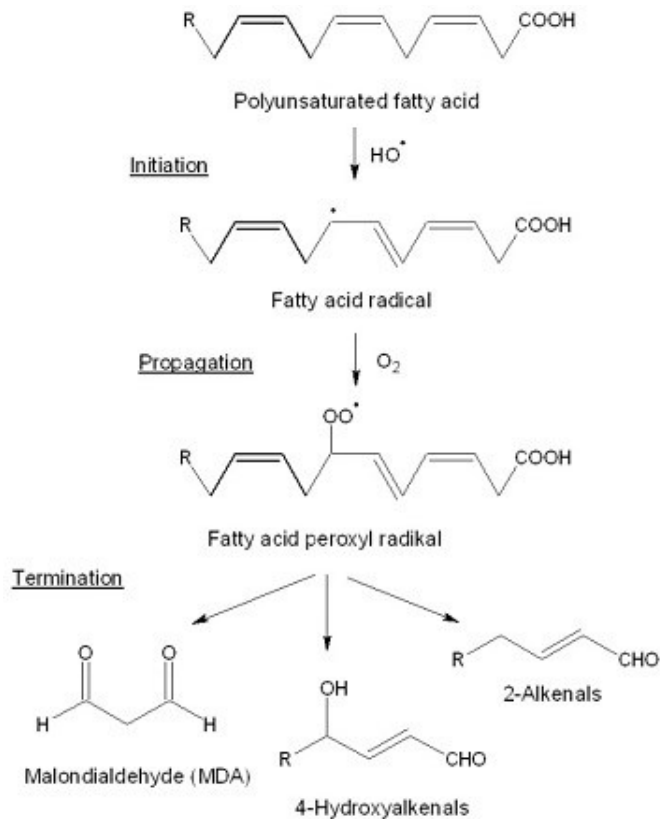
Lo stress ossidativo può danneggiare principalmente tre componenti:

I **LIPIDI**: un'elevata quantità di radicale idrossile e perossinitrito può causare la **perossidazione lipidica** (Figura 1.14.), è un processo che va a danneggiare le membrane cellulari e le lipoproteine.

La perossidazione lipidica è costituita da 3 fasi:

1. **Iniziazione**: vengono formati i radicali liberi a partire dagli acidi grassi insaturi (AG).
2. **Propagazione**: i radicali liberi generati, essendo molecole molto reattive, vanno a strappare elettroni ad altre molecole AG generando così nuovi radicali liberi, i quali reagiscono con altre molecole di AG e così via.
3. **Terminazione**: avviene quando due radicali liberi reagiscono tra loro generando prodotti non radicalici, smettendo così di reagire con AG.

La fine di questo processo porterà alla formazione di composti di **malondialdeide** (MDA) (Figura 1.14.) noti per essere citotossici e mutageni. Inoltre, la MDA viene utilizzata come marker che ci permette di capire se lo stadio della ossidazione nell'organismo è avanzato. Essendo una reazione radicalica a catena, la perossidazione lipidica si diffonde molto rapidamente interessando una grande quantità di molecole lipidiche.



1.14. Le fasi della perossidazione lipidica.

La vitamina E viene definita come la più importante “rompicatena” di questo processo, essendo una molecola liposolubile (possiede una coda idrofobica) tende ad accumularsi all'interno delle membrane lipidiche e interagisce con i radicali perossilici lipidici circa quattro volte più velocemente di quanto possano reagire i radicali con le catene laterali degli acidi grassi adiacenti (Oxidative Stress, n.d.).

LE PROTEINE: possono essere danneggiate dallo stress ossidativo, andando incontro a modificazioni conformazionali che potrebbero comportare la perdita o una compromissione della loro attività enzimatica. Gli amminoacidi, sia liberi che contenuti nelle proteine, sono un bersaglio del danno ossidativo. L'ossidazione diretta delle catene laterali porta alla formazione di gruppi carbonilici (aldeidi e chetoni), la prolina, l'argenina, la lisina e la treonina sono particolarmente vulnerabili a questi attacchi.

Il western blotting (tecnica di laboratorio utilizzata per rilevare una specifica proteina in un campione di sangue) è il metodo più comunemente usato per analizzare l'ossidazione delle proteine (Oxidative Stress, n.d.; Pizzino et al., 2017).

IL DNA: è particolarmente vulnerabile all'attacco dei ROS a causa:

- della sua vicinanza al sito di generazione di $O_2^{\bullet-}$ nella catena di trasporto degli elettroni.
- della mancanza di una protezione istonica.
- dei minimi meccanismi di riparazione esistenti.

Il DNA viene attaccato principalmente dal radicale superossido attraverso alcune reazioni con le basi del DNA o con gli zuccheri desossiribosio. Gli attacchi alle porzioni di zucchero possono causare rotture del filamento, mentre quelli alle proteine istoniche possono portare a legami incrociati che interferiscono con il ripiegamento della cromatina, con la riparazione del DNA e con la trascrizione (Burton & Jauniaux, 2011).

Nonostante siano stati individuati più di 20 prodotti derivati dal danno ossidativo delle basi puriniche e pirimidiniche, solamente alcuni di questi sono stati studiati nel dettaglio. La base modificata più studiata è la **8-idrossiguanina** (*8-OH-Gua*) e in particolare il suo corrispondente nucleoside ossidato **8-idrossi-2'-deossiguanosina** (*8-OH-dG*) che si definisce come una lesione del DNA, il quale può essere responsabile della mutagenesi e può anche causare la perdita delle informazioni epigenetiche. Le principali ragioni che hanno portato a focalizzare l'attenzione su questo indicatore sono diverse. Innanzitutto, la guanina è la base del DNA che presenta il potenziale di ossidazione più basso e quindi è la più suscettibile agli attacchi degli agenti ossidanti. In secondo luogo, l'8-OH-dG ha evidenziato un'attività mutagena che si esplica in vari modi, tra cui errori o perdita di specificità di accoppiamento fra le basi, transversioni (GC→AT) ed errori di lettura sulle basi adiacenti. In ultimo, 8-OH-dG è quantitativamente il più presente nelle matrici biologiche extracellulari facilmente accessibili (sangue e urine) e negli ultimi anni sono stati messi a punti numerosi metodi analitici che ne permettono una sensibile e specifica rilevazione. Il fatto di misurare l'8-OH-dG nell'urina deriva dal fatto che, oltre ad essere un metodo non-invasivo, non si producono artefatti durante le procedure di estrazione. Poiché la 8-OH-dG escreta in urina ha origine nel DNA ossidato, si può ipotizzare che ci sia una relazione diretta tra stress ossidativo cellulare ed escrezione in urina. Per questi motivi che l'8-OH-dG è stato utilizzato come potenziale **biomarcatore**.

Mentre le proteine e i lipidi modificati possono essere eliminati tramite un normale processo di rinnovamento cellulare, i danni al DNA devono necessariamente essere riparati. Naturalmente le cellule possono mettere in atto diversi meccanismi, come la **Base Excision Repair (BER)** che consiste nella rimozione della singola lesione, grazie all'azione dell'enzima **glicosilasi** (Figura 1.15. b) oppure tramite il meccanismo **Nucleotide Excision Repair (NER)** che è una ricognizione delle distorsioni sulla forma

dell'elica che portano alla rimozione di brevi segmenti di filamento contenenti l'oligonucleotide lesionato (Figura 1.15. a) (Pizzino et al., 2017).

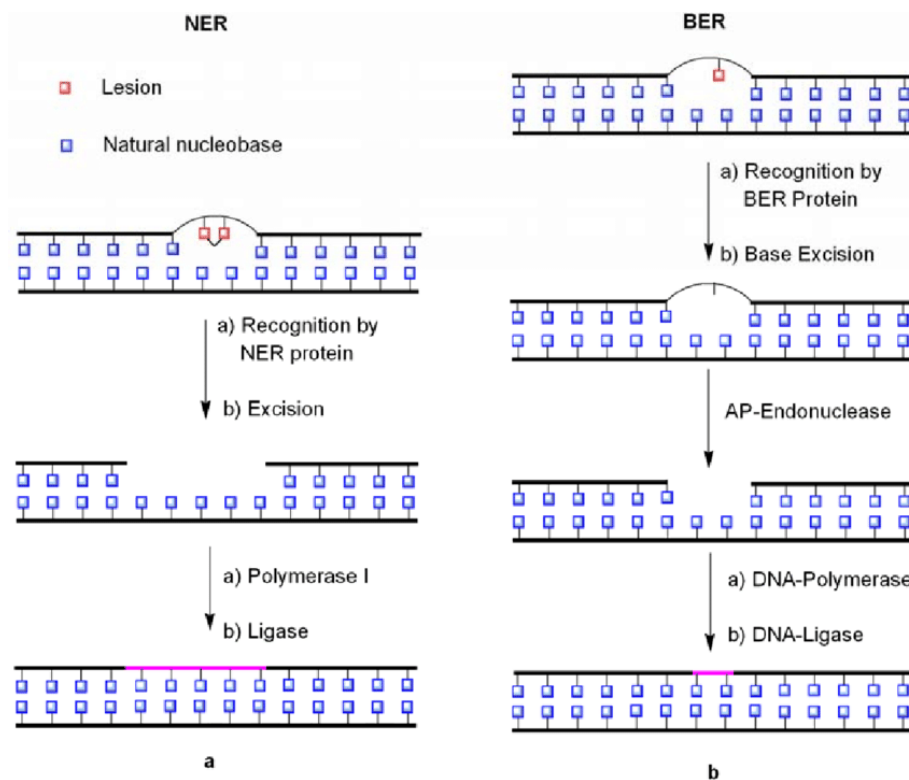


Figura 1.15. Sistemi di riparazione del DNA.

La presenza di DNA modificato è associato a un gran numero di fenomeni degenerativi e stati patologici tra cui malattie neoplastiche, neurodegenerative, cardiovascolari e autoimmuni.

2. Patologie correlate allo stress ossidativo

2.1 Il diabete

Il diabete è una malattia cronica in cui c'è un aumento di glucosio nel sangue, la cui causa principale è un'alterata funzione dell'insulina. L'insulina è un ormone che viene prodotto dal pancreas e consente il corretto funzionamento dei trasportatori del glucosio, i quali riducono lo zucchero a livello del sangue trasportandolo all'interno della cellula. Il diabete può essere di diverse forme e viene classificato principalmente in:

Diabete mellito: malattia caratterizzata da iperglicemia, viene suddivisa in due tipologie:

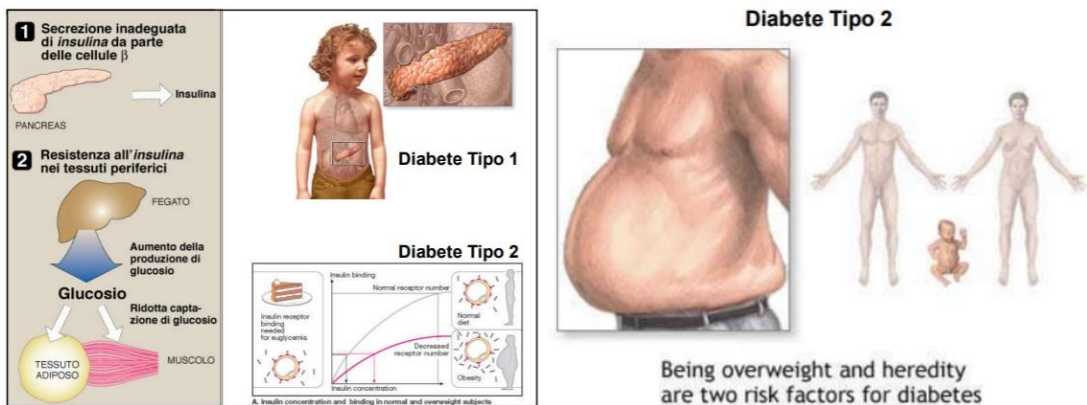
- IL DIABETE DI TIPO 1: si sviluppa principalmente nei bambini ed è di origine autoimmune. Infatti, avviene la rapida distruzione delle cellule del pancreas, non consentendo la produzione di insulina e il glucosio si accumula a livello del sangue. Non si sa ancora bene la genesi, ma si pensa che possa essere dovuto a una componente soggettiva di predisposizione oppure dopo avere contratto una malattia particolare anche virale; infatti, nel diabete di tipo 1 si ha una stimolazione del sistema immunitario anomala tale da produrre anticorpi capaci di reagire contro le cellule del nostro organismo comportando così la distruzione del pancreas stesso. In questo caso il soggetto presenta la malattia nell'arco di pochissime settimane e i sintomi principali sono la sete spiccata e la perdita della massa adiposa ovvero la perdita di peso che può portare alla morte.
- IL DIABETE DI TIPO 2: rappresenta il 90% dei casi di diabete, è presente principalmente nell'adulto e si sviluppa nell'arco di molti anni. Si ha un'alterazione nel meccanismo di omeostasi dell'insulina ovvero il pancreas produce insulina ma manca la funzionalità, si passa quindi da una minore efficacia dell'insulina fino a un deficit vero e proprio della produzione d'insulina. Il diabete di tipo 2 è strettamente associato all'obesità (infatti il soggetto ha un addome molto accentuato), inoltre stile di vita sedentario, fumo, scorretta alimentazione, sovrappeso, età avanzata, dislipidemia e ipertensione arteriosa sono tutti fattori di rischio per diabete di tipo 2. Inoltre, questa tipologia di diabete può essere ereditaria, infatti, i figli di diabetici possono essere predisposti alla malattia.

Diabete insipido: malattia metabolica causata da un'alterazione del meccanismo di controllo dei fluidi dell'organismo a cui manca la diuretina (vasopressina), un ormone necessario per il riassorbimento dell'acqua a livello dell'ultimo tratto del tubulo renale.

2.1.1 Il diabete mellito

Il diabete mellito (DM) è un insieme di disturbi metabolici e fisiopatologici che si manifestano con elevati livelli di glucosio nel sangue, a causa dell'incapacità delle cellule β -pancreatiche di rilasciare una quantità adeguata di insulina oppure a causa dell'insensibilità insulinica verso il recettore che ossida il glucosio nel sangue (Mariadoss et al., 2022). Diversi processi patogeni possono essere coinvolti nello sviluppo del diabete, dalla distruzione autoimmune delle cellule beta del pancreas con conseguente carenza nella secrezione d'insulina ad alcune anomalie che provocano resistenza all'azione dell'insulina come anomalie nel metabolismo dei carboidrati, dei grassi e delle proteine. La compromissione della secrezione di insulina e i difetti nell'azione dell'insulina spesso coesistono nello stesso paziente e non è ancora chiaro quale anomalia sia la causa primaria dell'iperglicemia. L'iperglicemia cronica del diabete è associata a diversi danni e disfunzioni in diversi organi (occhi, reni, nervi, cuore e vasi sanguigni). Le complicanze a lungo termine del diabete possono causare la **retinopatia** con potenziale perdita della vista; la **nefropatia** che porta a insufficienza renale; la **neuropatia periferica** con rischio di ulcere del piede, amputazioni e articolazioni di Charcot; la **neuropatia autonoma** che causa sintomi gastrointestinali, genitourinari, cardiovascolari e disfunzione sessuale. Inoltre, i pazienti con il diabete hanno una maggiore incidenza di malattie cardiovascolari, aterosclerotiche e cerebrovascolari (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013).

La maggioranza dei casi di diabete rientra in due grandi categorie eziopatogenetiche.



Diabete di tipo 1: conosciuto anche con il nome di **diabete giovanile** o **insulino-dipendente**, in quanto insorge solitamente in giovane età e l'unico trattamento possibile è quello con insulina, ma in certi casi può colpire pure gli adulti e viene definito come **diabete autoimmune latente dell'adulto**. La genesi del diabete tipo 1 è ancora sconosciuta, ma è ormai noto che alla base della malattia ci sia il danneggiamento da parte del sistema immunitario delle cellule del pancreas che producono insulina. Infatti,

nel sangue sono presenti anticorpi diretti contro antigeni presenti a livello delle cellule beta. Questa forma di diabete, che rappresenta solo il 5-10% dei casi di diabete deriva quindi da una distruzione autoimmune delle cellule beta. I marcatori principali della distruzione immunitaria delle cellule beta comprendono: gli autoanticorpi delle cellule insulari, gli autoanticorpi contro l'insulina, gli autoanticorpi contro GAD (GAD65) e gli autoanticorpi contro le tirosin fosfatasi IA-2 e IA-2b. Di solito questi autoanticorpi sono presenti nell'85-90% degli individui, quando inizialmente viene rilevata l'iperglicemia a digiuno. In questa forma di diabete, il tasso di distruzione delle cellule beta è abbastanza variabile, rapido in neonati/bambini e lento negli adulti. La distruzione autoimmune di queste cellule ha molteplici predisposizioni genetiche ed è anche correlata a fattori ambientali ancora poco definiti. I pazienti possono essere soggetti ad altre malattie autoimmuni come il morbo di Graves, il morbo di Addison, la vitiligine, la celiachia, l'epatite autoimmune, la miastenia grave e l'anemia perniziosa (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013). I principali sintomi clinici del diabete di tipo 1 sono: l'aumento dell'urina, l'aumento della sete e la perdita di peso improvviso. In particolare, bambini e adolescenti come prima manifestazione della malattia possono presentare la **chetoacidosi** (complicanza acuta del diabete che porta a nausea, vomito, dolore addominale e il caratteristico odore fruttato dell'alito). Altri invece hanno una modesta iperglicemia a digiuno che può rapidamente trasformarsi in grave iperglicemia o in chetoacidosi in presenza di infezione o altro stress. Negli adulti invece si può conservare una funzione residua delle cellule beta, la quale è sufficiente a prevenire la chetoacidosi per molti anni, tali individui per sopravvivere diventano dipendenti dall'insulina. Il diabete di tipo 1 è difficilmente prevenuto, in quanto sono ancora poco chiari i fattori di rischio che interagiscono con la predisposizione genetica scatenando la reazione autoimmune.

Diabete di tipo 2: conosciuto come diabete non insulino-dipendente o diabete dell'adulto, comprende gli individui che possiedono una resistenza all'azione dell'insulina (hanno un deficit insulinico relativo non assoluto). Inizialmente e spesso per tutta la vita, questi individui non hanno bisogno di un trattamento insulinico per sopravvivere. Ci sono probabilmente molte cause diverse di patogenesi di questa forma di diabete. La causa all'origine del diabete 2 è ancora sconosciuta, ma si pensa che sia di origine multifattoriale, tanto da non essere considerata un'unica malattia ma un insieme di differenti sindromi. Il rischio di sviluppare la patologia aumenta con l'età >40 anni, con la presenza di obesità e con la mancanza di attività fisica. Inoltre, l'eredità gioca un ruolo importante, circa il 40% dei diabetici di tipo 2 ha infatti parenti di primo grado affetti dalla stessa malattia. La maggior parte dei pazienti con questa forma di diabete sono obesi e l'obesità stessa causa un certo grado di resistenza all'insulina, i tipici sintomi del diabete sono stanchezza, malessere generale, aumento della diuresi, della sete, perdita di peso

e dolori addominali. La chetoacidosi si verifica raramente in questo tipo di diabete, di solito si presenta in associazione con lo stress di un'altra malattia (es. infezione). Questa forma di diabete spesso non viene diagnosticata per molti anni, perché si sviluppa gradualmente e nelle prime fasi il paziente non nota nessuno dei classici sintomi del diabete. Tuttavia, tali pazienti sono a maggior rischio di sviluppare complicanze macrovascolari e microvascolari. La resistenza all'insulina può migliorare con la riduzione del peso e con il trattamento farmacologico dell'iperglicemia, ma raramente viene riportata alla normalità (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013).

L'iperglicemia nel tempo si può accompagnare a diversi danni: a livello della microcircolazione del glomerulo renale, a livello cardiaco con la riduzione del diametro dei vasi con rischio d'ischemia e infarto, ed a livello dell'occhio dove si possono generare emorragie dei vasi della retina, le quali portano ad una diminuzione della vista.

Patogenesi del diabete mellito

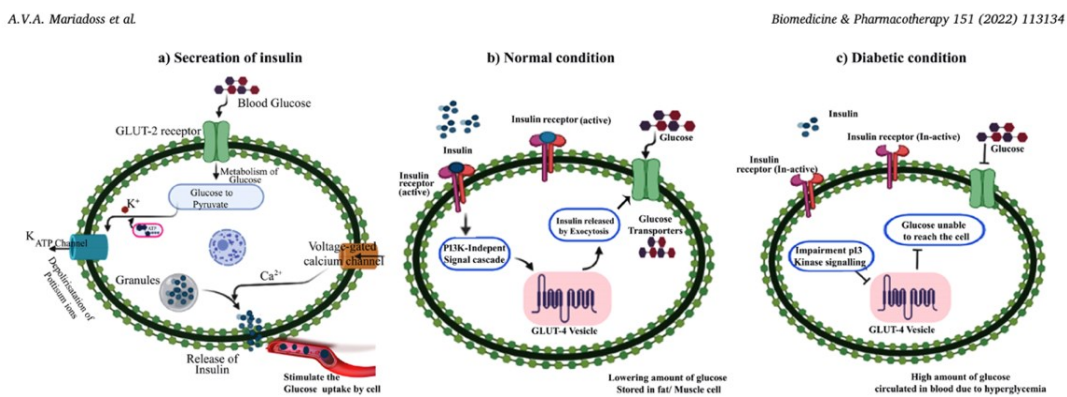


Figura 2.1. La fisiopatologia dell'insulina e le sue condizioni biochimiche associate.

In generale dopo un pasto ci sarà un aumento del livello di zucchero nel sangue, che da l'input per la secrezione di insulina e la successiva generazione di energia (ATP), il quale a sua volta viene trasportato, biotrasformato o immagazzinato nei muscoli sotto forma di sostanze grasse. La parte principale del trioso-fosfato viene convertito in glucosio e glicogeno attraverso la **gluconeogenesi**. Successivamente il glucosio arriva al fegato tramite il trasportatore **GLUT2** e quando i livelli di glucosio nel sangue sono alti, il glucosio in eccesso si converte in glicogeno attraverso l'enzima **glucosio-6-fosfato** nel processo di **glicogenesi**. Quando il glucosio è necessario come fonte di energia, il glucagone viene idrolizzato dal **glicogeno fosfato forilasi** che genera glucosio nel processo di **glicogenolisi**, dando così un immediato supplemento energetico a tutte le parti del corpo. La fisiopatologia dell'insulina e le sue condizioni biochimiche associate sono rappresentate in **figura 2.1.a**, la quale mostra che GLUT2 è presente nelle cellule beta

pancreatiche. Il glucosio presente nel sangue arriva alla membrana plasmatica pancreatica, poi grazie al trasportatore GLUT2 il glucosio raggiunge le cellule beta. L'elevata concentrazione di glucosio all'interno della cellula abbassa la quantità di cellule beta così da produrre più ATP nella glicolisi e nella respirazione cellulare, aumentando a sua volta il rapporto intracellulare tra ATP e ADP all'interno delle cellule β . Le cellule beta hanno dei canali potassio sensibili a questo rapporto, di conseguenza l'aumento di ATP provoca la chiusura dei canali potassio, provocando un accumulo di ioni di potassio all'interno della cellula generando così la depolarizzazione della cellula. Questo cambiamento di potenziale di membrana provoca l'apertura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti, permettendo al calcio di fluire nella cellula. Il calcio a sua volta attiva i granuli di insulina che si fondono con la membrana plasmatica, rilasciando così insulina nel sangue. La **figura 2.1.b** mostra che in condizioni normali, l'insulina si lega al **recettore insulinico** (IRS-1) attivandolo. Quindi IRS-1 di conseguenza può attivare PI3Kinase che porta alla fosforilazione e all'attivazione di AKT (proteina chinasi) che stimola la traslocazione pancreatica di GLUT2 e GLUT4 dal citosol alla membrana plasmatica e i trasportatori a sua volta favoriscono l'assorbimento del glucosio dal sangue. Infatti, il GLUT4 attivato dall'insulina è usato dalle cellule del tessuto adiposo e muscolare per acquisire glucosio dopo i pasti. La **figura 2.1.c** è caratterizzata da elevati livelli di glucosio nel sangue a causa della carenza di insulina, dovuto a un problema nella produzione dalle cellule beta oppure a causa della resistenza all'insulina (Mariadoss et al., 2022).

Recettore insulinico

Il recettore insulinico fa parte dei recettori ad attività enzimatica. Possiede un unico filamento che attraversa il doppio strato lipidico, composto da un dominio esterno che lega l'ormone e un dominio interno che ha attività enzimatica. Il recettore è un dimero di dimeri (2 a-2 b), l'insulina lega la sub a, il recettore a sua volta cambia conformazione e attiva la sub b che ha attività **TIROSIN CHINASICA** (fosforilazione) e le due sub b si fosforilano l'una con l'altra (**PROCESSO DI AUTOFOSFORILAZIONE DELL'ENZIMA**). L'enzima poi può legare altre proteine che possono essere fosforilate dando effetti intracellulari. (Figura 2.2.) Es. aumento dei trasportatori del glucosio.

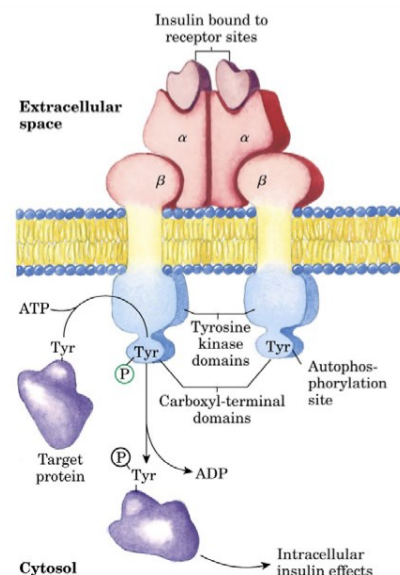


Figura 2.2. Recettore insulinico.

L'insulina inizialmente viene sintetizzata come **PREPROINSULINA**, successivamente la sua parte N-terminale formata da residui AA viene tagliata per sintetizzare la **PROINSULINA**, la quale va nell'apparato di Golgi dove subisce la proteolisi in cui il peptide C viene eliminato e rimane l'insulina matura che viene immagazzinata in vescicole.

Diagnosi del diabete mellito

Il metodo principale di diagnosi del diabete è la misurazione della glicemia, il quale può determinare la presenza di uno stato **iperglicemico** o la presenza di **emoglobina glicosilata (>6.5%)**. I test principali sono:

- Misurare la glicemia al mattino dopo almeno 8 ore di digiuno, **valori >126mg/dl** sono considerati indicativi di diabete.
- Glicosuria (presenza di zucchero nelle urine).
- Prelievo del sangue con valutazione dell'emoglobina glicosilata (HbA1c), dà una valutazione media della glicemia degli ultimi 2-3 mesi e, **se superiore a 6,5%**, può indicare la presenza di diabete.
- Oral Glucose Tolerance Test (OGTT): il test consiste nel fare bere una bevanda contenente 75 grammi di glucosio e, a distanza di 2 ore, glicemia **uguale o superiore a 200 mg/dl** indica la presenza di diabete.

Quindi la diagnosi di **diabete** si pone in ognuno di questi casi:

- Riscontro di almeno due valori di glicemia a digiuno ≥ 126 mg/dl.
- In presenza di sintomi tipici del diabete (poliuria, polidipsia, dimagrimento) e riscontro di glicemia casuale ≥ 200 mg/dl.
- Glicemia ≥ 200 mg/dl dopo due ore dal carico orale di glucosio (OGTT).

Inoltre, esistono delle condizioni intermedie che indicano una predisposizione a sviluppare il diabete, si tratta **dell'Alterata Glicemia a Digiuno** e **della Ridotta Tolleranza Glucidica**.

Si parla di **Alterata Glicemia a Digiuno** nel caso di riscontro di almeno due valori di glicemia, compresi fra 110 e 126 mg/dl a digiuno. In questo caso si consiglia di eseguire OGTT almeno una volta l'anno. Invece, si definisce la **Ridotta Tolleranza Glucidica** nel caso di almeno due valori compresi fra 140 e 200 mg/dl di glicemia, 2 ore dopo carico orale di glucosio.

Una volta effettuata la diagnosi di diabete, si può fare una ricerca nel sangue di **autoanticorpi** rivolti contro antigeni pancreatici (*anti GAD*, *anti IA2*, *anti-insulina*), per classificare il tipo di diabete.

2.2 La correlazione con lo stress ossidativo

In diverse condizioni patologiche, incluso il diabete, l'equilibrio redox può essere disturbato con conseguenze negative per la cellula. I principali meccanismi molecolari associati allo stress ossidativo nel diabete mellito (DM) sono associati al metabolismo del glucosio e dei lipidi. Pertanto, vengono prese in considerazione diverse vie metaboliche che stimolano lo sviluppo dello stress ossidativo in condizioni glicemiche: la via glicolitica, la formazione potenziata di prodotti finali della glicazione avanzata (AGE), la via dell'esosamina, l'attivazione della proteina chinasi C (PKC) e la via dei polioli.

- **Via glicolitica:** in condizioni di iperglicemia, si osserva un'eccessiva produzione di ROS durante le reazioni di glicolisi che porta al danno del DNA e alla successiva attivazione della **poli-ADP-ribosio polimerasi 1 (PARP1)**, un enzima che ripara il DNA. PARP1 però inibisce l'attività della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GA3PDG), che porta all'accumulo di gliceraldeide-3-fosfato (GA3P) e di altri intermedi della glicolisi (es. fruttosio-6-P e glucosio- 6-P). L'aumento del contenuto di GA3P attiva altre vie pro-ossidanti e inoltre il suo accumulo può causare l'auto-ossidazione del glucosio, che a sua volta porta alla formazione del perossido di idrogeno, il quale contribuisce allo stress ossidativo.
- **Via dell'esosamina dell'ossidazione del glucosio:** in condizioni di iperglicemia, il livello di fruttosio-6-P aumenta e la molecola viene trasformata dall'enzima **glucosamina-fruttosio aminotransferasi** in glucosamina-6-fosfato, la quale successivamente si trasforma in uridina fosfato-N-acetil-glucosamina (UDP-GlcNAc) attraverso l'attività dell'enzima **acetilglucosamina-1-fosfato uridiltransferasi**. L'accumulo di UDP-GlcNAc innesca l'attivazione dell'O-glucosamina-N-acetiltransferasi, che è associata al ruolo pro-ossidante della via dell'esosamina nel diabete mellito.
- **Attivazione di PKC:** l'enzima **poli-ADP-ribosio polimerasi 1 (PARP1)** viene attivato in risposta al danno al DNA causato dallo stress ossidativo. PARP1 inibisce l'attività di GA3PDG, che porta all'accumulo di GA3P e del suo isomero diidrossiacetone-3-fosfato (DHA3P). DHA3P, in presenza di acidi grassi liberi, viene ossidato a glicerolo-3-fosfato da un enzima deidrogenasi formando il **diacilglicerolo**, che interagisce con il recettore AGE, stimolando reazioni di stress ossidativo attraverso l'attivazione della proteina chinasi C.
- **Via dei polioli dell'ossidazione del glucosio:** nell'iperglicemia si attiva l'aldoso reductasi, che porta ad un aumento del livello di sorbitolo, il quale viene convertito dal sorbitolo deidrogenasi in fruttosio. Alti livelli di fruttosio causano l'accumulo di

GA3P e DHAP che portano allo stress ossidativo a causa della formazione di metilgliosale e dell'attivazione di PKC. Inoltre, l'aumento dell'attività dell'aldoso reductasi provoca una diminuzione dei livelli di NADPH, che successivamente porta all'attività della GPx e quindi alla diminuzione dei livelli di glutatione.

- **AGE**: alcune reazioni del metabolismo degli zuccheri porta allo stress carbonilico, cioè alla formazione dei precursori degli AGE che promuovono lo stress cellulare. Per esempio, l'auto-ossidazione del glucosio può verificarsi a causa del suo accumulo nelle cellule, che a sua volta porta alla formazione del **gliosale** (precursore AGE). I metaboliti del glucosio, come GA3P e diidrossiacetone-3-fosfato, attraverso la reazione di defosforilazione non enzimatica forma **metilgliosale** (precursore di AGE). Il gliosale e il metilgliosale si legano a diversi recettori AGE o interagiscono con diverse biomolecole generando stress ossidativo diretto o indiretto attraverso l'attivazione della proteina chinasi C. Il **3-deossiglucosone** è il terzo precursore di AGE ed è formato dalla scissione dell'addotto derivato dal glucosio della lisina 1-amino-1-deossifruuttosio, comunemente indicato come prodotto di Amadori. Inoltre, è stato scoperto che anche altri componenti della matrice extracellulare, lipidi e acidi nucleici, possono essere convertiti in AGE (Darenskaya et al., 2021a).

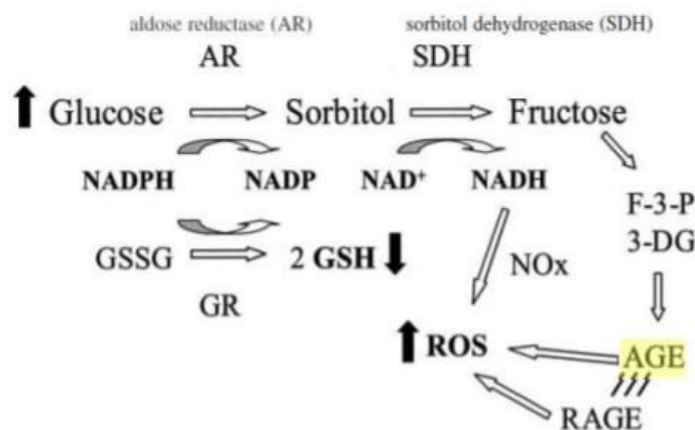


Figura 2.3. Reazione che può generare AGE.

Quindi il glucosio in concentrazioni elevate porta a reazioni non volute nell'organismo, sviluppando la produzione degli AGEs. (Figura 2.3.) Sono reazioni che si innescano tra glucosio e proteine; il glucosio reagisce con proteine e forma dei ponti non fisiologici cambiando la struttura della proteina e quindi di conseguenza la loro l'attività, come per esempio la formazione **dell'emoglobina glicata (HbA1c)**. (figura 2.4.) HbA1c quando aumenta indica la presenza di moltissimo zucchero nel sangue, viene usata come test

per determinare il diabete. Misurando HbA1c si ha l'indicazione nel tempo di qual è stato il valore della glicemia nelle settimane/mesi precedenti.

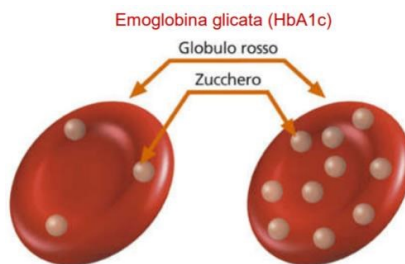


Figura 2.4. Emoglobina glicata.

Il livello degli AGEs può essere limitato introducendo una minore quantità di glucosio ma anche limitando l'apporto esogeno degli AGEs poiché una certa quota deriva pure dall'alimentazione. Si parla di AGEs quando si fa riferimento alla reazione di Maillard e quindi la tipologia di cottura di un alimento può condizionare la presenza di queste molecole nei cibi che ingeriamo. (Tabella 2.1.)

Tabella 2.1. Illustra come cambia il contenuto di AGEs in base alla tipologia di cottura.

Food	Nutrient content, g/100 g of food			Cooking conditions		AGE content			
	Protein	Carbohydrate	Fat	Temperature, °C	Time, min	Units/g protein before cooking	Units/g protein postcooking	Fold increase post/before cooking	Units/100 g of food postcooking
Cereal (granola)	10	43	29	175	25	4,730	19,340	×4	193,400
Pastry (donut)	7	46	14	160	5	2,590	60,820	×24	425,740
Cake (Berlin)	6.4	45	18	200	50	2,220	131,000	×59	838,400
Duck skin (roasted)	35	67	4	220	110	2,350	236,180	×101	6,259,000

Attraverso la nostra cultura alimentare possiamo modulare la quantità di queste sostanze. Ci sono diversi studi che indicano come un elevato livello di AGEs alimentare nei cibi sia correlato al danno vascolare come conseguenza del diabete di tipo II. Il ruolo dello stress ossidativo non solo promuove l'insorgenza del diabete, ma aggrava le condizioni della malattia e le sue complicanze associate. L'evidenza sperimentale implica il ruolo dei ROS nella compromissione della funzione delle cellule beta causata da reazioni autoimmuni, citochine e proteine infiammatorie nel diabete di tipo 1. Inoltre, è stato dimostrato in alcuni studi che l'iperglicemia promuove lo stress ossidativo attraverso la generazione di nuovi radicali liberi e la soppressione dei sistemi di difesa antiossidante. In condizioni di iperglicemia cronica, la produzione di ROS aumenta e quindi enzimi antiossidanti ed antiossidanti non enzimatici sono gravemente soppressi in vari tessuti, il che aggrava ulteriormente lo stress ossidativo. Questo spiega perché le persone diabetiche tendono ad avere ambienti cellulari più ossidativi rispetto agli individui sani (Darenskaya et al., 2021b).

Studi sperimentali di reazioni di stress ossidativo nel diabete mellito (DM).

I modelli non genetici di diabete alloxanico (AX) e streptozotocina (STZ) sono considerati i modelli sperimentali più comuni nello studio delle reazioni di stress ossidativo. AX e STZ si presentano come analoghi strutturali del glucosio, i quali possono legarsi al trasportatore del glucosio GLUT2 e accumularsi selettivamente nelle cellule beta del pancreas, così danneggiandole. Questi *diabetogeni* o varie combinazioni di STZ con una dieta ipercalorica, sono usate quindi per creare un modello di DM1. In condizioni di AX DM è stata osservata una diminuzione del numero di gruppi tiolici, che ha confermato quindi disturbi nella rigenerazione di fattori antiossidanti a basso peso molecolare, inoltre, si è osservato che in condizioni di iperglicemia, si ha l'attivazione della perossidazione lipidica e disturbi nel metabolismo proteico. Si è visto che nel decimo giorno del modello AX DM, si è sviluppato uno stato di iperglicemia pronunciata, cambiamenti nell'equilibrio pro e antiossidante e una diminuzione delle attività della catalasi e della SOD nel siero del sangue. È stato dimostrato infatti che l'effetto citotossico di AX è realizzato a causa dell'azione dei radicali liberi e dell'ossidazione dei gruppi proteici SH, che porta alla necrosi, nonché a causa di disturbi nell'omeostasi del calcio e destabilizzazione delle membrane mitocondriali, seguita dalla cascata di segnali che attiva l'apoptosi. Nel modello STZ DM, si è vista una pronunciata attivazione delle reazioni LPO, cambiamenti nel metabolismo energetico (es. inibizione della sintesi aerobica di ATP), e quindi alterazioni dello stato funzionale delle membrane cellulari. Studi recenti hanno dimostrato che anche nelle prime fasi della STZ DM nei ratti, l'intensità di LPO aumenta sullo sfondo di attività ridotte degli enzimi antiossidanti e bassi livelli di acidi grassi ω 3. L'iperglicemia indotta da streptozotocina è efficacemente ridotta dall'aumentata espressione dei geni che codificano SOD2 e catalasi, il che implica il coinvolgimento di ROS chiave nella disfunzione delle cellule beta (Darenskaya et al., 2021b).

Studi clinici delle reazioni di stress ossidativo nel diabete mellito (DM).

La maggior parte degli studi caso-controllo afferma un aumento di biomarcatori di danno ossidativo a lipidi, proteine e acidi nucleici nei pazienti con prediabete, DM1 e DM2 rispetto ai controlli. Pertanto, è stato dimostrato che nei pazienti con DM1 vi è una maggiore generazione di prodotti reattivi accompagnati da una diminuzione dell'attività dell'enzima antiossidante. Negli studi è stato notato che l'aumento delle reazioni LPO porta a cambiamenti nell'interazione dell'insulina con i suoi recettori, poiché MDA lega in modo covalente sia i lipidi che le proteine nelle membrane cellulari, con la formazione di legami incrociati e ciò porta a problemi nell'internalizzazione dei recettori dell'insulina e a una diminuzione del numero di siti di legame all'insulina. Tra i diversi biomarcatori da stress ossidativo valutati in pazienti con DM2, i risultati più coerenti sono stati i livelli dei prodotti reattivi: AGE plasmatici, gruppi carbonilici delle proteine nel plasma, così come il livello urinario di 8-idrossi-deossiguanina (8-OHdG). Questi indicatori erano elevati e strettamente correlati con un controllo insoddisfacente della glicemia. Ci sono ampi dati sui sistemi antiossidanti nei pazienti con DM2 in cui c'è stata una diminuzione della capacità antiossidante totale del plasma sanguigno, in cui c'è un basso livello di antiossidanti non enzimatici. Allo stesso tempo, nei pazienti affetti da DM complicato da malattie cardiovascolari, le attività di SOD, GPx e GR sono diminuite significativamente. Ci sono dati secondo cui lo stress ossidativo gioca un ruolo cruciale nell'infiammazione sistemica, che contribuisce alla patofisiologia delle complicanze macro e microvascolari nel DM. Inoltre, il DM modifica significativamente il profilo lipidico e rende le cellule più suscettibili alla LPO e secondo studi recenti, non modifica solo i lipidi LDL, ma anche la componente apolipoproteica, la quale forma aggregati insolubili che generano danno ossidativo nelle complicanze diabetiche. Attualmente, è dimostrato che la natura delle reazioni metaboliche nel DM dipende da molti fattori, tra cui l'età, il sesso e fattori etnici. Per esempio, è stato riscontrato che nelle donne in età riproduttiva con DM1, i disturbi della funzione mestruale si verificano con una mancanza di α -tocoferolo, GSH, bassa attività SOD e un aumento della concentrazione di glutatione ossidato. Negli studi clinici inoltre vengono stabiliti i biomarcatori dello stress ossidativo nella genesi delle complicanze vascolari del DM, in cui vengono introdotti nuovi metodi di valutazione, in particolare un metodo, la **chemiluminescenza cinetica**, che determina l'attività plasmatica antiossidante e pro-ossidante nell'organismo. Questo metodo in combinazione con studi clinici, di laboratorio e strumentali permette di valutare meglio le condizioni del paziente, ai fini di diagnosi della malattia e per la terapia più adatta (Darenskaya et al., 2021b).

2.3. I Rimedi

2.3.1 I rimedi sintetici: TRATTAMENTO FARMACOLOGICO DM 1

Il diabetico con DM1 deve assumere per tutta la vita l'insulina evitando così di avere l'iperglicemia. La terapia prevede la somministrazione di insulina per iniezione sottocutanea, gli ipoglicemizzanti orali non possono essere utilizzati per questa tipologia di diabete. Esistono più forme di insulina, distinte in base al tempo di latenza, al tempo di picco e alla durata d'azione. (Figura 2.5.)

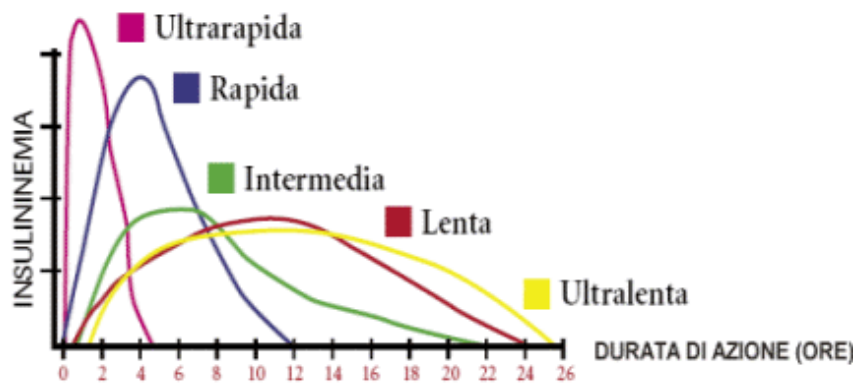


Figura 2.5. Farmacocinetica delle diverse forme di insulina.

Tipologie:

- **Insulina ad azione ultrarapida:** l'azione del farmaco si manifesta dopo 10-15 minuti dall'iniezione, per questo tali insuline sono utilizzate poco prima del pasto per il controllo della glicemia postprandiale. Es. farmaco (**Humalog**).
- **Insulina ad azione rapida:** l'azione del farmaco si manifesta in circa 30 minuti e scompare dopo 4-8 ore. Il farmaco deve essere assunto mezz'ora prima del pasto oppure quando la glicemia si alza eccessivamente. Es. farmaco (**Actrapid**)
- **Insulina ad azione intermedia:** l'azione del farmaco si manifesta dopo un paio d'ore e la durata d'azione è garantita per 8-12 ore. Spesse volte, viene associata all'insulina lenta per il controllo del livello di glucosio nel sangue prima del pranzo. Es. farmaco (**Insuman Basal**).
- **Insulina lenta:** l'azione del farmaco si manifesta dopo un paio d'ore e la durata d'azione è garantita dalle 18-24 ore. Il rallentamento dell'azione terapeutica del farmaco è reso possibile dalla presenza dello zinco. In genere, sono necessarie solamente due iniezioni di insulina lenta al giorno per garantire un livello costante

della glicemia. È possibile assumere questa insulina insieme a insulina rapida in concomitanza dei pasti. Es. farmaco (**Tresiba**)

- **Insulina ultralenta:** l'attività d'azione di questo farmaco è ultralenta; pertanto, è sufficiente una sola iniezione al giorno. È possibile associare altre tipologie di insuline (rapide) poco prima del pasto. Es. farmaco (**Ultratard**).

2.3.2 I rimedi sintetici: TRATTAMENTO FARMACOLOGICO DM 2

La terapia ipoglicemizzante orale è la scelta principale per il trattamento del diabete di tipo 2, in quanto è caratterizzato da insulino-resistenza e non da insulino-deficienza come avviene nel diabete di tipo 1. In alcuni casi complicati si può fare l'uso diretto di farmaci insulinici. In seguito, sono riportate le principali classi di farmaci impiegate nella terapia contro il DM2.

- **Secretagoghi dell'insulina:** ne fanno parte le **Sulfoniluree** che è la classe di farmaci orali ipoglicemizzanti più nota. Questi farmaci agiscono aumentando la secrezione di insulina dal pancreas. Queste molecole legano il recettore della sulfanilurea (SUR), di conseguenza bloccano il canale del potassio ATP e generano una depolarizzazione della membrana, favorendo così l'ingresso nella cellula di ioni calcio e l'esocitosi delle vescicole che contengono insulina, la quale entra in circolo e diminuisce i livelli di glucosio. Le Sulfoniluree di prima generazione sono **Tolbutamide, Clorpropamide, Tolazamide**, e quelle di seconda generazione: **Glibenclamide, Glipizide, Glimepiride**, le quali hanno un'emivita plasmatica più breve e maggiore durata d'azione. Gli effetti collaterali della Sulfanilurea sono i segni che generano il basso livello di zucchero nel sangue, quindi vertigini, sudorazione, confusione, nervosismo e riduzione di peso. L'altra classe di farmaci sono le **Metiglinidi** e il loro meccanismo d'azione è analogo a quello delle Sulfoniluree (Padhi et al., 2020).

- **Biguanidi:** le molecole di questa categoria sono la Metformina, la Fenformina e la Buformina. La Fenformina e la Buformina sono state ritirate dall'uso clinico a causa di un'elevata incidenza di acidosi lattica associata, mentre la Metformina ha un rischio molto più basso di acidosi lattica, quindi viene molto utilizzata. La Metformina migliora la risposta del corpo all'insulina, diminuisce l'assorbimento del glucosio a livello intestinale e riduce la produzione epatica di glucosio prodotta dal fegato diminuendo così l'attività della gluconeogenesi e stimolando la glicolisi. Inoltre, questa classe aumenta l'attività del recettore dell'insulina. Le biguanidi non causano ipoglicemia, inoltre mostrano un effetto anti-ipertrigliceridemizzante e proprietà vasoprotettive. Le biguanidi hanno effetti avversi comuni di tipo disturbi gastrointestinali, tra cui diarrea, crampi, nausea, vomito. Inoltre,

l'uso a lungo termine è associato a un ridotto assorbimento della vitamina B12 (Padhi et al., 2020).

- **Sensibilizzanti dell'insulina**: sono noti anche come agonisti del recettore PPAR. I PPAR sono i regolatori del metabolismo delle proteine e dei carboidrati e mantengono l'omeostasi del glucosio. Questi recettori sono di tre sottotipi (PPAR α , δ e γ). Gli agonisti PPAR γ sono noti come **Glitazoni**, i quali aumentano la sensibilità delle cellule all'insulina e riducono la produzione sistemica di acidi grassi e il loro assorbimento. L'attivazione di PPAR γ migliora l'assorbimento del glucosio da parte del muscolo scheletrico e diminuisce la produzione di glucosio ritardando così la gluconeogenesi. Le molecole più comuni di questo sottotipo sono il **Pioglitazone, Rosiglitazone e Ciglitazone** e sono associate ad effetti collaterali comuni come edema, aumento di peso e insufficienza cardiaca. Inoltre, possono causare ipoglicemia se combinati con altri farmaci antidiabetici. Recentemente si è scoperto che i doppi agonisti PPAR α/γ (**Muraglitazar, Tesaglitazar, Aleglitazar**) hanno una migliore attività antidiabetica. L'attivazione dei recettori PPAR α e PPAR γ produce un'azione sinergica, migliorando il metabolismo lipidico, la sensibilità all'insulina e il controllo dell'infiammazione. Inoltre, la duplice terapia riduce gli effetti collaterali degli agonisti PPAR γ . L'uso di Muraglitazar è stato ritirato dagli studi clinici a causa della cardiotoxicità (Padhi et al., 2020).

- **Gli inibitori dell'alfa-glucosidasi (AGI)**: sono saccaridi che agiscono come inibitori competitivi degli enzimi nell'intestino tenue, rallentando così la digestione dei carboidrati, in modo che il glucosio dal cibo entri nel flusso sanguigno più lentamente, portando a sua volta alla riduzione dell'iperglicemia postprandiale. **L'Acarbose** ottenuto da *Actinomyces utahensis* è stato il primo AGI utilizzato come competitivo dell'enzima alfa glucosidasi. **Voglibose** e **Miglitol** sono altri AGI utilizzati per la gestione del T2DM. Gli effetti collaterali degli AGI includono tipicamente gonfiore, flatulenze e irritazione gastrointestinale. Gli inibitori dell'alfa-glucosidasi non sono raccomandati se la persona ha una malattia infiammatoria intestinale (colite ulcerosa, morbo di Crohn, disturbo digestivo intestinale, chetoacidosi diabetica) e per le donne in gravidanza (Padhi et al., 2020).

- **Agonista del GLP-1**: è un peptide simile al glucagone (GLP), è secreto dalle cellule L dell'intestino dopo l'introduzione del pasto. Il GLP-1 innesca la sintesi e la secrezione di insulina dalle cellule beta del pancreas. Il metabolismo dei carboidrati nelle cellule L dell'intestino provoca la chiusura del canale del potassio ATP-dipendente e la depolarizzazione della membrana, che porta all'ingresso di ioni calcio e questo provoca la secrezione di GLP-1. L'emivita del GLP-1 è di circa 1-2 minuti a causa del rapido metabolismo quindi si sono sviluppati analoghi del GLP-1 con un'emivita più elevata.

Exenatide è stato il primo analogo del GLP-1 altri analoghi sono **Lixisenatide**, **Dulaglutide**, **Liraglutide**. Questi composti aumentano la secrezione di insulina e inibiscono il rilascio di glucagone dando così effetti ipoglicemizzanti che aiutano a ridurre i livelli di HbA1c. Gli effetti collaterali possono essere diarrea, nausea, mal di testa, vertigini, aumento della sudorazione e perdita di appetito (Padhi et al., 2020).

- **Inibitori dell'enzima dipeptidil-peptidasi 4:** questi composti inibiscono l'enzima dipeptidil-peptidasi 4 (DPP-IV). I più comuni inibitori della DPP-IV sono **Sitagliptin**, **Vildagliptin**, **Saxagliptin**. L'enzima DPP-IV è responsabile della degradazione delle incretine GLP-1/GIP. Le incretine sono ormoni prodotti a livello intestinale le cui concentrazioni aumentano in seguito all'assunzione di cibo. Esse inducono l'incremento della biosintesi di insulina, inibiscono la secrezione di glucagone e riducono la produzione epatica di glucosio, determinando un controllo sui livelli di glucosio nel sangue (Padhi et al., 2020).

- **Inibitori SGLT2:** le molecole disponibili in questa categoria sono **Canagliflozin**, **Dapagliflozin**, **Empagliflozin**, le quali inibiscono il trasportatore SGLT2 presente nel tubulo contorto prossimale, che induce il riassorbimento del glucosio e migliora l'escrezione di glucosio nelle urine. Gli inibitori SGLT2 sono usati in monoterapia o in combinazione con Metformina, Sulfanilurea o Tiazolidinedioni o in aggiunta all'insulina (Padhi et al., 2020).

2.3.3 I rimedi naturali

Nel diabete è importante ricordare che la frutta e verdura contengono diverse classi di metaboliti con effetto antiossidante, dando così un impatto positivo nella salute di soggetti diabetici. Tra le verdure consigliate in quanto presentano un indice glicemico (IG) molto basso, troviamo: lattuga, spinaci, bietole, cavolfiori, broccoli, peperoni, zucchine, pomodori e carote. Se consumate a crudo, queste verdure possono essere introdotte nella dieta senza preoccupazione, al contrario, alcune di esse da cotte presentano un IG un po' più alto, che deve essere tenuto in considerazione nel carico glicemico del pasto. I ricercatori hanno utilizzato l'indice glicemico come strumento per illustrare che la stessa quantità di carboidrati (50 g) consumata con cibi diversi può suscitare risposte glicemiche molto diverse. Ad esempio, l'amido nelle lenticchie o nella pasta ha un effetto molto inferiore sui livelli di zucchero nel sangue rispetto all'amido nelle patate bollite o nel pane bianco, che si comportano più come gli zuccheri tradizionali in termini di una risposta glicemica rapida, elevata e pronunciata. La figura 2.6. confronta la risposta glicemica tra 50 g di zucchero assunti come tali e 50 g di porzione di cibi differenti (Jenkins et al., 1981).

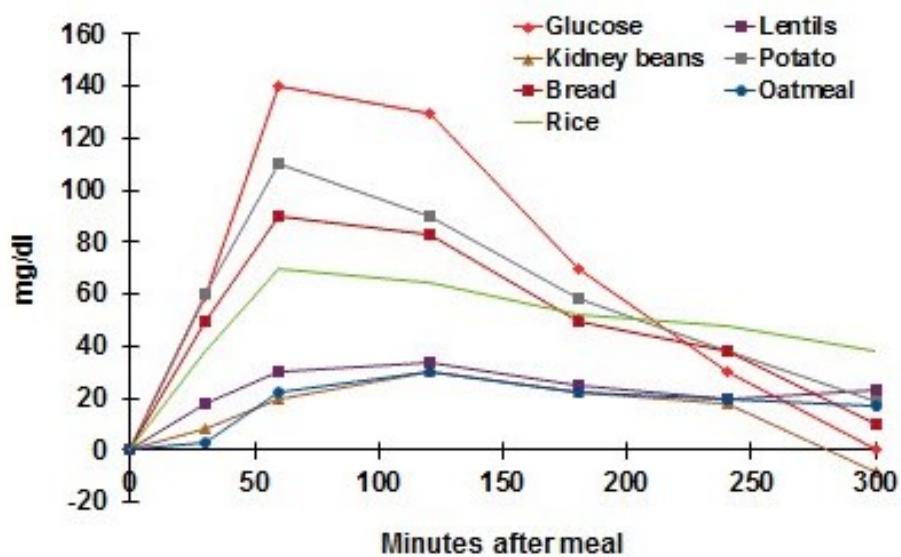


Figura 2.6. Curva di risposta glicemica (Jenkins et al.,1981).

IG può variare molto a seconda del trattamento al quale si sottopone la materia prima, per esempio l'idratazione e il calore aumentano l'indice glicemico di un alimento. Inoltre, è importante sapere anche il carico glicemico di un alimento che equivale alla quantità di quel cibo/IG che viene assunta quotidianamente nell'alimentazione. Quindi bisogna tener conto non solo dell'IG ma anche della quantità che assimiliamo. I corn flakes hanno un IG molto alto ma la quantità che assumiamo è ridotta e quindi il carico glicemico giornaliero non è alto. Mentre il riso che ha un IG medio/alto con la porzione media che assumiamo ho un carico glicemico molto alto. (Figura 2.7.)

ALIMENTO	Indice Glicemico	Porzione media (grammi)	Carboidrati per porzione (grammi)	Carico Glicemico per porzione
Corn flakes	81	30	26	21
Patate (bollite)	78	200	36	28
Pane bianco	75	50	29	22
Pane integrale	74	50	24	18
Riso bianco (bollito)	73	80	64	46
Cocomero	76	150	6	5
Riso integrale (bollito)	68	80	62	42
Ananas	59	150	15	9
Muesli	57	30	22	13
Banana	51	120	18	9
Spaghetti	49	80	63	31
Spaghetti integrali	48	80	53	25
Arancia	43	150	12	5
Carote (bollite)	39	200	15	6

Figura 2.7. Rappresenta IG/CG di alcuni alimenti.

Anche molti tipi di frutta quali amarene e ciliegie contengono un elevato contenuto di sostanze antiossidanti con effetto benefico per i soggetti diabetici. Infatti, questi frutti sono

il punto di partenza per l'estrazione dei fitocostituenti con azione protettiva nei confronti di danni causati dal diabete. Per esempio, pure la frutta secca (noci) protegge i diabetici da infarto e ictus perché vanno a ridurre la produzione di AGEs. Uno studio ha dimostrato le proprietà benefiche delle ciliegie comuni o di altre varietà simili. L'esperimento viene eseguito tramite un modello animale di topo diabetico, in cui viene somministrato alloxana (sostanza usata sperimentalmente per danneggiare le cellule beta del pancreas). Si è studiato il comportamento di pazienti diabetici dopo la somministrazione degli estratti di questi frutti (Figura 2.8.) (Lachin, 2014).

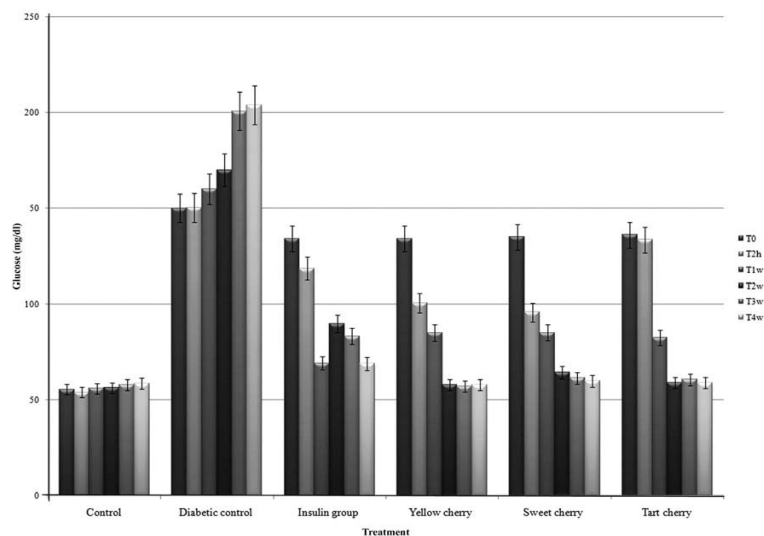
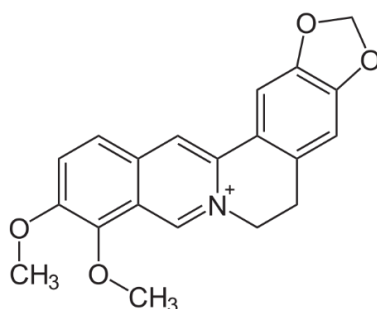


FIGURA 2.8. Grafico che illustra l'effetto dei tre estratti di ciliegia in condizioni di diabete (Lachin, 2014).

I risultati di questo studio affermano che i vari estratti di ciliegie sono utili per stabilizzare la glicemia e diminuire stati iperglicemici di pazienti diabetici, infatti, nel grafico viene dimostrato come abbiano effetti paragonabili all'insulina.

Ad oggi c'è una molecola molto interesse per contrastare il diabete, la berberina. È un alcaloide di tipo ammonico quaternario, le fonti più ricche di questo composto sono due: ***Berberis vulgaris* L.** oppure ***Coptis chinensis* L.**



Berberina



***Berberis vulgaris* L.**



***Coptis chinensis* L.**

La berberina oltre ad avere un effetto antiossidante interagisce con i compartimenti fondamentali per la regolazione della glicemia. La molecola, infatti, agisce a livello del fegato, dove avviene il metabolismo dei grassi oltre a quello degli zuccheri; a livello dell'intestino dove inibisce l'assorbimento di glucosio; a livello mitocondriale favorisce la degradazione di glucosio e riducendo la glicemia; a livello del tessuto adiposo riduce la captazione di glucosio. Uno studio ha dimostrato che la berberina regola il metabolismo del glucosio e dei lipidi sia in vitro che in vivo. Questo studio pilota aveva lo scopo di determinare l'efficacia e la sicurezza della berberina nel trattamento dei pazienti diabetici di tipo 2. Nello studio A, 36 adulti con diabete di tipo 2 di nuova diagnosi sono stati assegnati in modo casuale al trattamento con berberina o metformina (0,5 g tre volte al giorno) in uno studio di 3 mesi. Nello studio B, 48 adulti con diabete di tipo 2 scarsamente controllato sono stati trattati con berberina in uno studio di 3 mesi. Durante lo studio, 20 (34,5%) pazienti hanno sofferto di effetti avversi gastrointestinali transitori. Non sono stati osservati danni funzionali al fegato o ai reni per tutti i pazienti (Yin et al., n.d.).

STUDIO A: lo studio in monoterapia è stato progettato per confrontare la berberina con la metformina. L'effetto ipoglicemizzante della berberina era simile a quello della metformina. Nel gruppo trattato con berberina ci sono state diminuzioni significative: **dell'emoglobina glicata (HbA1c)** da $9,5\% \pm 0,5\%$ a $7,5\% \pm 0,4\%$, **della glicemia a digiuno (FBG)** da $10,6 \pm 0,9$ mmol/L a $6,9 \pm 0,5$ mmol/L, **della glicemia postprandiale (PBG)** da $19,8 \pm 1,7$ a $11,1 \pm 0,9$ mmol/L e **dei trigliceridi plasmatici** da $1,13 \pm 0,13$ mmol/L a $0,89 \pm 0,03$ mmol/L. (Tabella 2.2.) Nel gruppo trattato con berberina non sono state osservate differenze significative tra la settimana 1 e la settimana 13. La berberina ha mostrato un effetto identico alla metformina nella regolazione del metabolismo del glucosio, come HbA1c, FBG, PBG, insulina a digiuno e insulina postprandiale. Nella regolazione del metabolismo lipidico, l'attività della berberina è migliore della metformina. Entro la settimana 13, i trigliceridi e il colesterolo totale nel gruppo berberina erano diminuiti ed erano significativamente inferiori rispetto al gruppo trattato con metformina. ($P < 0,05$) (Yin et al., n.d.).

Tabella 2.2. Fa riferimento allo studio A.

	Metformin (n=16)		Berberine (n=15)	
	Baseline	End point	Baseline	End point
HbA _{1c} (%)	9.15 ± 0.57	7.72 ± 0.43**	9.47 ± 0.65	7.48 ± 0.40**
FBG (mmol/L)	9.96 ± 0.64	7.16 ± 0.71**	10.63 ± 0.88	6.85 ± 0.53**
PBG (mmol/L)	20.53 ± 1.87	12.86 ± 0.77**	19.83 ± 1.66	11.05 ± 0.92**
Fasting insulin (µU/ml)	27.3 ± 4.4	22.9 ± 5.2	29.1 ± 5.3	24.0 ± 5.5
Postprandial insulin (µU/ml)	125.3 ± 29.8	110.5 ± 21.4	120.4 ± 31.4	116.0 ± 26.9
Triglyceride (mmol/L)	1.19 ± 0.12	1.17 ± 0.13	1.13 ± 0.13	0.89 ± 0.03*
Total cholesterol (mmol/L)	4.31 ± 0.28	4.27 ± 0.15	4.40 ± 0.21	3.83 ± 0.09*
HDL-C (mmol/L)	1.25 ± 0.06	1.31 ± 0.08	1.33 ± 0.10	1.22 ± 0.04
LDL-C (mmol/L)	2.55 ± 0.38	2.43 ± 0.11	2.47 ± 0.13	2.36 ± 0.06

Data are means ± SEM. Compared with baseline:

* $P < 0.05$,

** $P < 0.01$

STUDIO B: la terapia di combinazione mirava a valutare gli effetti additivi o sinergici della berberina sui classici agenti antidiabetici. Nei primi 7 giorni di trattamento, la berberina ha portato a una riduzione del **FBG** da $9,6 \pm 2,7$ mmol/L a $7,8 \pm 1,8$ mmol/L e del **PBG** da $14,8 \pm 4,1$ mmol/L a $11,7 \pm 3,6$ mmol/L. Durante la seconda settimana, FBG e PBG sono ulteriormente diminuiti, hanno raggiunto un nadir rispettivamente di $2,1$ mmol/L ($7,5 \pm 2,1$ mmol/L) e $3,3$ mmol/L ($10,5 \pm 2,5$ mmol/L) al di sotto del basale. Nella terapia di combinazione di 5 settimane, la berberina ha portato a una riduzione dell'**HbA1c** dall'8,1% al 7,3%. (Tabella 3.3.). Anche FBG e PBG sono diminuiti notevolmente. L'insulina a digiuno e HOMA-IR sono stati ridotti rispettivamente del 29,0% e del 46,7%. I lipidi ematici inclusi trigliceridi, colesterolo totale e LDL-C sono diminuiti ed erano significativamente inferiori. Non sono stati osservati cambiamenti significativi nei criteri tra la quinta e la tredicesima settimana, ad eccezione dell'incremento del peptide C a digiuno e del peptide C postprandiale. Durante lo studio, il peptide C a digiuno dei pazienti con trattamento insulinico è diminuito e poi aumentato e il peptide C postprandiale è aumentato del 70,5% a 13 settimane (Yin et al., n.d.).

Tabella 2.3. Fa riferimento allo studio B.

	Week 0	Week 5	Week 13
BMI	26.0 ± 0.6	26.1 ± 0.8	26.0 ± 0.8
Waist (cm)	89.0 ± 1.5	86.9 ± 1.8 *	87.0 ± 1.7
Waist/hip	0.89 ± 0.01	0.86 ± 0.01 *	0.86 ± 0.01
HbA _{1c} (%)	8.1 ± 0.2	7.3 ± 0.2 ***	7.3 ± 0.3 ***
FBG (mmol/L)	9.6 ± 0.4	7.6 ± 0.3 ***	7.6 ± 0.3 ***
PBG (mmol/L)	14.8 ± 0.7	10.8 ± 0.6 ***	9.7 ± 0.9 **
Fasting insulin (μU/ml)	35.2 ± 3.3	25.0 ± 2.6	25.3 ± 5.3 **
Postprandial insulin (μU/ml)	104.1 ± 9.5	88.0 ± 11.4	76.5 ± 15.6
HOMA-IR	15.2 ± 1.6	8.1 ± 1.0	8.4 ± 1.8
HOMA-β cell	128.6 ± 12.2	164.2 ± 27.3	151.7 ± 28.6
Fasting C-peptide (ng/ml)	0.96 ± 0.28	0.85 ± 0.24	1.12 ± 0.12 **
Postprandial C-peptide (ng/ml)	2.27 ± 0.72	2.28 ± 0.80	3.87 ± 0.14 **
Total cholesterol (mmol/L)	1.73 ± 0.17	1.39 ± 0.15 **	1.49 ± 0.49
Triglyceride (mmol/L)	4.97 ± 0.13	4.20 ± 0.13 ***	4.38 ± 0.40
HDL-C (mmol/L)	1.37 ± 0.04	1.31 ± 0.05	1.32 ± 0.05
LDL-C (mmol/L)	3.00 ± 0.10	2.50 ± 0.10 ***	2.59 ± 0.27 **
ALT (U/L)	31.5 ± 4.1	26.5 ± 2.6	25.2 ± 7.0
γ-GT (U/L)	41.8 ± 7.8	41.5 ± 8.4	41.4 ± 1.2
Creatinine (mmol/L)	88.5 ± 3.1	90.8 ± 3.7	90.8 ± 8.1

Data are means ± SEM of the patients with combination-therapy including berberine. Values of fasting insulin, postprandial insulin, HOMA-IR and HOMA-β cell were obtained from 33 patients treated only with oral hypoglycemic agents. Values of fasting c-peptide and postprandial c-peptide were obtained from the other 10 patients treated including insulin. The rest parameters were obtained from all the 43 patients with combination-therapy.

Compared with Week 0:

* $P < 0.05$.

** $P < 0.01$.

*** $P < 0.001$.

Ricapitolando sia la berberina che la metformina hanno ridotto significativamente FBG e PBG dei pazienti diabetici di tipo 2 dalla settimana 1 alla settimana 13. La figura 2.9. illustra 3 grafici, il grafico A è riferito a 15 pazienti trattati con la sola berberina; il grafico B a 16 pazienti trattati con la sola metformina; grafico C a 43 pazienti trattati con terapia di combinazione inclusa la berberina (Yin et al., n.d.).

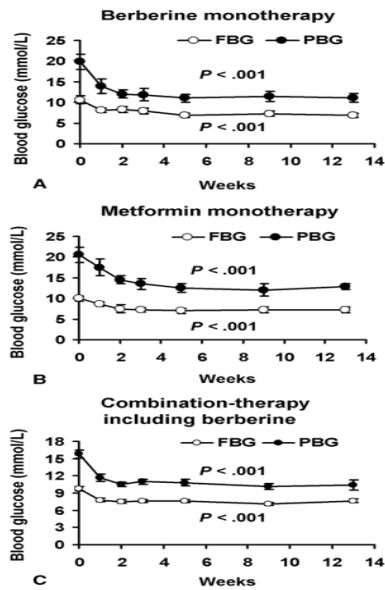


Figura 2.9. Grafici andamento di FBG e PBG.

In conclusione, dai dati ottenuti da questo studio pilota si può affermare che la berberina è un potente agente ipoglicemizzante con effetti benefici sul metabolismo del glucosio e dei lipidi.

La berberina, infatti, grazie alle sue proprietà ipoglicemizzante viene molto apprezzata nel campo terapeutico per trattare soggetti diabetici. Vengono prodotti diversi fitopreparati a base di questa molecola. (Figura 2.10.-2.11.)



Modalità d'uso: assumere 1 capsula (350 mg di berberina) al giorno in corrispondenza di un pasto e con liquidi a sufficienza.

Figura 2.10. Berberina in capsule.



Modalità d'uso: assumere 40 gocce (2ml) diluite in acqua, da una a tre volte al giorno in qualunque momento (da 40 a 120 gocce al giorno).

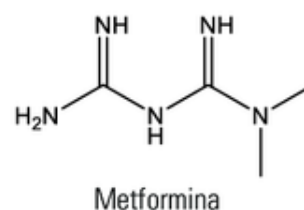
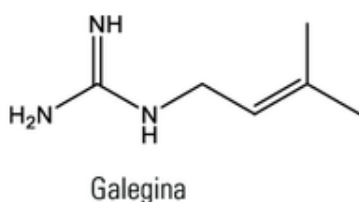
Figura 2.11. Tintura madre di *Berberis vulgaris*.

Un'altra pianta officinale molto interessante per contrastare il diabete è *Galega officinalis* L., pianta erbacea perenne appartenente alla famiglia delle Fabaceae.



***Galega officinalis* L.**

La parte di pianta utilizzata (droga) ai fini terapeutici è la porzione aerea. La galega contiene principalmente: alcaloidi (galegina e galuteolina), flavonoidi, saponine, sostanze amare, tannini, zuccheri e grassi. Questi fitocostituenti conferiscono alla pianta proprietà antidiabetiche e galattogoghe. Più precisamente i derivati cumestanici e le saponine vanno a stimolare la prolattina e portano a un miglioramento della circolazione della ghiandola mammaria. La galegina, invece, ha mostrato avere proprietà ipoglicemizzanti, agisce stimolando le cellule del pancreas, riduce la produzione di glucagone e riequilibra i livelli glicemici. Il suo effetto sulla regolarità della glicemia deriva principalmente dal potenziamento degli effetti dell'insulina, ma anche dalla riduzione della produzione di glucosio epatico e dell'assorbimento intestinale degli zuccheri (Hachkova et al., 2021). Ad oggi sono state create molte droghe sintetiche della classe delle biguanidi, questi composti sono analoghi strutturali della galegina, infatti, il farmaco ipoglicemizzante orale **Metformina** viene considerato un derivato di semi sintesi della galegina.



Nello studio effettuato da Hachkova et al. sono state studiate le proprietà ipoglicemizzanti e antiossidanti degli estratti di *G. officinalis*, in cui si è voluto dimostrare l'effetto ipoglicemizzante dell'estratto privo di alcaloidi, alla dose di 600 mg/kg nel diabete mellito sperimentale. L'effetto ottenuto dalla somministrazione dell'estratto è una diminuzione

della concentrazione di glucosio e di emoglobina glicata nel sangue, l'aumento della tolleranza al glucosio delle cellule e l'aumento del contenuto di peptide C- insulina nel plasma del sangue dei ratti. Inoltre, in questo studio si è voluto confermare sperimentalmente l'effetto citoprotettivo dell'estratto sulle cellule pancreatiche alla dose di 1200 mg/kg. L'esperimento di questo studio è stato eseguito su ratti Wistar maschi di tre mesi. I ratti sono stati divisi in modo non sistematico nei gruppi (n = 5-8/gruppo): animali di controllo (C); animali di controllo trattati con estratto di *Galega officinalis* alle dosi di 600 mg e 1200 mg/kg al giorno (C + G) per 14 giorni; animali con diabete mellito indotto da streptozotocina (D); animali con diabete trattati con estratto di *Galega officinalis* alle dosi di 600 mg e 1200 mg/kg al giorno (D + G) a partire dal 15° giorno dall'induzione del diabete per 14 giorni (Hachkova et al., 2021).

I risultati ottenuti da questo studio dimostrano quindi che in condizioni di diabete mellito, la frazione non alcaloide dell'estratto di galega ha un elevato effetto ipoglicemizzante, infatti, la somministrazione di questo estratto ad animali diabetici ha comportato una riduzione del 63% della concentrazione di glucosio nel sangue. Tuttavia, nel caso dell'introduzione dell'estratto di galega negli animali di controllo, il contenuto di glucosio nel sangue non è cambiato in modo significativo (Figura 2.12.). Sullo sfondo dell'iperglicemia, che si sviluppa nei ratti con diabete, è stato mostrato un aumento del contenuto di emoglobina glicosilata del 66% rispetto al controllo. L'estratto invece ha comportato una diminuzione del 41% del contenuto di HbA1c negli animali diabetici (Figura 2.12.) (Hachkova et al., 2021).

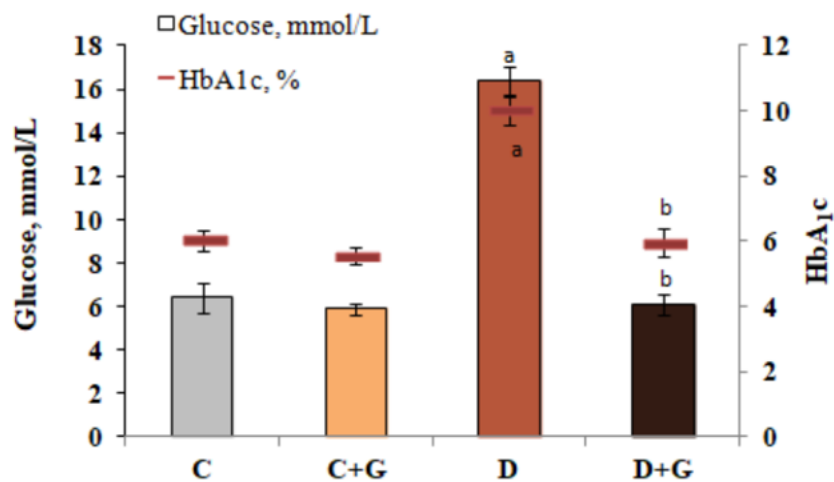


Figura 2.12. Effetto dell'estratto di *Galega officinalis* sul contenuto di glucosio e di emoglobina glicata in condizioni normali e diabetiche.

Successivamente è stato affermato l'effetto anti-iperglicemico dell'estratto. Nello studio è stata valutata la capacità dell'estratto di ridurre il glucosio al massimo sviluppo di iperglicemia dopo il carico di glucosio. Per valutare la risposta totale è stata calcolata l'AUCglu, la quale riflette l'aumento della concentrazione di glucosio dopo la somministrazione dello zucchero e la sua diminuzione dopo la somministrazione dell'estratto. Nella figura 2.13. A vengono mostrate le curve glicemiche di animali sani e diabetici ai quali è stato somministrato l'estratto di galega officinalis per 14 giorni. L'aumento massimo del livello di glucosio nel sangue degli animali del gruppo controllo è stato registrato al ventesimo minuto dopo la somministrazione di glucosio per via OS alla dose di 1g/kg corporeo, pure negli animali diabetici l'aumento massimo della concentrazione di glucosio nel sangue è stato registrato al ventesimo minuto. Si è visto inoltre che l'utilizzo del glucosio è più lento negli animali diabetici rispetto agli animali di controllo e mantenendo un alto livello di glicemia nel periodo post assorbimento va a diminuire la tolleranza al glucosio negli animali diabetici. Somministrando l'estratto di galega agli animali del gruppo controllo il picco di concentrazione del glucosio si sposta dal ventesimo all'ottantesimo minuto, mentre negli animali diabetici, il picco è stato registrato al sessantesimo minuto. Questo indica che l'estratto favorisce un assorbimento più lento del glucosio nel tratto gastrointestinale che porta di conseguenza a un carico più uniforme sul pancreas durante tutto il processo digestivo. L'uso dell'estratto ha contribuito all'aumento della tolleranza del glucosio e ciò ha portato a una diminuzione AUCglu. (Figura 2.13. B) (Hachkova et al., 2021).

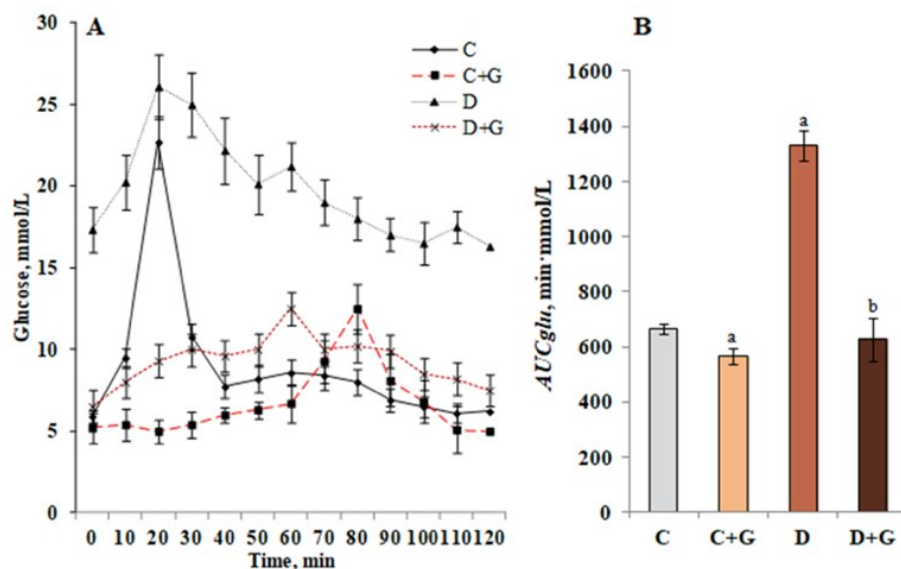


Figura 2.13. A Curve glicemiche – **Figura 2.13. B** Area sottostante le curve glicemiche.

Successivamente è stato eseguito l'esame istologico delle cellule pancreatiche. L'analisi morfometrica delle isole pancreatiche ha mostrato che in condizione di diabete il numero

per unità di area standard è diminuito di 3,6 volte rispetto al gruppo di controllo. Ci sono stati pure cambiamenti nei parametri (area, volume, diametro) delle isole del pancreas (Tabella 2.4.). Nella figura 2.14. D (in condizione di diabete), le cellule secretorie delle isole di L. hanno rilevato processi degenerativi: vacuolizzazione del citoplasma, focolai di necrosi e confini cellulari sfuocati. Inoltre, il numero di cellula beta e dei loro granuli è diminuito drasticamente (Hachkova et al., 2021).

A seguito dell'esame istologico del pancreas degli animali del gruppo di controllo e degli animali a cui è stato somministrato l'estratto di *Galega officinalis* (alle dosi di 600 e 1200 mg/kg), è stata osservata la conservazione della corretta struttura dei lobi pancreatici e le isole di Langerhans sono per lo più di medie e grandi dimensioni, ben definite, circondate da un sottile strato di tessuto connettivo. In figura 2.14. B-C si può vedere che somministrando rispettivamente 600mg/kg e 1200mg/kg di estratto di galega al gruppo di controllo, si ha un piccolo incremento del numero di isole di Langerhans, della loro area media, del diametro, del volume e del numero di cellule beta. Nella figura 2.14. E-F si può vedere che somministrando rispettivamente 600mg/kg e 1200mg/kg di estratto di galega al gruppo diabetico si ha un aumento delle cellule secretorie e una riduzione del grado di distrofia (Hachkova et al., 2021).

Tabella 2.4. Parametri delle isole del pancreas.

Parameters	Groups					
	C	C + G ₆₀₀ *	C + G ₁₂₀₀ *	D	D + G ₆₀₀ *	D + G ₁₂₀₀ *
The number of islets of Langerhans on a standard area (N/10 mm ²)	15.91 ± 0.955	14.94 ± 0.945	15.65 ± 0.595	4.420 ± 0.743 ^a	5.673 ± 0.631 ^a	6.640 ± 0.605 ^{ab}
Islets area (µm ²)	10,440 ± 358.5	9785 ± 523.7	10,900 ± 388.2	4620 ± 497.0 ^a	5354 ± 387.4 ^a	6623 ± 331.2 ^{abc}
Islets diameter (µm)	160.7 ± 3.814	152.6 ± 5.658	161.9 ± 5.548	106.5 ± 4.669 ^a	113.7 ± 3.752 ^a	119.7 ± 4.663 ^a
Islets volume (µm ³)	2.20 × 10 ⁶ ± 1.52 × 10 ⁵	1.92 × 10 ⁶ ± 2.29 × 10 ⁵	2.28 × 10 ⁶ ± 2.38 × 10 ⁵	6.58 × 10 ⁵ ± 8.88 × 10 ⁴ ^a	7.88 × 10 ⁵ ± 7.40 × 10 ⁴ ^a	9.28 × 10 ⁵ ± 11.37 × 10 ⁴ ^a
Number of β-cells/1000 µm ²	7.79 ± 0.280	7.18 ± 0.192	8.09 ± 0.308	4.74 ± 0.174 ^a	5.12 ± 0.325 ^a	5.62 ± 0.145 ^{ab}

^a—*p* < 0.05, as compared with the control group; ^b—*p* < 0.05, as compared with the diabetes mellitus group; ^c—*p* < 0.05, as compared with the group of animals D + G₆₀₀. * C + G₆₀₀, C + G₁₂₀₀—control animals that were treated with extract of *Galega officinalis* at doses 600 mg and 1200 mg/kg per day, respectively; D + G₆₀₀, D + G₁₂₀₀—animals with diabetes that were treated with extract of *Galega officinalis* at doses 600 mg and 1200 mg/kg per day, respectively.

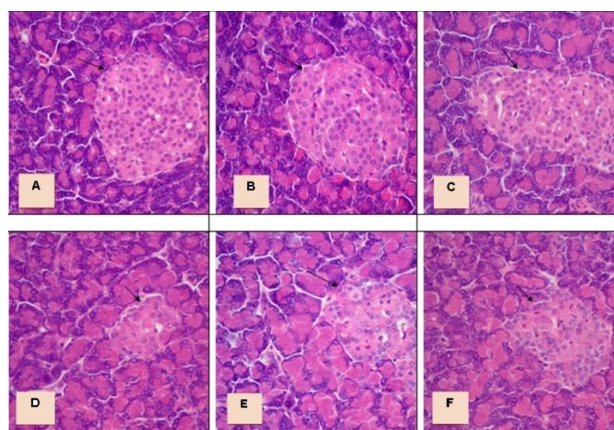


Figura 2.14. Struttura e morfologia del pancreas: le frecce indicano gli isolotti di Langerhans.

L'analisi dei risultati ottenuti conferma l'effetto citoprotettivo dell'estratto studiato sull'apparato incretorio del pancreas. Pertanto, la somministrazione dell'estratto di galega ad animali con diabete indotto da streptozotocina ha un pronunciato effetto antidiabetico, vale a dire, che riduce i livelli di glucosio nel sangue a digiuno e le concentrazioni di emoglobina glicosilata, migliora l'utilizzo del glucosio, stimola la secrezione di insulina e ha anche un effetto citoprotettivo sull'apparato incretorio del pancreas. Va notato che l'introduzione dell'estratto di galega nel gruppo degli animali di controllo non ha influenzato significativamente i parametri studiati. Pertanto, l'analisi dei risultati ottenuti consente di affermare che la frazione non alcaloide dell'estratto di *Galega officinalis* mostra le sue proprietà ipoglicemizzanti solo in condizioni di elevata concentrazione di glucosio (Hachkova et al., 2021).

In conclusione, in questo studio si è valutato l'effetto protettivo dell'estratto di galega sull'apparato insulare del pancreas. L'effetto è stato confermato dall'indagine sui livelli di insulina e C-peptide, in quanto indicatori che caratterizzano lo stato funzionale delle cellule beta. Dopo un ciclo di somministrazione dell'estratto alla dose di 600 mg/kg di peso corporeo, la concentrazione di insulina e peptide C non è cambiata molto negli animali del gruppo di controllo, mentre negli animali diabetici è decisamente aumentata. (Figura 2.15. A-B). L'emivita del peptide C nel sangue è superiore all'emivita dell'insulina; quindi, il livello del peptide C viene considerato un indicatore più stabile. Inoltre, l'omeostasi del glucosio può essere interrotta anche dall'aumento di citochine proinfiammatorie nel sangue; infatti, lo studio ha valutato pure il contenuto di TNF- α nel pancreas, si è visto che in condizione di diabete il TNF è aumentato e che somministrando l'estratto di galega il contenuto diminuisce (Figura 2.15. C) (Hachkova et al., 2021).

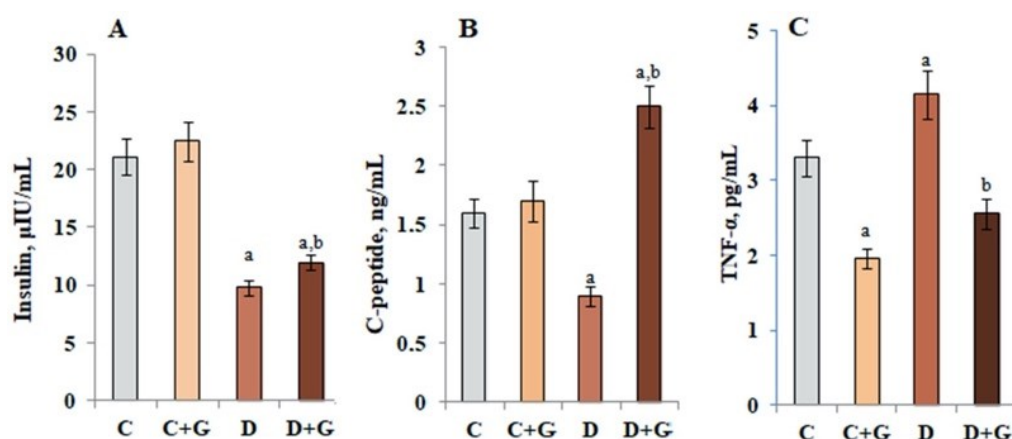


Figura 2.15. Concentrazione di insulina (A) e peptide C (B) nel plasma sanguigno e TNF- α (C) nel pancreas.

Si può suggerire che l'effetto citoprotettivo dell'estratto di *Galega officinalis* sulle cellule beta possa essere in gran parte dovuto alla capacità dei suoi componenti di prevenire la

sovraproduzione di ROS e di inibire la formazione della citochina proinfiammatoria TNF- α , riducendo così la loro citotossicità. I principali componenti attivi dell'estratto di galega che ne determinano le proprietà antiossidanti, sono il fitolo e I flavonoidi. In vitro, è stato dimostrato che il fitolo, che si trova nella frazione non alcaloide dell'estratto presenta proprietà antiossidanti, dovute alla presenza di un gruppo ossidrilico nella molecola. I flavonoidi completano l'azione antiossidante dell'estratto, in quanto sono scavenger di elettroni e radicali liberi, e quindi possono eliminare l'ossidazione dei substrati biologici da parte dei radicali liberi. I componenti dominanti dell'estratto studiato sono l'estere metilico dell'acido linolenico sono componenti biologicamente attivi che sopprimono il processo infiammatorio nel pancreas, come evidenziato da una diminuzione del TNF- α (Hachkova et al., 2021).

La galega viene considerata una pianta molto interessante per trattare persone diabetiche, infatti, studi clinici affermano la sua attività ipoglicemizzante. Quindi in commercio sono disponibili fitopreparati a base di *Galega officinalis* (Figura 2.16.-2.17.).



Modalità d'uso: assumere 2 compresse una o due volte al giorno in qualunque momento (da 2 a 4 compresse al giorno).

Figura 2.16. *Galega officinalis* in compresse.



Modalità d'uso: assumere 40 gocce (2ml) diluite in acqua, da una a tre volte al giorno in qualunque momento (da 40 a 120 gocce al giorno).

Figura 2.17. Tintura madre di *Galega officinalis*.

Un altro studio ha dimostrato che i **polifenoli alimentari** svolgono un ruolo molto importante nella prevenzione e nel trattamento del diabete. Ad esempio, alimenti ricchi di flavonoidi come caffè, soia, tè, cacao e propoli sono stati studiati come potenziali farmaci ipoglicemizzanti. Queste sostanze funzionano inibendo gli enzimi digestivi, proteggendo le cellule β delle isole pancreatiche, attivando la segnalazione dell'insulina e diminuendo

lo stress ossidativo e l'infiammazione. Rispetto ai flavonoidi O-glicosidi, flavonoidi agliconi (**quercetina, kaempferolo, daidzeina**) e flavonoidi C-glicosidi (**vitexina, isovitexina, swertisina**) hanno un potenziale antidiabetico positivo. La biodisponibilità e la regolazione della flora intestinale potrebbe essere parte del motivo del diverso grado di attività antidiabetica tra questi flavonoidi a causa della differenziata struttura chimica. Allo stesso modo, è stato ampiamente riportato che gli acidi fenolici (acido caffeico, acido clorogenico, acido cinnamico), lignani e tannini hanno mostrato attività antidiabetica in modelli animali diabetici di tipo 2. Inoltre, l'efficacia dei polifenoli alimentari contro il diabete mellito di tipo 2 è stata pure dimostrata nelle indagini cliniche. Infatti, diversi studi clinici hanno dimostrato che la dieta ricca di polifenoli, come: estratti di semi d'uva contenenti polifenoli (150–2000 mg/giorno), cacao contenente flavanoli (416-963 mg/giorno), propoli verde brasiliana (226,8 mg/giorno), estratti di mirtillo ricchi contenenti antociani (350 mg ogni 8 h per 2 mesi), polifenoli del vino rosso (733 mg di polifenoli totali al giorno), è un modo efficace per prevenire il diabete. Questi composti migliorano la funzione vascolare, aumentano la secrezione di insulina e migliorano il metabolismo del glucosio, riducono la resistenza all'insulina e lo stress ossidativo. Quindi una dieta con un consumo elevato di polifenoli tende a ridurre il rischio di diabete. Inoltre, le dosi sicure di polifenoli dovrebbero essere prese in considerazione, un consumo eccessivo dei loro componenti possono interagire con altri medicinali, con conseguenti effetti negativi per la salute, infatti, si è scoperto che la biodisponibilità e le vie metaboliche si alterano in co-somministrazione di polifenoli con medicinali convenzionali, che può portare a fallimento terapeutico e altri rischi (Li et al., 2023).

2.4 L'Alzheimer

L'Alzheimer è una patologia neurodegenerativa che danneggia le cellule del nostro sistema nervoso, dando problematiche alle funzioni cognitive fino alla perdita dell'autonomia stessa della persona. Questa patologia colpisce principalmente le persone di età avanzata, ma in alcuni casi può insorgere anche in individui giovani. Negli ultimi decenni, è cresciuta l'attenzione nei riguardi dell'Alzheimer a causa di un incremento di casi dovuto all'invecchiamento della popolazione globale, con 46,8 milioni di persone affette dalla patologia in tutto il mondo, un numero che dovrebbe aumentare fino a 74,7 milioni nel 2030 e 131,5 milioni nel 2050. I sintomi principali di questa patologia sono: deficit di memoria, problemi di linguaggio, cambiamenti di personalità, confusione, disorientamento e perdita della capacità di ragionamento. Questo processo neurodegenerativo è caratterizzato da due patologie: **la deposizione di placca β -amiloide** e **i grovigli neurofibrillari di tau iperfosforilata**. Nel cervello sono presenti proteine che formano queste due strutture chiamate "placche" e "grovigli". Microscopicamente, le placche nevrotiche sono composte dal **peptide amiloide-beta**

(A β 42) e i grovigli neurofibrillari (NFT) sono composti da **tau iperfosforilata** (Khan et al., 2020). La presenza di tali sostanze viene utilizzata come indicatore per determinare uno stato di Alzheimer; la presenza di queste componenti determina un effetto tossico nell'encefalo, comportando morte e perdita neuronale, alterazioni delle connessioni fra i neuroni (sinapsi) e alla fine atrofia cerebrale con perdita di tessuto cerebrale. È noto che l'Alzheimer ha un lungo periodo di latenza prima che compaiano i sintomi e possa essere fatta una diagnosi. Studi recenti hanno dimostrato che la sua insorgenza è comunemente preceduta da una fase intermedia nota come decadimento cognitivo lieve (MCI), quando ancora non vi è un aumento significativo delle placche e dei grovigli (Wang et al., 2014).

Deposizione di placca β -amiloide: l'amiloide deriva da una proteina diffusamente presente nel sistema nervoso centrale, l'*amiloid precursor protein* (APP), nell'Alzheimer la APP viene tagliata in maniera anomala e si accumulano peptidi formati da 40, 42 e 43 amminoacidi. Il passaggio principale nella generazione della placca A β è la scissione della proteina precursore dell'amiloide (APP) da parte della **β -secretasi** per produrre una membrana C-terminale attaccata con frammenti di 89 o 99 amminoacidi, la quale viene ulteriormente scissa dalla **γ -secretasi** per produrre le isoforme A β 1-40 e A β 1-42. L'A β 1-40 è la normale isoforma solubile, ma se il modello di scissione cambia può dare origine all'A β 1-42, che si aggrega facilmente e forma la placca. Questo cambiamento avviene a causa di mutazioni nel gene APP, nei geni presenelina 1, presenelina 2 o nel gene dell'apolipoproteina E. Oltre alle mutazioni genetiche, è probabile che molti neuropeptidi siano coinvolti nella formazione della placca, ad esempio bassi livelli di ormoni: ormone di rilascio della corticotropina (CRH), somatostatina e neuropeptide Y mentre livelli più elevati di angiotensina II possono essere coinvolti nella scissione irregolare dell'APP. Le placche A β che si formano si depositano in diverse regioni del cervello e vengono riconosciute come materiale estraneo dal cervello che avvia una risposta infiammatoria e immunitaria attivando la microglia e il rilascio di citochine, che alla fine portano alla morte cellulare e alla neurodegenerazione (Khan et al., 2020).

Grovigli neurofibrillari di tau iperfosforilata: le proteine tau sono proteine neuronali microtubolari, le quali hanno un dominio di legame ai microtubuli, le quali sono coinvolte nella polimerizzazione e stabilizzazione dell'assemblaggio dei microtubuli per mantenere l'integrità del citoscheletro. Questo legame è regolato dalla fosforilazione dei residui di serina/treonina da parte di diverse chinasi come **glicogeno sintasi chinasi 3** (GSK-3 β) e la **chinasi ciclina-dipendente 5** (CDK5). CDK5 gioca un ruolo potenziale nella formazione di grovigli neurofibrillari. A causa del sovraccarico di calcio citosolico, p35 si divide in p25, che iperattiva la chinasi-5 ciclina-dipendente (CDK5), la quale porta all'iperfosforilazione della tau. L'iperfosforilazione provoca una diminuzione dell'affinità delle proteine tau con i microtubuli. La tau iperfosforilata genera NFT e si deposita nel

citosol e non può più svolgere la funzione di mantenimento della struttura della cellula. Inoltre, questa deposizione influisce sulla normale funzione cellulare come la trasmissione sinaptica, il trasporto assonale e la trasduzione del segnale. Inoltre, la cellula subisce gradualmente la degenerazione (Khan et al., 2020).

Interazione tra placche A β e tau iperfosforilata: alcuni studi determinano che ci sia una correlazione diretta tra l'A β e tau fosforilata, con effetti sinergici sulle cellule microgliali e astrociti. Ci possono essere diverse forme di interazioni tra le due strutture:

A β accelera la fosforilazione della proteina tau: A β aggregato induce l'iperfosforilazione della tau andando a potenziare l'attività di GSK-3 β e CDK-5, che sono coinvolti nella fosforilazione della tau nei siti Ser/Thr. La proteina tau iperfosforilata si stacca dai microtuboli andando a formare NFT. Alcuni studi dimostrano che gli inibitori di GSK-3 β e CDK-5 (litio, AZD1080, roscovitina) abbassano significativamente i livelli di fosforilazione della tau e riducono significativamente i livelli di tau aggregata. Tuttavia, la loro efficacia clinica non è stata stabilita (Zhang et al., 2021).

La tossicità A β dipendente da tau: un nuovo studio ha scoperto che l'A β da solo causa l'iperattività e la tau da sola sopprime l'attività e promuove il silenziamento di molti neuroni. Il silenziamento neuronale domina l'iperattività in presenza sia di A β che di tau. Quindi la tau blocca l'iperattività A β -dipendente, che si traduce in un profondo silenzio dei circuiti. Questo risultato suggerisce che tau e A β esercitano effetti antagonisti sull'attivazione del circuito neurale. Inoltre, la tau scissa dalla caspasi genera frammenti tossici di 17 kDa tau, che porta alla degenerazione dei neuriti e alla morte cellulare. Pertanto, la neurotossicità indotta da A β può essere mediata non solo dalla deposizione di A β ma anche dall'attivazione della proteasi, che porta alla generazione di frammenti di tau neurotossici (Zhang et al., 2021).

A β e tau lavorano insieme per danneggiare i mitocondri: un altro compartimento cellulare che A β e tau iperfosforilata possono danneggiare è il mitocondrio. La disfunzione mitocondriale è ampiamente implicata nell'eziologia dell'Alzheimer. La deposizione di A β , la formazione di NFT e la conseguente neurodegenerazione possono essere tutte conseguenze del malfunzionamento mitocondriale. L'A β intracellulare può interagire con la **3-idrossiacil-CoA deidrogenasi di tipo 2** promuovendo la disfunzione mitocondriale, inoltre, la proteina simile alla dinamina-1 (Drp1) localizzata sulla membrana mitocondriale esterna può interagire sia con A β che con la tau fosforilata causando un'eccessiva frammentazione mitocondriale e di conseguenza recare danni neuronali. I frammenti di tau N-terminale esercitano effetti tossici nel mitocondrio, i quali portano alla disfunzione mitocondriale associata alla compromissione della fosforilazione ossidativa perché viene

distorta la struttura dell'enzima del complesso V e di conseguenza va a disturbare la sintesi di ATP nel mitocondrio. L'A β inoltre stimola i neuroni a generare un elevato afflusso di Ca $^{2+}$, con conseguente sovraccarico di Ca $^{2+}$ intracellulare e causando così danni ai mitocondri. La disregolazione dell'omeostasi del Ca $^{2+}$ promuove ulteriormente la disfunzione mitocondriale, i disturbi della trasmissione sinaptica, lo stress ossidativo, questi sono tutti fattori che contribuiscono al deterioramento cognitivo (Zhang et al., 2021).

Tossicità reciproca tra A β e tau: la proteina precursore di A β (APP) viene scissa dagli enzimi secretasi β/γ per formare A β . A β attiva GSK-3 β e CDK-5 per fosforilare la proteina tau e attivare la caspasi-3 e la calpaina 1, le quali idrolizzano la proteina tau generando gli oligomeri tau. Fyn attivato da A β accelera la fosforilazione della tau, il quale si lega alla tau. Fyn fosforilato agisce pure su NR2B per formare il complesso NMDAR-PSD95-Fyn. Gli NMDAR sono attivati per aumentare il Ca $^{2+}$, il che influenza la funzione dei mitocondri. L'A β e la tau fosforilata inducono poi la fusione e la fissione dei mitocondri agendo su Drp1, che induce la disfunzione della dinamica mitocondriale e alla fine porta alla sovrapproduzione e all'apoptosi delle specie reattive dell'ossigeno (Zhang et al., 2021).

Interazione di A β e tau con microglia e astrociti: in risposta ad A β o tau, la microglia e gli astrociti vengono convertiti in uno stato reattivo, i quali innescano la cascata infiammatoria. Queste cellule si attivano reciprocamente attraverso questa cascata, portando al danno neuronale. Le citochine infiammatorie (come l'interleuchina-1 β e il TNF- α) inducono il rilascio neuronale di tau e la microglia attivata assorbe la tau extracellulare. Inoltre, le citochine accelerano la fosforilazione della tau causando la formazione di grovigli neurofibrillari (NFT). Il fattore di trascrizione EB attiva gli astrociti per assorbire tau extracellulare. Questo processo consiste in un ciclo di deposizione di A β , fosforilazione di tau, rilascio e l'assorbimento di tau e i ruoli delle citochine che alla fine portano alla morte cellulare (Zhang et al., 2021).

2.4.1 Diagnosi di Alzheimer

La diagnosi dell'Alzheimer può essere distinta in:

Alzheimer possibile: basata sull'osservazione di sintomi clinici e sul deterioramento di due o più funzioni cognitive (per es. memoria, linguaggio o pensiero) in presenza di una seconda malattia che non è considerata la causa della demenza, ma che rende comunque la diagnosi di malattia di Alzheimer meno sicura.

Alzheimer probabile: basata sull'osservazione di sintomi clinici e sul deterioramento di due o più funzioni cognitive, ma in assenza di una seconda malattia.

Alzheimer certa: l'unico modo per confermare con certezza la diagnosi è l'identificazione di **deposizione di placca β -amiloide** e di **grovigli neurofibrillari di tau iperfosforilata** nel cervello.

Quindi ad oggi l'unico modo di fare una diagnosi certa di demenza di Alzheimer è attraverso l'identificazione delle placche amiloidi nel tessuto cerebrale ed è possibile solo con l'autopsia dopo la morte del paziente. Questo significa che durante il decorso della malattia si può fare solo una diagnosi di Alzheimer "possibile" o "probabile". Per questo i medici si avvalgono di diversi test:

- esami clinici, come quello del sangue, delle urine o del liquido spinale
- test neuropsicologici per misurare la memoria, la capacità di risolvere problemi, il grado di attenzione, la capacità di contare e di dialogare
- Tac cerebrali per identificare ogni possibile segno di anormalità

Questi esami permettono al medico di escludere altre possibili cause che portano a sintomi analoghi, come problemi di tiroide, reazioni avverse a farmaci, depressione, tumori cerebrali, ma anche malattie dei vasi sanguigni cerebrali.

2.5 Correlazione con lo stress ossidativo

Il cervello è altamente suscettibile allo squilibrio ossidativo rispetto ad altri organi, a causa della sua elevata richiesta di energia, dell'elevato consumo di ossigeno, dell'abbondante presenza di acidi grassi polinsaturi facilmente perossidabili, della presenza di ferro catalizzatore principale di ROS e della scarsità di sistemi antiossidanti. La maggior parte dei componenti dei neuroni (lipidi, proteine e acidi nucleici) può essere ossidata a causa di disfunzione mitocondriale, dell'aumento dei livelli di metalli, dell'infiammazione e della placca β -amiloide ($A\beta$). Lo stress ossidativo partecipa allo sviluppo dell'Alzheimer promuovendo la deposizione di $A\beta$, l'iperfosforilazione della tau e la conseguente perdita di sinapsi e neuroni. La relazione tra stress ossidativo e Alzheimer suggerisce che lo stress ossidativo è una parte essenziale del processo patologico (Chen & Zhong, 2014). Quindi non c'è da meravigliarsi che lo squilibrio ossidativo e il conseguente danno alle biomolecole mediato dallo stress ossidativo siano ampiamente riportati nell'Alzheimer, infatti, prove crescenti suggeriscono che lo squilibrio ossidativo gioca un ruolo fondamentale nella malattia (Wang et al., 2014).

Di seguito verranno riportati i prodotti ottenuti dall'ossidazione di lipidi, proteine e acidi nucleici, i quali vengono considerati come i principali biomarcatori del sangue per la diagnosi precoce dell'Alzheimer.

I marcatori della perossidazione lipidica: il **4-idrossinonale** e la **malondialdeide** (MDA); infatti, è stato riferito che i livelli di 4-idrossinonale e di MDA sono significativamente elevati nell'ippocampo, nella corteccia entorinale, nella corteccia temporale, nel fluido ventricolare e nel plasma di pazienti con AD rispetto ai soggetti di controllo della stessa età (Wang et al., 2014).

I marcatori dell'ossidazione proteica: il **carbonile proteico** e la **3-nitrotirosina**. Un aumento significativo del contenuto di carbonile proteico è stato riportato nell'ippocampo e nel lobo parietale (Wang et al., 2014).

I marcatori ossidativi del DNA: **l'8-idrossideossiguanosina** (8-OHdG) e **l'8-idrossiguanosina** (8-OHG), sono i prodotti dell'ossidazione della guanina. I cervelli colpiti da Alzheimer hanno dimostrato un aumento significativo di 8OHdG e 8-OHG sia nel DNA mitocondriale che nel DNA nucleare rispetto a persone sane di pari età. È interessante notare che l'8-OHG sembra precedere tutti i segni distintivi tipici dell'AD, come i grovigli neurofibrillari (NFT) e le placche A β , e in particolare si verifica decenni prima dell'aggregazione A β nei pazienti con AD (Chen & Zhong, 2014).

La figura 2.18. Mostra come lo stress ossidativo può essere indotto da: disfunzione mitocondriale, infiammazione, cattivo metabolismo dei metalli, tau iperfosforilata e accumulo di A β nell'Alzheimer. Inoltre, illustra come i prodotti dello stress ossidativo nel cervello (8-OHG, MDA e 4-HNE), possano essere usati come marcatori di diagnosi (Chen & Zhong, 2014).



Figura 2.18. Schema di sintesi dei principali meccanismi di induzione dello stress ossidativo nell'Alzheimer.

Diversi studi di Wang et al., inoltre, affermano che l'interazione tra lo stress ossidativo e la disfunzione mitocondriale svolge un ruolo importante nella patogenesi dell'Alzheimer.

Disfunzione mitocondriale: i mitocondri sono la principale fonte di stress ossidativo, quindi è inevitabile che la perdita di elettroni durante il loro trasferimento porti alla produzione di anione superossido. Infatti, la catena respiratoria è responsabile della produzione del 90% dei ROS endogeni. Si è visto che i mitocondri disfunzionali sono produttori meno efficienti di ATP ma produttori più efficienti di ROS e questo potrebbe rappresentare una delle fonti principali di squilibrio ossidativo osservato nell'Alzheimer (Wang et al., 2014).

Ci possono essere diverse cause che portano alla disfunzione mitocondriale, per esempio la diminuzione del livello di **citocromo c ossidasi** e l'inattivazione di un altro enzima il **Mn-SOD** (enzima antiossidante che protegge i mitocondri dallo stress ossidativo), promuove ulteriormente la disfunzione mitocondriale. L'ipereccitazione del glicogeno sintasi chinasi (GSK-3) causata dallo stress ossidativo, può alterare la permeabilità dei mitocondri e di conseguenza portare a una sovrapproduzione di ROS. Tutti questi risultati

indicano che la produzione di ROS è strettamente associata alla disfunzione mitocondriale. Si pensa che la placca A β sia principalmente il colpevole della disfunzione mitocondriale e quindi contribuisce alla produzione di ROS nell'Alzheimer. Prove sempre più numerose mostrano che l'A β disturba la catena di trasporto degli elettroni riducendo l'attività degli enzimi chiave e interrompendo le dinamiche mitocondriali. L'A β , inoltre, si lega all'alcol deidrogenasi per indurre l'apoptosi e la produzione di ROS nei neuroni. Nei mitocondri isolati, il trattamento con A β provoca danno ossidativo alla membrana mitocondriale, altera la polarità lipidica e proteica e inibisce gli enzimi chiave della catena respiratoria (Chen & Zhong, 2014). Altri studi confermano che la carenza di vitamine antiossidanti, è sufficiente per indurre deficit neurologici simili a quelli dell'Alzheimer. Ad esempio, è stato ampiamente riportato che la carenza di vitamina E, causa demenza e altri sintomi neurologici con l'aumento del rischio di sviluppare la malattia, ma l'assunzione di vitamina E potrebbe invertire la disfunzione neurologica. Oltre alla vitamina E, anche le carenze di altre vitamine come per esempio vitamina B9, B12, provocano il declino cognitivo, la demenza, la depressione e altri sintomi neurologici.

Ricapitolando, i risultati ottenuti dai vari studi affermano che lo squilibrio ossidativo può essere sia un evento precoce e quindi probabilmente svolge un ruolo importante nella patogenesi dell'Alzheimer, ma può essere anche indotto dalla disfunzione mitocondriale, dalla tau iperfosforilata e dall'accumulo di A β nell'Alzheimer.

2.6 I rimedi per l'Alzheimer

2.6.1 I rimedi sintetici

I medicinali utilizzati per trattare l'Alzheimer vanno a migliorare la sintomatologia cognitiva e si suddividono in:

Inibitori dell'acetilcolinesterasi: sono agenti di prima linea per il trattamento della malattia, questi farmaci legano l'enzima che degrada l'acetilcolina (**acetilcolinesterasi**) bloccandolo. L'acetilcolina è un neurotrasmettitore essenziale per la comunicazione tra neuroni. Si pensa che l'utilizzo di questi inibitori riesca a mantenere buoni livelli di acetilcolina e questo compensi, senza arrestare, la progressiva e inevitabile perdita di neuroni dovuta alla malattia di Alzheimer. Gli effetti avversi più comuni sono nausea, vomito e diarrea. Una revisione Cochrane ha concluso che nei pazienti con malattia di Alzheimer, il trattamento con Donepezil, Galantamina o Rivastigmina da sei mesi a un anno ha determinato un lieve miglioramento della funzione cognitiva. Miglioramenti nel comportamento e nelle attività della vita quotidiana sono stati notati anche in pazienti trattati con uno di questi tre agenti; tuttavia, nessuno dei farmaci ha un grande effetto terapeutico.

Antagonista dei recettori NMDA: la Memantina è un antagonista non competitivo dei recettori NMDA (recettori dell'N-metil-D-aspartato) per l'acido glutammico. Il farmaco va a prevenire l'eccessiva attività glutammatergica, si ritiene infatti che alti livelli di glutammato possano comportare alla disfunzione neuronale contribuendo sia alla progressione che alla manifestazione dei sintomi dell'Alzheimer. Una revisione Cochrane ha concluso che la Memantina alla dose di 20 mg al giorno per sei mesi migliora leggermente la cognizione e la capacità di svolgere attività della vita quotidiana nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer da moderata a grave.

Inibitore della monoamminossidasi: la Selegilina è un inibitore della monoamminossidasi di tipo B con effetti anticolinergici minimi. Una revisione Cochrane ha analizzato 17 studi in doppio cieco, randomizzati, controllati con placebo che valutavano la Selegilina a un dosaggio di 10 mg al giorno per il trattamento della malattia di Alzheimer e si è affermato che la cognizione è migliorata dalle quattro alle sei settimane.

A partire da una certa fase, la malattia di Alzheimer provoca dei sintomi comportamentali e psichiatrici tipo agitazione, ansia, aggressività e deliri; quindi, per placare questi stati possono essere utilizzati farmaci antipsicotici come l'Aloperidolo e il Risperidone.

2.6.2 I rimedi naturali

Come per il diabete, alimenti ricchi di polifenoli prevengono il rischio di sviluppare l'Alzheimer, mangiare più frutta e verdura consentirebbe di prevenire questa forma di demenza. Molti studi scientifici affermano pure che il consumo di sostanze ricche di omega 3 come pesce, noci e semi di lino possono ridurre l'infiammazione di tessuti cerebrali e la concentrazione della proteina beta-amiloide. Si è visto pure che adeguati livelli plasmatici di omega 3 consentirebbero la corretta funzionalità di neuroprotezione da parte delle vitamine B. Le vitamine del gruppo B (B6-9-12) partecipano in modo diretto alla funzionalità cerebrale con effetti protettivi verso la malattia di Alzheimer. Queste vitamine sono molto presenti in diete a base di carne e di verdura. Queste sostanze possono pure essere assunte attraverso l'uso di integratori presenti in commercio. (Figura 2.19.-2.20.)



2.19. Omega 3 in capsule.



2.20. Vitamine B12+B9+B6 in capsule.

Uno studio scientifico ha affermato che esperimenti in vitro condotti su linee cellulari neuronali hanno dimostrato che il trattamento con alcuni flavonoidi: epicatechina, epigallocatechina, epigallocatechina-3-gallato (EGCG) ha ridotto significativamente la produzione di A β . Questi risultati sono stati riprodotti in vivo, dove l'iniezione intraperitoneale di epigallocatechina-3-gallato nel modello murino Tg2576 di Alzheimer, ha diminuito i livelli di A β . È stato anche dimostrato che i flavoni apigenina e nobiletina riducono significativamente i depositi di A β solubile e insolubile nel cervello nei topi affetti da Alzheimer. Inoltre, alcuni polifenoli possono modulare l'iperfosforilazione della Tau e la successiva formazione di NFT, difatti, è stato dimostrato che il resveratrolo inibisce l'iperfosforilazione di Tau e inibisce la fosforilazione di Ser396 Tau da parte di GSK-3 β , inoltre il resveratrolo può modulare l'iperfosforilazione della Tau aumentando l'attività del PP2A, portando a sua volta alla defosforilazione della Tau (Payne et al., 2022).

Un altro rimedio naturale valido per prevenire e migliorare il controllo dell'Alzheimer è l'utilizzo di fitopreparati a base di *Curcuma longa* L. La curcuma è una pianta erbacea perenne che appartiene alla famiglia delle Zingiberaceae.



Curcuma longa L.



La parte della pianta utilizzata in campo terapeutico è il rizoma tuberizzato da cui si ricava principalmente i curcuminoidi e i derivati del bisabolo. (Figura 2.21.-2.22.)

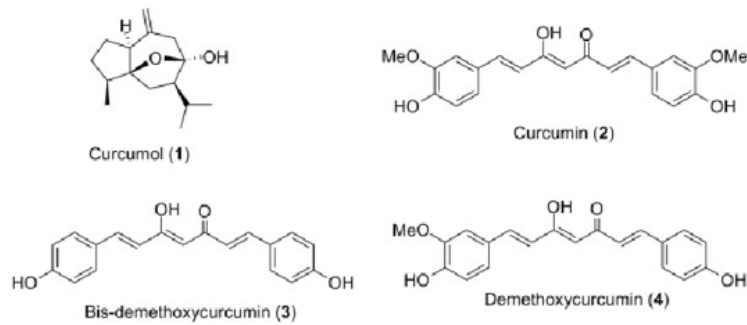


Figura 2.21. Strutture del curcumolo e dei curcuminoidi.

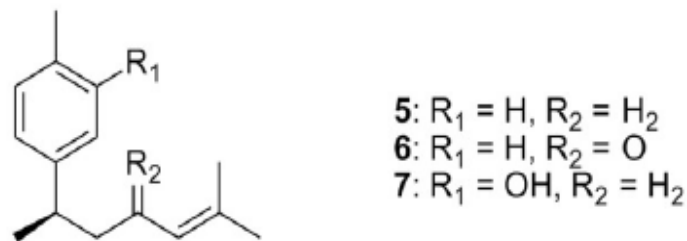


Figura 2.22. Strutture dei derivati del bisabolo.

Questi principi attivi conferiscono alla pianta proprietà antinfiammatorie, antispastiche, colagoghe e carminative. Il principio attivo più studiato nella pianta è la **curcumina**, infatti, diversi studi affermano che questa molecola è molto utile per contrastare l'Alzheimer. La letteratura suggerisce che la curcumina inibisce la creazione di β -amiloide e fosfo-tau, modula la microglia, chela i metalli e inoltre possiede un'attività antiossidante superiore a quella della vitamina E. La curcumina elimina i ROS e aumenta i livelli dei sistemi antiossidanti, difatti, grazie alle sue proprietà lipofile attraversa la barriera emato-encefalica e agisce in diversi siti inibendo così la perossidazione lipidica e potenziando i meccanismi degli antiossidanti endogeni. La struttura della curcumina contiene dichetone e fenolo come gruppi funzionali reattivi, che eliminano le specie reattive dell'ossigeno. Pertanto, la somministrazione di curcumina come terapia antiossidante, potrebbe essere un'importante strategia per trattare la neurodegenerazione. Inoltre, è stato dimostrato che la curcumina induce la sovraregolazione della trascrizione del fattore nucleare (Nrf2) e sopprime l'attivazione di NF-KB in modelli cellulari e animali di disturbi neurodegenerativi, favorendo a sua volta la neuroprotezione (Elbini-Dhouib et al., 2021). Uno studio ha stabilito che la somministrazione di 50 mg/kg di curcumina per 3 mesi o 200 mg/kg di curcumina per 45 giorni a topi transgenici, ha forti effetti neuroprotettivi. Si è avuto sia la

regolazione della neurogenesi nell'ippocampo che la protezione dei neuroni dopaminergici perché viene attivato il fattore nucleare 2 (Nrf2), il quale è il principale regolatore della risposta antiossidante, portano così a una migliore funzione cognitiva (Ege, 2021). Un altro studio afferma che la curcumina inibisce molteplici percorsi disregolati della segnalazione cellulare. Pertanto, è risultato che la somministrazione di curcumina ha portato alla disattivazione di GSK-3 β che a sua volta ha ridotto la produzione di A β e di conseguenza riduce l'accumulo di placche. Si è visto poi che la defosforilazione di GSK-3 β , aumenta le attività colinergiche. Anche il fattore nucleare kappa B (NF-KB) aumenta nel cervello dei pazienti con AD, ma si è visto in un esperimento che somministrando 50 mg/kg di curcumina per 15 giorni a topi, la downregulation della segnalazione NF-KB ha portato all'inibizione mediata da GSK-3 β della beta-secretasi 1 (BACE1), con riduzione delle placche A β . Inoltre, quando la funzione APP viene interrotta, la concentrazione di metalli nel cervello aumenta ma gli studi indicano che la curcumina si presenta come un potente chelante (Ege, 2021). L'uso della curcumina, tuttavia, non è così semplice perché incontra alcuni ostacoli. In primo luogo, ha una solubilità in acqua molto bassa, il che significa che viene eliminato rapidamente dall'organismo e ha una bassa biodisponibilità orale, inoltre, questa molecola è chimicamente instabile. Quindi sono state definite alcune strategie per migliorare l'efficienza della curcumina nell'Alzheimer. Per aumentare la sua permeabilità nella barriera emato-encefalica, la curcumina è stata incapsulata e coniugata con diversi agenti. (Figura 2.23.). Gli studi hanno indicato che i vettori a base di lipidi e il PLGA hanno aumentato enormemente la sua distribuzione negli organi. La funzionalizzazione della curcumina con nanoparticelle metalliche ha anche migliorato l'assorbimento della curcumina nel cervello. Inoltre, la coniugazione di vettori con agenti mirati, come il peptide Tet-1, la transferrina, la lattoferrina e il chitosano ha aumentato la permeabilità della barriera emato-encefalica alla curcumina (Ege, 2021).

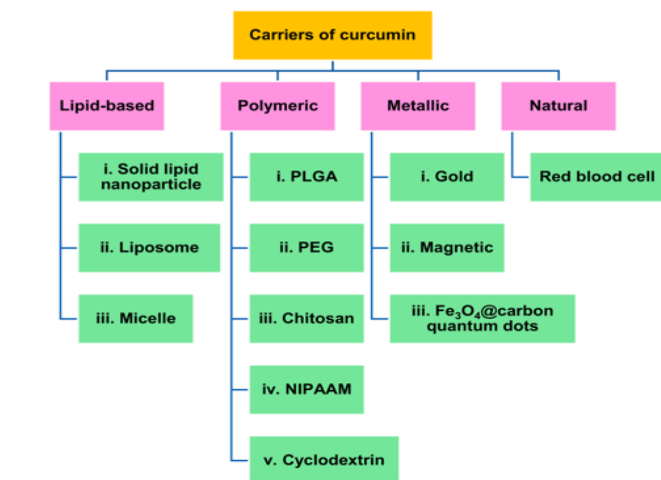


Figura 2.23. I principali vettori della curcumina.

L'uso di curcumina con un vettore lipidico nanostrutturato ha aumentato la quantità e il tempo di ritenzione nel cervello di curcumina (Figura 2.24.). Oltre alla maggiore distribuzione e al maggiore tempo di ritenzione, la curcumina lipidica solida ha anche aumentato gli effetti antinfiammatori e neuroprotettivi (Ege, 2021).

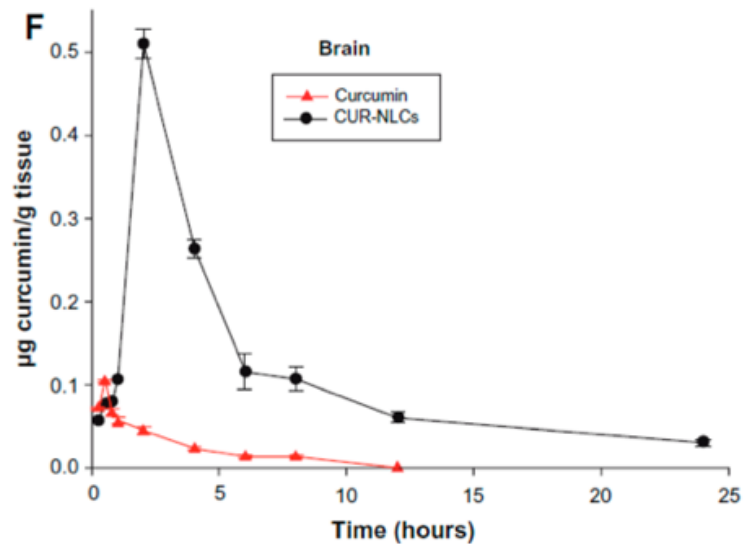


Figura 2.24. Mostra la concentrazione di curcumina nel cervello dopo la somministrazione di 80 mg/kg di farmaco incapsulato con curcumina (Ege, 2021).

Inoltre, gli studi hanno dimostrato che le particelle di curcumina lipidica solida hanno una maggiore affinità per le placche A β rispetto alla curcumina. Le placche di A β sono diminuite del 50% in 5 giorni dopo l'applicazione di 50 mg/kg di nanoparticelle di curcumina (Ege, 2021).

Il polilattide-co-glicolide (PLGA) è stato approvato come promettente piattaforma di somministrazione farmaceutica per la sua eccellente biocompatibilità, bassa citotossicità e biodegradabilità. In alcuni studi, la curcumina è stata caricata in PLGA per trattare l'Alzheimer, tuttavia, il PLGA da solo non è stato trovato efficace per penetrare nella barriera emato-encefalica ma la curcumina l'incapsulata in PLGA ha aumentato significativamente i suoi livelli nel cervello (Figura 2.25.) (Ege, 2021).

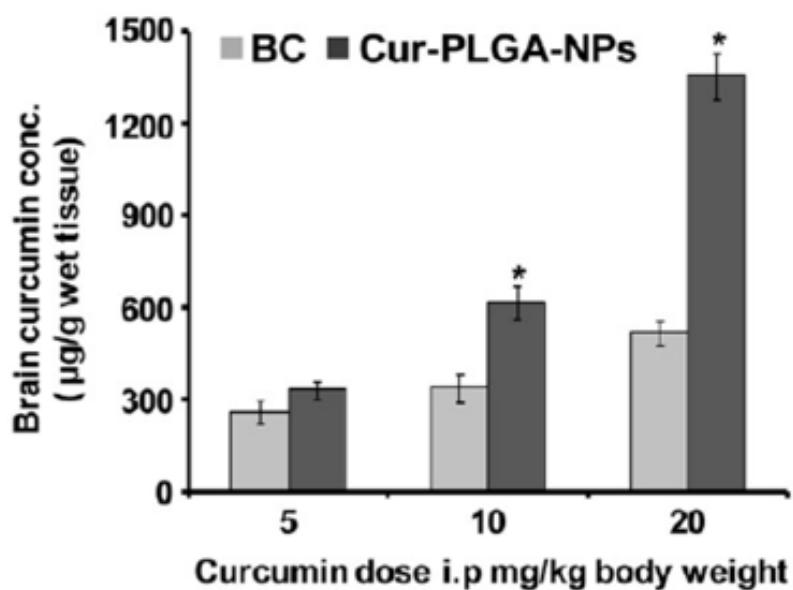


Figura 2.25. Concentrazione di curcumina nel cervello incapsulata con PLGA (Ege, 2021).

Altri studi hanno dimostrato che la curcumina somministrata insieme alla piperina per via orale, ha aumentato di moltissimo i suoi livelli dopo 45 minuti dalla somministrazione. (Figura 2.26.) (Anand et al., 2007).

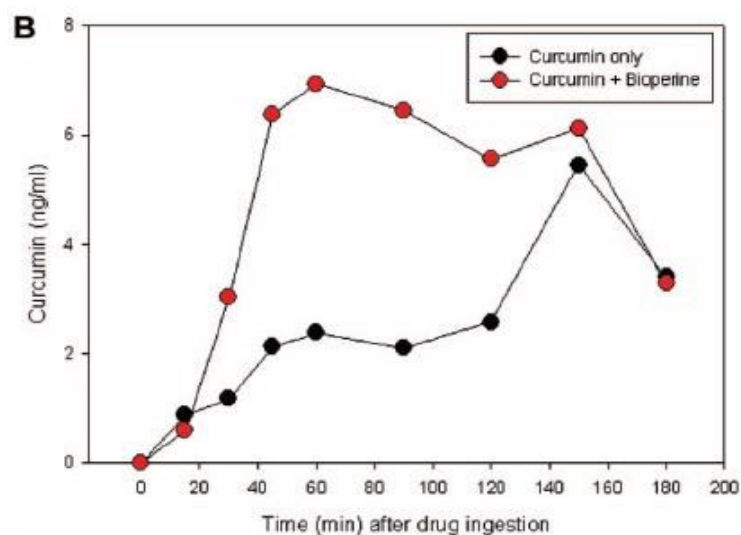


Figura 2.26. Aumento di biodisponibilità della curcumina con co-somministrazione di peperina (Anand et al., 2007).

Nel complesso, gli studi hanno indicato che la curcumina è molecola molto promettente per trattare l'Alzheimer e l'uso di vettori e agenti mirati è molto efficace per migliorare la biodisponibilità nel cervello.

Il successivo studio ha valutato la capacità della curcumina di indurre effetti neuronali protettivi su un modello di ratto di neurotossicità indotta dal cloruro di alluminio (AlCl₃), il quale imita la forma sporadica della malattia di Alzheimer. Diversi studi clinici hanno suggerito una potenziale relazione tra la neurotossicità indotta dall'alluminio e la fisiopatologia dell'Alzheimer, ciò può essere correlato all'aumento dell'uso di farmaci contenenti alluminio (come antiacidi e coadiuvanti dei vaccini) e l'uso di additivi alimentari. Il potenziale effetto neurotossico dell'alluminio è stato confermato anche su modelli sperimentali animali, dimostrando che l'esposizione cronica alla forma di cloruro di alluminio (AlCl₃) provoca segni neurologici che imitano la neurodegenerazione. Pertanto, l'animale trattato con AlCl₃ in modo continuo potrebbe essere un modello affidabile per lo studio della forma sporadica di Alzheimer e dei meccanismi alla base di questa patologia, il quale (modello) potrebbe essere utilizzato per vagliare l'impatto di nuovi farmaci nello sviluppo di Alzheimer. Infatti, i dati sui topi esposti ad AlCl₃ sono coerenti con le principali caratteristiche patologiche (stress ossidativo, infiammazione e apoptosi) dell'Alzheimer clinico (Elbini-Dhouib et al., 2021).

Pertanto, l'obiettivo principale del presente studio è stato quello di indagare il potenziale della curcumina sugli effetti di protezione e di recupero contro l'Alzheimer indotto da AlCl₃.

Nello studio è stato dimostrato che i livelli di malondialdeide (MDA) erano significativamente elevati e le attività di SOD e CAT erano significativamente diminuite nell'ippocampo nei ratti CTR+ (gruppo trattato con AlCl₃) rispetto agli animali CTR- (gruppo di controllo). Il co-trattamento con curcumina ha attenuato significativamente lo stress ossidativo nell'ippocampo diminuendo a sua volta i livelli di MDA e migliorando le attività di SOD e catalasi, rispetto agli animali trattati con AlCl₃. (Tabella 2.4.)

Tabella 2.4. Livelli plasmatici di MDA-CAT-SOD.

	CTR-	CTR+	CUR1	CTRA1	CUR2
MDA	0.62 ± 0.26	0.95 ± 0.05 ^a	0.51 ± 0.20 ^b	1.05 ± 0.09	0.60 ± 0.02 ^{b,*}
CAT	0.76 ± 0.54	0.19 ± 0.03 ^a	0.83 ± 0.26 ^b	0.10 ± 0.09	0.89 ± 0.01 ^{b,*}
SOD	0.10 ± 0.06	0.05 ± 0.01 ^a	0.11 ± 0.081 ^b	0.05 ± 0.01	0.15 ± 0.09 ^{b,*}

Values are mean ± SEM. Note: CTR-: negative control group; CTR+: positive control group (treated by aluminum chloride (AlCl₃)); CUR1: co-treatment with curcumin; CUR2: post-treatment with curcumin; CTRAI: exposed to AlCl₃ for 90 days and survive 60 days without any treatment; a: $p < 0.05$ as compared to CTR- group; b: $p < 0.05$ as compared to CTR+ group; *: $p < 0.05$ as compared to CTRAI group, repeated measures two-way ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons.

Successivamente nello studio è stato valutato l'effetto di AlCl₃ sull'attività dell'acetilcolinesterasi (AChE). Si è visto che i ratti esposti per un lungo periodo ad AlCl₃ hanno ridotto di molto l'attività AChE nell'ippocampo rispetto ai ratti di controllo e che la somministrazione di curcumina ha ripristinato in modo significativo l'attività AChE (Figura 2.27.).

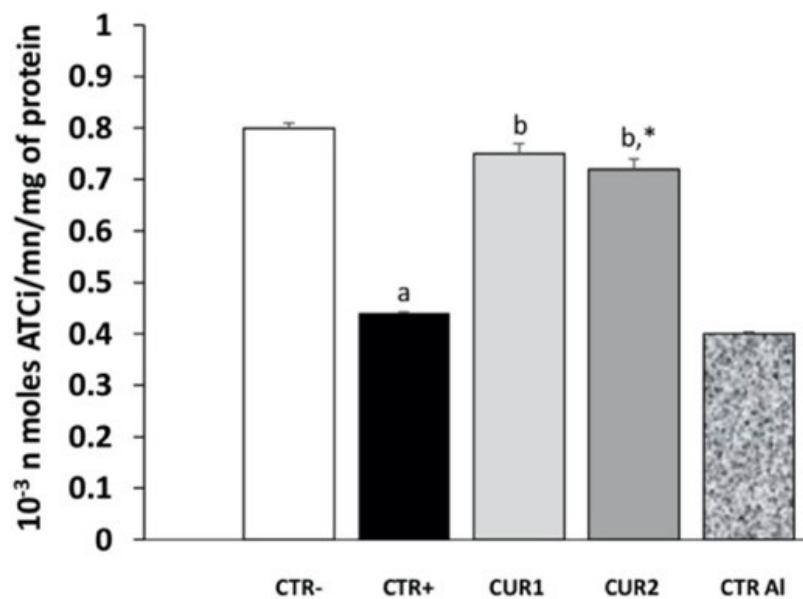


Figura 2.27. Effetto del co e post-trattamento della curcumina sull'attività dell'acetilcolinesterasi dell'ippocampo sul modello di ratto di AD (Elbini-Dhouib et al., 2021).

Poiché l'INF- γ contribuisce ai processi neuropatogeni dell'Alzheimer, è stato interessante valutare l'impatto del trattamento di curcumina sul livello di citochine pro-infiammatorie. Come mostrato nella Figura 2.28. A, la concentrazione di INF- γ era più alta nell'ippocampo di ratto di CTR + rispetto a quella del gruppo di controllo negativo CTR-. È interessante notare che i co- e post-trattamenti con curcumina hanno ridotto significativamente la concentrazione di INF- γ , suggerendo che la somministrazione di curcumina attenua l'infiammazione indotta da A β 13 nell'ippocampo. Tuttavia, i risultati hanno mostrato che i co- e post-trattamenti di curcumina aumentano la concentrazione di IL-4. (Figura 2.28. B) Questi risultati determinano che la curcumina inibisce la produzione di citochine pro-infiammatorie e stimola quella di citochine antinfiammatorie nell'ippocampo.

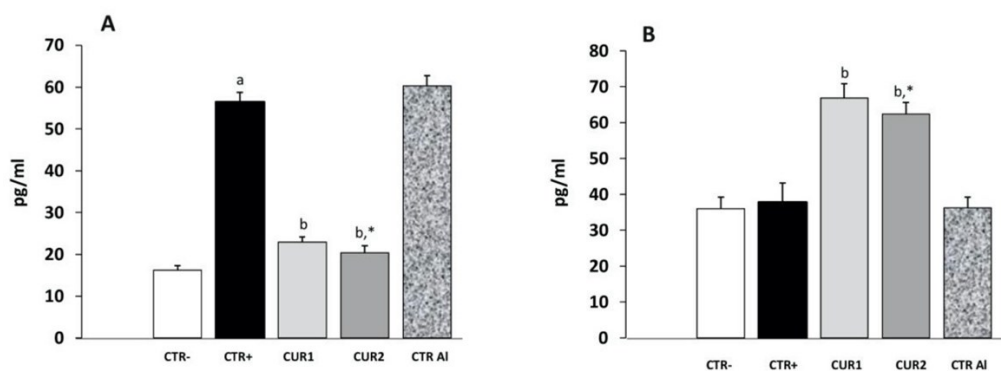


Figura 2.28. Effetto del co e post-trattamento della curcumina sui livelli di citochine pro e antinfiammatorie sull'ippocampo del modello AD-rat indotto da A β 13 (Elbini-Dhouib et al., 2021).

Riassumendo i risultati hanno dimostrato che il trattamento con curcumina migliora i livelli pro-ossidanti, le attività degli enzimi antiossidanti e la produzione di citochine antinfiammatorie. Inoltre, è stato dimostrato che il post-trattamento con curcumina ha migliorato significativamente il comportamento, lo stress ossidativo e l'infiammazione nei ratti esposti ad AICI3. In conclusione, i dati di questo studio hanno presentato la curcumina come un potenziale nutraceutico grazie ai suoi effetti protettivi.

La curcumina grazie alle sue valide proprietà e i suoi effetti antiossidanti-antinfiammatori viene molto apprezzata in campo terapeutico per trattare l'Alzheimer. Infatti, vengono prodotti fitopreparati a base di questo principio attivo. (Figura 2.29.)



Modalità d'uso: assumere 1-2 compresse al giorno. 1 mese di trattamento a dosaggio pieno.

Figura 2.29. Curcumina e piperina in compresse.

Un'altra pianta officinale usata come fitopreparato per il trattamento dell'Alzheimer è *Panax ginseng* M. Il ginseng è una pianta erbacea perenne che appartiene alla famiglia delle Araliaceae. La parte della pianta utilizzata in campo terapeutico è la radice di età superiore ai sei anni.



***Panax ginseng* M.**

Dalla droga si ricavano i ginesoidi, principali sostanze attive responsabili degli effetti terapeutici e farmacologici del ginseng. In base al numero e alla posizione dei componenti zuccherini, i ginsenosidi possono essere suddivisi in: **gruppi protopanassadiolo** (PPD), **gruppi protopanassatriolo** (PPT) e **gruppi di acido oleanolico**. (Figura 2.30.)

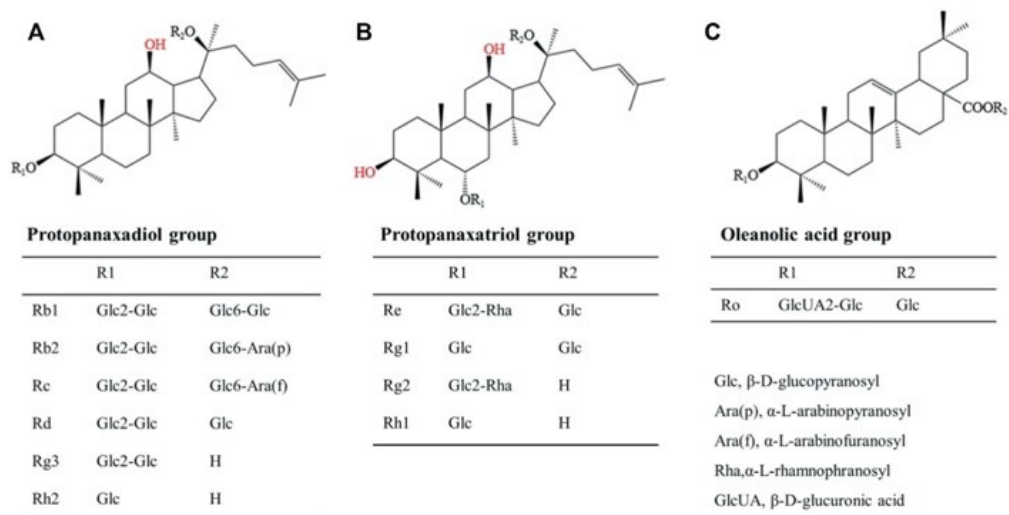


Figura 2.30. Classi dei ginsenosidi.

I principi attivi conferiscono alla pianta proprietà antiossidanti, toniche-adattogene, antinfiammatorie e immunostimolanti. I ginsenosidi Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re e Rg1 rappresentano oltre il 90% del totale dei ginsenosidi del ginseng e sono attualmente le molecole più studiate. In alcuni studi è stato riportato che i ginsenosidi hanno diversi effetti neurofarmacologici. Oltre a inibire la formazione di A β e l'iperfosforilazione di Tau, i ginsenosidi esercitano anche effetti neuroprotettivi attraverso diversi meccanismi, tra cui l'inibizione dello stress ossidativo, la regolazione della neuroinfiammazione e il miglioramento della disfunzione mitocondriale (Figura 2.31.) (Shi et al., 2022).

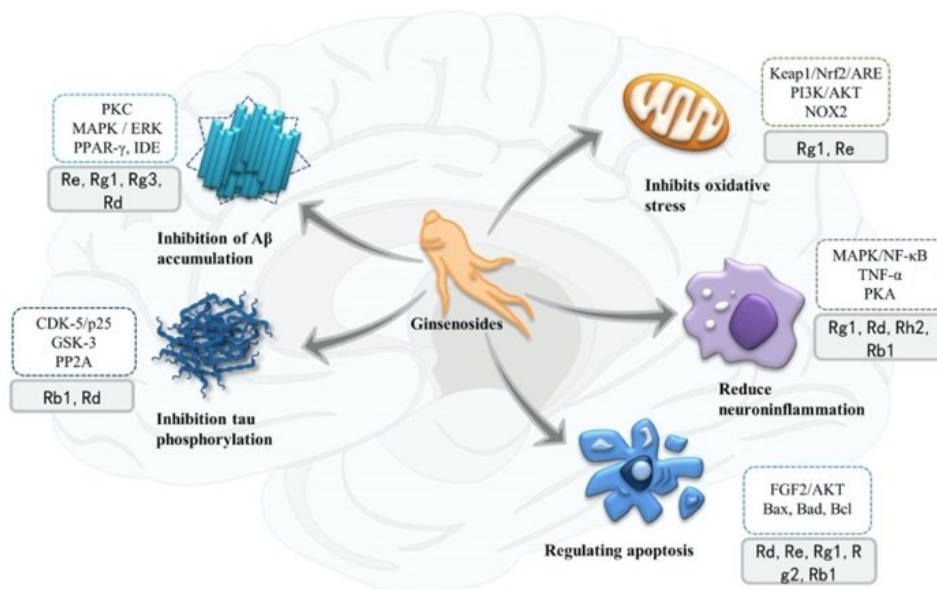


Figura 2.31. Attività dei ginsenosidi.

Il ginsenoside Rg1 è uno dei principi attivi più ampiamente studiati nel ginseng, ha dimostrato di avere effetti antiossidanti, antinfiammatori e anti-apoptotici in un gran numero di esperimenti in vivo e in vitro. Gli studi hanno dimostrato che il ginsenoside Rg1 può ridurre la formazione di placca amiloide regolando l'espressione di APP e le sue due vie metaboliche principali. In primo luogo, quindi il ginsenoside Rg1 ha inibito la produzione di A β alla fonte riducendo l'espressione di APP, poiché questa molecola è sovraespressa nell'Alzheimer. In secondo luogo, il ginsenoside Rg1 regola la via metabolica dell'APP regolando l' α -secretasi, infatti la somministrazione di ginsenoside Rg1 può aumentare i livelli di sAPP α e diminuire i livelli di A β nell'ippocampo. In terzo luogo, il ginsenoside Rg1 regola il metabolismo amiloidogenico percorso dell'APP attraverso la regolazione della β -secretasi. I risultati ottenuti in vivo e in vitro suggeriscono che il ginsenoside Rg1 può regolare l'attività della β -secretasi, inibire a sua volta i livelli di BACE1 e limitare i livelli di mRNA della β -secretasi nell'ippocampo di ratti con Alzheimer (Quan et al., 2020).

Un altro studio in vitro ha dimostrato che il ginsenoside Rg1 può aumentare l'espressione degli enzimi di degradazione dell'insulina (IDE) regolando il PPAR- γ , questi enzimi possono degradare efficacemente l'A β nel cervello ed eliminare gli effetti neurotossici dell'A β (Shi et al., 2022). Altri studi indicano che alcuni ginsenosidi nelle cellule intracellulari possono essere utilizzati come scavenger di radicali liberi e aumentare la funzionalità di enzimi antiossidanti endogeni (es. Superossido dismutasi e Glutazione perossidasi). A livello neuronale è principalmente espresso l'enzima NOX2, il che può portare a danni da stress ossidativo neuronale e alla perdita della funzione cerebrale, ma uno studio ha scoperto che il trattamento con ginsenosidi Rg1 ha ridotto significativamente l'espressione di NOX2 nei neuroni trattati con H₂O₂, riducendo così i livelli di radicali liberi nella corteccia nell'ippocampo e suggerendo così che Rg1 può alleviare la disfunzione cognitiva nell'Alzheimer inibendo lo stress ossidativo neuronale (Shi et al., 2022). La molecola Rg1 dopo la somministrazione orale è facilmente degradabile dai batteri intestinali, infatti, la biodisponibilità è solo del 1-20% ed è rapidamente eliminato nel sangue. Pertanto, la via nasale potrebbe essere una potenziale alternativa, difatti, studi hanno dimostrato un aumento nella distribuzione e nell'efficienza di trasporto al cervello di Rg1 (Huang et al., 2019). Altri studi in vitro definiscono che il pretrattamento con il ginsenoside Rd, inibisce la fosforilazione della Tau indotta da A β mantenendo così l'equilibrio funzionale tra glicogeno sintasi chinasi 3 β (GSK-3 β) e proteina fosfatasi 2A (PP-2A), inibendo a sua volta la fosforilazione della tau. Inoltre, è stato dimostrato sempre in vitro che il pretrattamento con la molecola Rb1, può inibire la trascrizione di CDK-5, stabilizzare l'omeostasi del calcio intracellulare e l'integrità dei microtubuli, indebolendo a sua volta l'iperfosforilazione della tau (Shi et al., 2022).

La pianta di ginseng grazie alle sue proprietà e i suoi effetti antiossidanti-antinfiammatori viene molto apprezzata in campo terapeutico per trattare l'Alzheimer. Infatti, vengono prodotti fitopreparati a base dell'estratto di ginseng. (Figura 2.32.)



Modalità d'uso: si consiglia di assumere 1 compressa la mattina e 1 nel pomeriggio lontano dai pasti principali.

Precauzione d'uso: in presenza di cardiovasculopatie e/o ipertensione consultare il Medico prima di assumere il prodotto.

Figura 2.32. Ginseng in compresse.

3. Piante ad alto contenuto antiossidante

3.1 *Ginkgo biloba* L.



Ginkgo biloba L. è l'unica specie sopravvissuta della famiglia Ginkgoaceae. Viene considerata la pianta a semi più antica al mondo, infatti, viene definita come un vero fossile vivente. Il ginkgo è originario della Cina nella regione montuosa dello Zhejiang e cresce allo stato spontaneo nelle sue foreste, ma attualmente è coltivata in tutto il mondo. L'albero può raggiungere un'altezza di 30–40 m, è molto ramificato e possiede una chioma larga di forma piramidale nelle piante giovani e una chioma ovale negli esemplari più vecchi. I rami principali detti macroblasti portano numerosi rametti più corti detti branchiblasti dove si inseriscono le foglie. Il tronco possiede una corteccia liscia di color argento che con lo svilupparsi della pianta diventa di colore brunastro. Le foglie sono di forma a ventaglio (foglia labelliforme), sono percorse da tante nervature e hanno un lungo picciolo. Le foglie sono di colore verde fino all'autunno quando diventano di un giallo intenso prima di cadere dai rami. Il *G. biloba* essendo una gimnosperma non presenta i fiori ma ha strutture definite strobili. Essendo una pianta dioica ha strutture fertili maschili e femminili separate su piante diverse. Gli strobili maschili sono formati da un asse allungato, flessibile e pendulo con numerosi "stami" ognuno provvisto di due sacche polliniche. Ogni sacca pollinica contiene numerosi granuli pollinici in cui avvengono alcune divisioni vegetative prima che siano diffusi dal vento. Gli strobili femminili sviluppano invece ovuli arancioni, appaiati all'apice di corte ramificazioni biforcute. Ogni ovulo presenta un tegumento tristratificato con uno strato esterno molto sviluppato, quello medio fortemente sclerenchimatizzato specialmente nel seme (e quello interno più sottile, il quale è percorso da fasci vascolari. L'impollinazione della pianta è anemogama ovvero che la dispersione avviene attraverso il vento.



I semi che si trovano all'interno dell'ovulo sono carnosì, di color giallo bruno e assomigliano a piccole prugne, le quali sono commestibili prima della maturazione. Quando maturano diventano fetidi per la presenza di acido butirrico.



3.1.1 La droga e i principi attivi

Dalle foglie essiccate (Figura 3.1.), raccolte al tempo balsamico ossia all'inizio dell'autunno, si ottiene l'estratto secco.. I principali fitocostituenti nel ginkgo sono due gruppi chimici particolarmente importanti dal punto di vista terapeutico ovvero i Glicosidi Flavonoidici come il kampferolo, quercetina, isoramnetina, catechine e i Terpeni come il bilobalide (sesquiterpene) e il ginkgolide A-B-C-J-M (diterpeni). (Figura 3.2.) I principi attivi si trovano nel vacuolo, dove sono depositati come glicosidi per rimanere stabili in ambiente acquoso. La concentrazione di diterpeni e glicosidi flavonoidici aumenta in autunno, per questo le foglie vanno raccolte in quel determinato periodo.



Figura 3.1. Foglie essiccate di ginko.

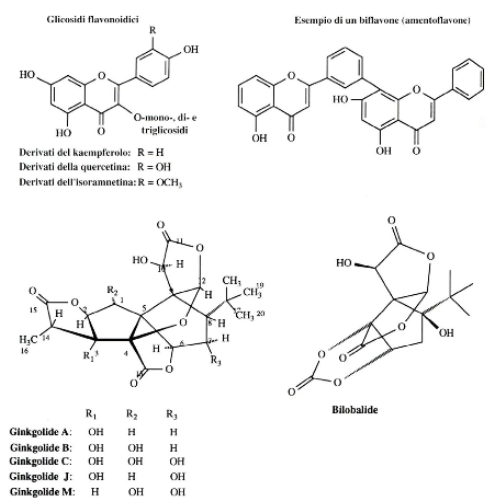


Figura 3.2. Principali fitocostituenti del ginko.

3.1.2 Proprietà e utilizzi

Il ginko grazie ai suoi fitocostituenti è conosciuto per le sue spiccate proprietà antiossidanti, antinfiammatorie, adattogene, cardioprotettive e immunostimolanti. L'utilizzo della pianta può essere associato a numerosi benefici per la salute, come favorire la memoria e l'attività cognitiva nella malattia di Alzheimer, migliorare lo stato di salute di pazienti affetti dalla sindrome di Raynaud e proteggere l'organismo dalle specie radicaliche e di conseguenza dai processi legati all'invecchiamento, all'insulino-resistenza e alle condizioni cardiovascolari. In diversi studi è stato dimostrato che i flavonoidi presenti in *G. biloba*, hanno proprietà antinfiammatorie. L'infiammazione è un processo biochimico che tipicamente viene innescata dal rilascio di sostanze dai tessuti e dalle cellule migratorie, come istamina, prostaglandine e leucotrieni. La **Bilobetina** e **Isoginkgetina**, i composti più potenti identificati nell'estratto di ginko, hanno aumentato l'inibizione dell'ossido nitrico e inibito i livelli di mRNA di TNF- α , IL-6 e ciclo-ossigenasi 2, le quali sono sostanze rappresentative della risposta infiammatoria (Noor-E-Tabassum et al., 2022). Attualmente è noto che il **Ginkgolide A**, possa sopprimere la ciclo-ossigenasi 2 e la 5 lipo-ossigenasi, enzimi che convertono l'acido arachidonico in prostaglandine e leucotrieni (Barbalho et al., 2022). Il ginko poi ha dimostrato di dare benefici contro una varietà di sostanze radicaliche, grazie alle sue proprietà antiossidanti contribuisce a proteggere il sistema cardiovascolare, il cervello e la retina. In diversi studi si è visto che il **Ginkgolide B** ha potenziato l'attività del superossido dismutasi e dell'ossido nitrico endoteliale sintasi, riducendo al contempo i livelli di malondialdeide e migliorando l'espressione delle subunità NADP-ossidasi e dell'enzima glutatione perossidasi 1. Poi è stato dimostrato che l'estratto di foglie di *G. biloba* e l'estratto di etanolo acquoso di *G. biloba* mostrano effetti protettivi sull'invecchiamento della pelle. L'estratto applicato come formula topica ha una buona penetrazione e ritenzione cutanea, con effetti benefici per la

pelle, compresa la protezione dai danni generati dai raggi UV (Noor-E-Tabassum et al., 2022). I polisaccaridi all'interno della pianta (GBPS) esercitano una maggiore risposta antitumorale e immunitaria. Più precisamente GBPS-2 e GBPS-3 hanno notevolmente migliorato la fagocitosi dei macrofagi e aumentato l'attività di NO, TNF- α , IL-1 e IL-6, suggerendo che queste due molecole possano stimolare il sistema immunitario. Diverse indagini in vivo hanno dimostrato che il ginkgo possiede effetti antidiabetici, infatti, l'estratto può diffondere i livelli di glicogeno nel muscolo e nel fegato, e di conseguenza ridurre i livelli di glucosio nel plasma, inoltre, può ridurre l'HbA1c e il peso corporeo, questo suggerisce che il ginkgo possa migliorare la resistenza all'insulina (Barbalho et al., 2022). Inoltre, diversi studi hanno determinato che il **Ginkgolide A** svolge un ruolo importante come agente antitrombotico, infatti, potrebbe essere utilizzato per la prevenzione e per il controllo della trombosi. Questo fitocostituente può inibire l'aggregazione piastrinica e l'aggregazione piastrinica stimolata dal collagene. L'assunzione di ginkgo è stata anche associata a un miglioramento della cardiomiopatia, che è una causa comune di insufficienza cardiaca. Gli effetti benefici del *G. biloba* e dei suoi composti bioattivi in questa condizione patologica sono legati al miglioramento della circolazione sanguigna e di percorsi multipli associati alla regolazione delle azioni antiapoptotiche (Barbalho et al., 2022). Attualmente, l'estratto standardizzato **EGb 761** è uno degli estratti più popolari per i suoi effetti benefici, il quale si trova sotto forma di estratto secco ed è arricchito di principi farmacologicamente attivi quali flavonoidi, lattoni terpenici, acidi organici e proantocianidine, ed è impoverito di qualsiasi componente tossico es. acidi ginkgolidi. Questa preparazione è utilizzata principalmente per la sua attività neuroprotettiva nelle disfunzioni cognitive, in particolare nei deficit di memoria. L'estratto di EGb 761 ha un effetto neuroprotettivo, inibisce il processo infiammatorio, l'apoptosi e abbassa il livello della proteina precursore dell'amiloide APP. Uno studio ha affermato che la somministrazione di EGb 761 per 7 giorni, nell'occlusione dell'arteria cerebrale media (modello I/R di danno cerebrale focale indotto nei ratti), ha determinato un miglioramento dei deficit neurologici mediante la riduzione del contenuto di malondialdeide e delle citochinine pro-infiammatorie e l'aumento dei livelli di citochinina antinfiammatoria interleuchina 10. Un altro vantaggio di questo estratto è la riduzione della quantità delle specie radicaliche e regola positivamente l'espressione di RNAm degli enzimi antiossidanti, come il superossido dismutasi mitocondriale (MnSOD) e il glutatione perossidasi (GPx). Inoltre, l'EGb 761 ha un effetto protettivo diretto sui mitocondri: protegge i neuroni dalla β -tossicità che causa disfunzione mitocondriale, riduce lo stress ossidativo, migliorando la respirazione mitocondriale e protegge le cellule dalla neurotossicità indotta da NO riducendo l'aumento dell'attività della caspasi-9 che attiva la caspasi-3, che porta all'apoptosi cellulare. L'effetto antiossidante è correlato alla rimozione dell'anione superossido e del radicale idrossile, che di conseguenza previene

la perossidazione lipidica nelle membrane mitocondriali. Studi clinici hanno esaminato che la somministrazione giornaliera di 240 mg di EGb 761 a pazienti affetti da demenza, può stabilizzare o ritardare il declino mentale, specialmente tra individui con sintomi neuropsichiatrici. Poi è stato condotto un altro esperimento clinico, per esaminare l'efficacia antidiabetica dell'estratto quando viene combinato con metformina come terapia adiuvante. In uno studio controllato in doppio cieco della durata di 3 mesi, 60 pazienti con diabete mellito 2 sono stati assegnati in modo casuale a una delle due classi (GBE 120 mg/die o placebo (amido) 120 mg/die). La somministrazione dell'estratto di ginkgo ha ridotto drasticamente i livelli di glucosio plasmatico a digiuno e i valori di HbA1c nel sangue (Nowak et al., 2021).

Lo scopo del seguente studio è stato di determinare l'efficacia clinica di un estratto standardizzato di *Ginkgo biloba*, il **Seredrin**, il quale viene utilizzato nel trattamento della sindrome di Raynaud (RP) (Muir et al., 2002). Questa patologia è caratterizzata da un vasospasmo a livello della mano, scatenato da alcuni stimoli, tipo la risposta al freddo o a uno stress emotivo, che alterano il flusso sanguigno nelle zone periferiche del nostro organismo, quali le dita. Nei casi più gravi, la riduzione della circolazione a livello delle dita può diventare cronica e portare alla formazione di ulcere. Il sintomo principale è il tipico cambiamento di colore (Figura 3.3.) che avviene in tre fasi, le dita inizialmente diventano bianche per lo spasmo dei vasi sanguigni, poi blu quando si ripristina la circolazione venosa e infine rosse quando anche il sangue arterioso torna a circolare. La frequenza, durata e gravità dello spasmo dei vasi sanguigni sono variabili e vengono accompagnati generalmente dall'intorpidimento e dall'alterazione della sensibilità tattile.



Figura 3.3. Sindrome di Raynaud.

Nello studio sono stati arruolati 19 pazienti con RD, a tutti i pazienti è stato consegnato un diario tascabile in cui è stato chiesto loro di registrare la frequenza, la gravità e la durata di qualsiasi attacco vasospastico. La metà dei pazienti è stata randomizzata a ricevere l'estratto di Ginkgo biloba 120 mg tre volte al giorno (totale 360 mg al giorno) e l'altra metà ha ricevuto un placebo corrispondente, il trattamento è durato 10 settimane. Né i pazienti né i ricercatori erano a conoscenza dell'allocazione del gruppo di trattamento. I pazienti sono stati rivisti dopo due, quattro e 10 settimane di trattamento. L'analisi delle schede del diario ha mostrato che il numero medio di attacchi prima del trattamento nel gruppo placebo era di 14,6 attacchi a settimana, mentre il numero medio di attacchi dopo 10 settimane di placebo era di 10,7, mentre il numero di attacchi alla settimana prima del trattamento con l'estratto di ginkgo era 13,2 riducendosi poi a 5,8. Ciò si traduce in una riduzione del numero di attacchi del 56% nel gruppo attivo rispetto al 27% nel gruppo placebo. La durata media degli attacchi è risultata essere di 28 minuti nel gruppo di controllo prima della terapia con placebo e di 17 minuti dopo la terapia, mentre la durata degli attacchi nel gruppo attivo era di 27,8 minuti prima della terapia con il ginkgo e 10,3 minuti dopo la terapia. Il numero di attacchi a settimana e gli intervalli sono espressi nella (Tabella 3.1.) (Muir et al., 2002).

Tabella 3.1. Media degli spasmi prima e dopo il trattamento con ginkgo.

Patient demographics	Placebo	Ginkgo
Sex	9 females/1 male	9 females
Median age (range)	42 (18–52)	36 (19–51)
Nonsmokers	9	7
Smokers	1	1
Ex-smokers	0	1
Median number of attacks/week [range]		
Before treatment	13 [1–30]	8 [3–63]
After treatment	9 [0–38]	4 [0–32]

Questo studio è interessante in quanto ha dimostrato che l'estratto di ginkgo grazie alle sue proprietà antiradicaliche e i suoi effetti antiplastrinici, ha ridotto in maniera significativa il numero di attacchi di Raynaud al giorno.

3.2 *Vaccinium myrtillus* L.



Vaccinium myrtillus L. è una pianta angiosperma dicotiledone che appartiene alla famiglia delle Ericaceae. Il mirtillo nero si presenta come un piccolo arbusto alto 50-60 cm, con fusti molto ramificati che hanno origine da un rizoma strisciante. Questa pianta è presente in tutto l'emisfero boreale, in Italia si trova sia nelle Alpi che negli Appennini e ama i terreni acidi. Le foglie sono alterne, con lamina sottile e di forma ovale-ellittica con base arrotondata, con margine finemente dentellato e apice acuto. Le foglie sono di colore verde, si presentano più chiare nella pagina inferiore dove sono ben visibili nervature reticolate. I fiori sono piccoli e solitari, penduli e di forma campaniforme. Il calice è gamosepalo, diviso in cinque cortissimi lobi ottusi. La corolla è bianco-verdicia o rosata, urceolata, con 5 piccoli lobi revoluti. Gli stami sono 10 con appendici subulate e l'ovario è infero con 5 carpelli saldati. Lo stilo del fiore è brevemente sporgente. Il frutto è una bacca carnosa subsferica, di colore blu-violacea/nerastra, leggermente schiacciata all'apice dove conserva la caratteristica cicatrice anulare. La parte interna è più chiara e contiene numerosi semi bruni di forma semilunare.



3.2.1 La droga e i principi attivi

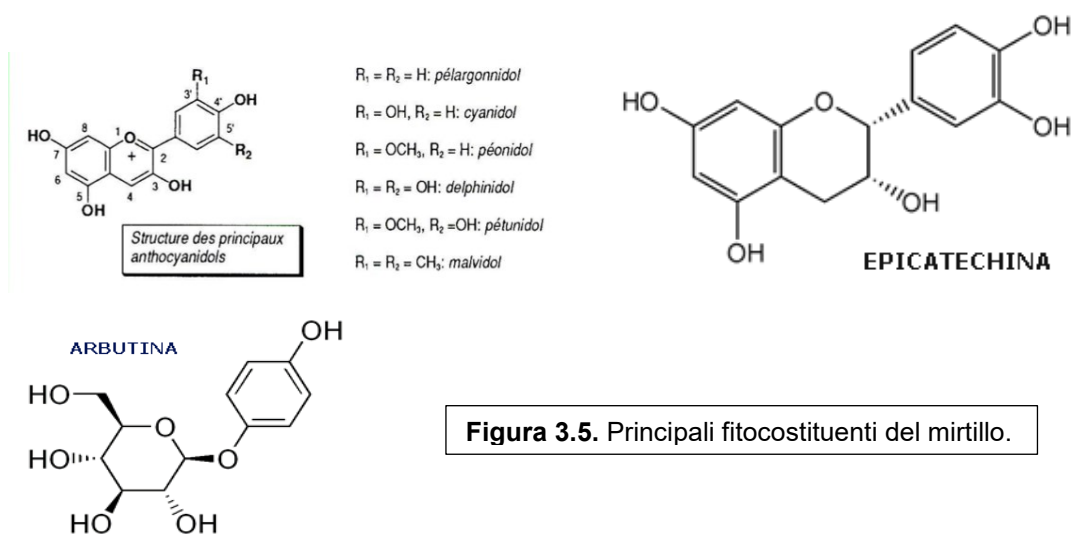
La droga della pianta sono le foglie essiccate e i frutti freschi. (Figura 3.3.- 3.4.) Le foglie sono raccolte durante l'estate (giugno-luglio), poi vengono essiccate all'ombra in un luogo aerato e in fine conservate in sacchetti di carta o tela al riparo da polvere e umidità. I frutti vanno raccolti ad agosto a completa maturazione, i quali possono essere utilizzati freschi, o possono essere congelati per conservarne le caratteristiche e le proprietà. I principali componenti presenti nel mirtillo sono: antociani (mirtillina), tannini, flavonidi, acidi organici (a. malico e citrico), arbutina, sostanze peptiche e vitamina C-B. Più precisamente nelle foglie sono contenuti composti idrochinonici, tannini catechinici e inoltre è stato isolato anche un derivato metilato dell'acido gallico indicato con il nome di neomirtillina. Nei frutti invece sono presenti elevate concentrazioni di antocianoisidi (estratto al 25%) e agliconi differenti a seconda dei sostituenti presenti a livello di anello B della struttura flavonoidica, inoltre sono presenti tannini catechinici (10%). (Figura 3.5.)



Figura 3.3. Foglie essiccate di mirtillo.



Figura 3.4. Frutto fresco di mirtillo.



3.2.2 Proprietà e utilizzi

Il mirtillo grazie alle sue proprietà antiossidanti, antinfiammatorie, vasoprotettive, antidiarroiche e ipoglicemicizzanti conferite dai suoi fitocostituenti, può avere molteplici attività benefiche nell'organismo. L'estratto secco titolato di mirtillo ha un'azione protettiva sugli occhi, infatti, è in grado di migliorare la visione notturna, facilitando la rigenerazione della rodopsina, che è il pigmento retinico essenziale per la visione in condizioni di scarsa luminosità. Inoltre, studi clinici dimostrano che gli antocianosidi del mirtillo riducono i danni ai capillari della retina in modo statisticamente significativo. Il mirtillo combatte la fragilità e l'eccessiva permeabilità vasale, mostrando quindi un'azione vasoprotettiva sia a livello dei vasi sanguigni della retina sia di quelli periferici. Questa azione è dovuta agli antocianosidi che si sono dimostrati capaci di inibire l'attività di alcuni enzimi proteolitici, i quali sono responsabili della distruzione del collagene e del tessuto elastico. Recentemente, si è scoperto che gli antocianosidi del mirtillo inibiscono l'adesione dei colibacilli alla parete dell'intestino e della vescica, attribuendo alla pianta un'attività antidiarroica e disinfettante delle vie urinarie, oltre alla loro azione diretta, questi composti possono agire in sinergia con farmaci antibiotici allopatici. Gli effetti sinergici risiedono nella capacità di alcuni composti naturali ad esempio i polifenoli, di aumentare la permeabilità della membrana batterica, facilitando così l'ingresso cellulare degli antibiotici. Inoltre, questa terapia combinatoria può ridurre lo sviluppo della resistenza antibatterica. Le foglie del mirtillo contengono tannini, glucosidi flavonoidi che forniscono un'attività astringente e antidiarroici come i frutti, ma sono anche ipoglicemicizzanti perché contengono la glucochina, sostanza che abbassa il contenuto di glucosio nel sangue. I frutti freschi sono in grado di inibire la formazione di radicali liberi, questo è reso possibile grazie alla presenza di numerosi sali minerali, come calcio, fosforo, ferro, sodio e potassio e di vitamine A e C, contribuendo così alla salute del collagene preposto alla rigenerazione cellulare della cute, infatti, sono perfetti alleati contro le rughe. Infine, alcuni studi hanno messo in evidenza la capacità del mirtillo di contrastare il declino cognitivo legato all'invecchiamento e alcune malattie come il morbo di Alzheimer, tale attività sarebbe legata sempre agli antociani, i quali sarebbero responsabili di un'elevata azione antiossidante, una migliore trasmissione neuronale e una migliorata disponibilità di glucosio, tutti fattori che contribuirebbero a prevenire ed attenuare la degenerazione cerebrale. Nel seguente studio si è valutata la potenzialità antiossidante dell'estratto naturale di mirtillo con antociani standardizzati, il **Mirtoselect®**, ottenuto estraendo l'intera gamma dei componenti non antocianici. Sono state arruolate 21 persone, 11 soggetti trattati con l'estratto e gli altri 10 con il placebo. Nel gruppo trattato con l'estratto di mirtillo, non è stato osservato alcun cambiamento significativo del d-ROM (indicatore di stress ossidativo) (Figura 3.6. A), mentre il BAP (indicatore del potenziale antiossidante), è aumentato significativamente durante il periodo di studio. (Figura 3.6. B) Il rapporto tra

BAP/d-ROMs modificato (indicatore di equilibrio complessivo tra potenziale antiossidante e stress ossidativo), è aumentato nel gruppo attivo contrariamente al gruppo placebo (Figura 3.7.), indicando così che **Mirtoselect** potrebbe esercitare un'azione protettiva contro le specie reattive dell'ossigeno (Bilberry Extract in Dry Eye, n.d.).

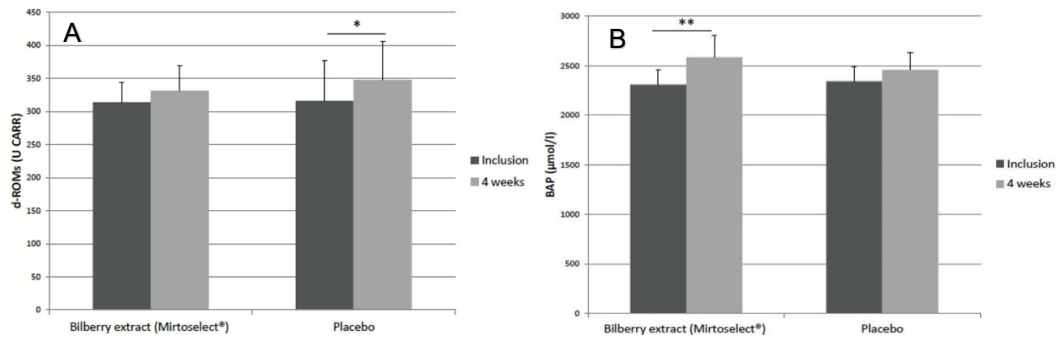


Figura 3.6. Valutazione dei metaboliti dell'ossigeno reattivi al diacron plasmatico e del potenziale antiossidante biologico (BAP) (Bilberry Extract in Dry Eye, n.d.).

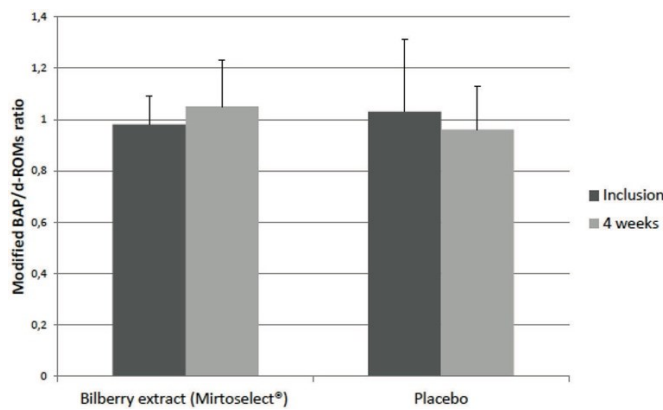


Figura 3.7. Valutazione del rapporto potenziale antiossidante biologico modificato (BAP)/metaboliti dell'ossigeno reattivi al diacron (d-ROM) nel plasma (Bilberry Extract in Dry Eye, n.d.).

5. Conclusioni

I dati ottenuti e descritti in questo progetto di tesi, affermano che lo squilibrio tra l'eccessiva quantità di sostanze ossidanti e l'inefficienza antiossidante da origine allo stress ossidativo. Se il processo degenerativo non viene modulato, questo può danneggiare varie componenti del nostro organismo ed essere causa di patogenesi di diverse malattie. Infatti, alcuni studi discussi nella tesi, affermano che c'è una correlazione diretta tra lo stress ossidativo e il diabete. Si è visto come le persone diabetiche siano più suscettibili allo sviluppo di stress ossidativo, in quanto, uno stato iperglicemico porta allo sviluppo di una quantità eccessiva di specie radicaliche e la soppressione dei sistemi di difesa antiossidante. Inoltre, l'evidenza sperimentale implica il ruolo delle specie radicaliche nella compromissione della funzione delle cellule beta causata da reazioni autoimmuni, citochine e proteine infiammatorie nel diabete di tipo 1. Allo stesso modo, nell'Alzheimer diversi studi presentati affermano un legame diretto con lo stress ossidativo, infatti, si è visto che lo stress ossidativo può promuovere la deposizione di placca beta amiloide e l'iperfosforilazione delle proteine TAU, le quali sono le principali cause di sviluppo dell'Alzheimer.

In conclusione, si può affermare che l'assunzione giornaliera di frutta e verdura, le quali contengono una vasta gamma di sostanze antiossidanti esogene es. polifenoli, carotenoidi, vitamine e l'utilizzo di fitopreparati ottenuti da diverse piante officinali come ***Galega officinalis* L.**, ***Curcuma longa* L.**, ***Ginkgo biloba* L.**, ***Vaccinium myrtillus* L.**, possono essere una strategia valida di rimedio per modulare le specie radicaliche e di conseguenza per trattare lo stress ossidativo e le patologie ad esso legate come il diabete e l'Alzheimer.

6. Bibliografia

- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. (2013). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. In *Diabetes Care* (Vol. 36, Issue SUPPL.1).
- Ashok, A., Andrabi, S. S., Mansoor, S., Kuang, Y., Kwon, B. K., & Labhasetwar, V. (2022). Antioxidant Therapy in Oxidative Stress-Induced Neurodegenerative Diseases: Role of Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems in Clinical Translation. In *Antioxidants* (Vol. 11, Issue 2).
- Barbalho, S. M., Direito, R., Laurindo, L. F., Marton, L. T., Guiguer, E. L., Goulart, R. de A., Tofano, R. J., Carvalho, A. C. A., Flato, U. A. P., Tofano, V. A. C., Detregiachi, C. R. P., Santos Bueno, P. C., Girio, R. S. J., & Araújo, A. C. (2022). Ginkgo biloba in the Aging Process: A Narrative Review. In *Antioxidants* (Vol. 11, Issue 3).
- Bilberry extract in dry eye. (n.d.).
- Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. In *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* (Vol. 25, Issue 3, pp. 287–299).
- Chen, Z., & Zhong, C. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease. In *Neuroscience Bulletin* (Vol. 30, Issue 2, pp. 271–281). Science Press.
- Darenskaya, M. A., Kolesnikova, L. I., & Kolesnikov, S. I. (2021a). Oxidative Stress: Pathogenetic Role in Diabetes Mellitus and Its Complications and Therapeutic Approaches to Correction. In *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* (Vol. 171, Issue 2, pp. 179–189). Springer.
- Darenskaya, M. A., Kolesnikova, L. I., & Kolesnikov, S. I. (2021b). Oxidative Stress: Pathogenetic Role in Diabetes Mellitus and Its Complications and Therapeutic Approaches to Correction. In *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* (Vol. 171, Issue 2, pp. 179–189). Springer.
- Ege, D. (2021). Action mechanisms of curcumin in alzheimer's disease and its brain targeted delivery. In *Materials* (Vol. 14, Issue 12).
- El Gaamouch, F., Chen, F., Ho, L., Lin, H. Y., Yuan, C., Wong, J., & Wang, J. (2022). Benefits of dietary polyphenols in Alzheimer's disease. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A.
- Elbini-Dhouib, I., Doghri, R., Ellefi, A., Degrach, I., Srairi-Abid, N., & Gati, A. (2021). Curcumin attenuated neurotoxicity in sporadic animal model of alzheimer's disease. *Molecules*, 26(10).
- Hachkova, H., Nagalievska, M., Soliljak, Z., Kanyuka, O., Kucharska, A. Z., Sokół-Łętowska, A., Belonovskaya, E., Buko, V., & Sybirna, N. (2021). Medicinal plants galega officinalis L. And yacon leaves as potential sources of antidiabetic drugs. *Antioxidants*, 10(9).
- Huang, X., Li, N., Pu, Y., Zhang, T., & Wang, B. (2019). Neuroprotective effects of ginseng phytochemicals: Recent perspectives. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 16).
- Jenkins DJ, Wolever TM, Taylor RH, Barker H, Fielden H, Baldwin JM, Bowling AC, Newman HC, Jenkins AL, Goff DV. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *Am J Clin Nutr.* 1981 Mar;34(3):362-6.

- Keijer, J., Bunschoten, A., Paloub, A., Franssen-Van Hala, N. L. W., Bunschoten, A., Palou, A., & Franssen-Van Hal, N. L. W. (2005). Beta-carotene and the application of transcriptomics in risk-benefit evaluation of natural dietary components Recommended Articles. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 1740).
- Khan, S., Barve, K. H., & Kumar, M. S. (2020). Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology*, 18(11), 1106–1125.
- Kotha, R. R., Tareq, F. S., Yildiz, E., & Luthria, D. L. (2022). Oxidative Stress and Antioxidants—A Critical Review on In Vitro Antioxidant Assays. In *Antioxidants* (Vol. 11, Issue 12).
- Lachin, T. (2014). *Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net Recent Patents Effect of Antioxidant Extract from Cherries on Diabetes* (Vol. 8).
- Li, W., Chen, H., Xu, B., Wang, Y., Zhang, C., Cao, Y., & Xing, X. (2023). Research progress on classification, sources and functions of dietary polyphenols for prevention and treatment of chronic diseases. In *Journal of Future Foods* (Vol. 3, Issue 4, pp. 289–305). Beijing Academy of Food Sciences.
- Mariadoss, A. V. A., Sivakumar, A. S., Lee, C. H., & Kim, S. J. (2022). Diabetes mellitus and diabetic foot ulcer: Etiology, biochemical and molecular based treatment strategies via gene and nanotherapy. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 151). Elsevier Masson s.r.l.
- Mendonça, J. da S., Guimarães, R. de C. A., Zorgetto-Pinheiro, V. A., Fernandes, C. D. Pietro, Marcelino, G., Bogo, D., Freitas, K. de C., Hiane, P. A., Melo, E. S. de P., Vilela, M. L. B., & Do Nascimento, V. A. (2022). Natural Antioxidant Evaluation: A Review of Detection Methods. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 11).
- Muir, A. H., Robb, R., McLaren, M., Daly, F., & Belch, J. J. F. (2002). The use of Ginkgo biloba in Raynaud's disease: A double-blind placebo-controlled trial. *Vascular Medicine*, 7(4), 265–267.
- Noor-E-Tabassum, Das, R., Lami, M. S., Chakraborty, A. J., Mitra, S., Tallei, T. E., Idroes, R., Mohamed, A. A. R., Hossain, M. J., Dhama, K., Mostafa-Hedeab, G., & Emran, T. Bin. (2022). Ginkgo biloba: A Treasure of Functional Phytochemicals with Multimedicinal Applications. In *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* (Vol. 2022). Hindawi Limited.
- Nowak, A., Kojder, K., Zielonka-Brzezicka, J., Wróbel, J., Bosiacki, M., Fabiańska, M., Wróbel, M., Sołek-Pastuszka, J., & Klimowicz, A. (2021). The Use of Ginkgo Biloba L. as a Neuroprotective Agent in the Alzheimer's Disease. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A.
- Oxidative stress. (n.d.).
- Padhi, S., Nayak, A. K., & Behera, A. (2020). Type II diabetes mellitus: a review on recent drug based therapeutics. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 131). Elsevier Masson SAS.
- Payne, A., Nahashon, S., Taka, E., Adinew, G. M., & Soliman, K. F. A. (2022). Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG): New Therapeutic Perspectives for Neuroprotection, Aging, and Neuroinflammation for the Modern Age. In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 3).

- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2017). Hindawi Limited.
- Quan, Q., Li, X., Feng, J., Hou, J., Li, M., & Zhang, B. (2020). Ginsenoside Rg1 reduces β -amyloid levels by inhibiting CDK5-induced PPAR γ phosphorylation in a neuron model of Alzheimer's disease. *Molecular Medicine Reports*, 22(4), 3277–3288.
- Shi, Z., Chen, H., Zhou, X., Yang, W., & Lin, Y. (2022). Pharmacological effects of natural medicine ginsenosides against Alzheimer's disease. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A.
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. In *Redox Biology* (Vol. 4, pp. 180–183). Elsevier B.V.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. In *Chemico-Biological Interactions* (Vol. 160, Issue 1, pp. 1–40). Elsevier Ireland Ltd.
- Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H. gon, & Zhu, X. (2014). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1842, Issue 8, pp. 1240–1247). Elsevier.
- Yin, J., Xing, H., & Ye, J. (n.d.). *Efficacy of Berberine in Patients with Type 2 Diabetes*.
- Zhang, H., Wei, W., Zhao, M., Ma, L., Jiang, X., Pei, H., Cao, Y., & Li, H. (2021). Review interaction between $a\beta$ and tau in the pathogenesis of alzheimer's disease. *International Journal of Biological Sciences*, 17(9), 2181–2192.