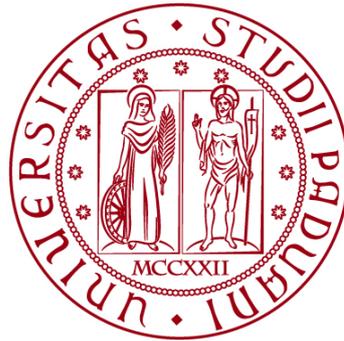


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

**Il carotenoide Astaxantina: un potenziale
alleato nella cura del diabete e delle sue
complicanze**

**Tutor: Prof.ssa Elide Formentin
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Giulia Berto

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

1. Introduzione	1
1.1 <i>Classificazione e descrizione della molecola astaxantina</i>	1
1.2 <i>Via di biosintesi</i>	2
1.3 <i>Produzione della molecola</i>	4
1.3.1 <i>In vivo</i>	4
1.3.2 <i>In vitro</i>	6
1.4 <i>Biodisponibilità</i>	6
1.5 <i>Il duplice uso dell'astaxantina</i>	7
1.5.1 <i>Nutrizione umana</i>	7
1.5.2 <i>Nutrizione delle specie marine</i>	7
2. Azione dell'astaxantina	7
2.1 <i>Modalità di azione nelle membrane biologiche</i>	7
2.2 <i>Stereoisomeri efficaci e inefficaci per la salute umana</i>	8
3. Modelli sperimentali <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	8
4. Studi e risultati sull'efficacia dell'astaxantina contro il diabete	9
4.1 <i>L'uso di astaxantina contro il diabete di tipo 1 e 2</i>	9
4.2 <i>L'astaxantina e il suo ruolo benefico contro le complicanze del diabete</i> 12	
4.2.1 <i>Effetto antinfiammatorio</i>	14
4.2.2 <i>Protezione cardiovascolare</i>	14
4.2.3 <i>Retinopatia diabetica</i>	15
4.2.4 <i>Nefropatia diabetica</i>	16
4.2.5 <i>Neuropatia diabetica</i>	17
5. Modalità di somministrazione	18
5.1 <i>Dose giornaliera consigliata</i>	18
5.2 <i>Effetti collaterali nell'uso di astaxantina</i>	18
6. Criticità osservate e nuove tecniche che potrebbero essere usate	18
7. Conclusioni	20
8. Bibliografia	20

1. Introduzione

1.1 Classificazione e descrizione della molecola astaxantina

Il diabete è una patologia che si sta diffondendo sempre di più sia tra giovani che adulti. La causa dell'insorgenza del diabete è la perdita o la diminuzione della funzionalità delle cellule β del pancreas, le quali, non potendo più produrre insulina, porteranno come risultato ad una deviazione dei parametri fisiologici della glicemia nel sangue senza la possibilità di ripristinare i valori normali. Le modalità sono diverse nei due tipi di diabete. Nel diabete di tipo 1 le cellule β del pancreas perderanno del tutto la loro funzione a causa di una distruzione autoimmune, nel diabete di tipo 2 le cellule β avranno una diminuzione nella capacità di secrezione dell'insulina, dovuta solitamente ad uno stile di vita sbagliato. Questi alti livelli di glucosio causeranno stress ossidativo, che a lungo andare darà origine a tutta una serie di patologie molto complesse che andranno a minare lo stile di vita di chi ne soffre (Eizirik et al., 2020).

Esiste una classe di molecole con potere antiossidante che potrebbe avere un potenziale utilizzo nella cura sia del diabete che delle sue complicanze. Tra questi, l'astaxantina, un carotenoide con alto potere antiossidante, potrebbe diventare un ottimo alleato nella cura di queste patologie. Lo scopo di questa tesi è riportare gli studi che sono stati condotti su diversi modelli, sia in vivo che in vitro, per capire il ruolo più o meno utile di questo carotenoide nella cura del diabete e delle sue complicanze croniche.

L'astaxantina appartiene al gruppo dei carotenoidi, una classe di pigmenti presenti negli organismi che sono in grado di fare fotosintesi sia ossigenica che anossigenica. I carotenoidi possiedono uno scheletro formato da 40 atomi di carbonio con legami doppi coniugati. Sono conosciuti anche come tetraterpeni. I carotenoidi si possono distinguere in carotenoidi idrocarburici e in xantofille (Rascio et al., 2021), queste ultime sono forme ossigenate di cui fa parte anche l'astaxantina (Stachowiak e Szulc, 2021).

L'astaxantina, la cui struttura è stata identificata da Kuhn e Sorenson nel 1938, è formata da uno scheletro a 40 atomi di carbonio con due anelli terminali ai lati della molecola. Si tratta di anelli di β -ionone portanti nel sito 3,3' due carboni asimmetrici che possiedono gruppi idrossilici (Kumar et al., 2021) (Fig. 1).

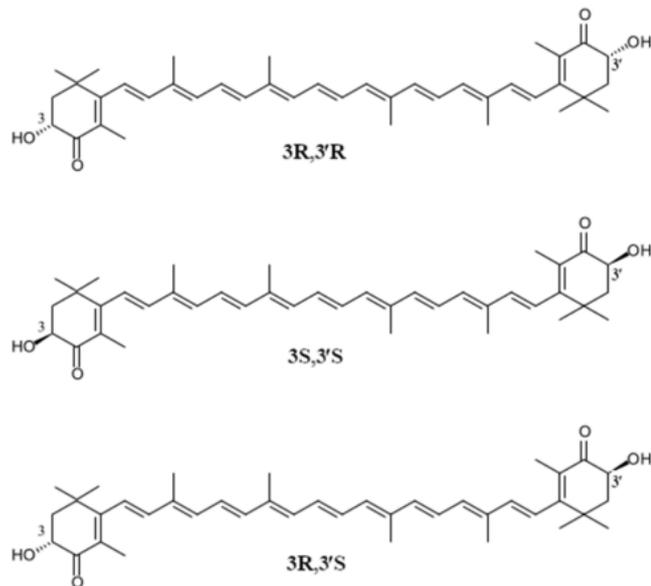


Figura 1. Stereoisomeri dell'astaxantina (Stachowiak e Szulc, 2021)

La forma diestereica della molecola, che viene a formarsi quando entrambi i suoi gruppi idrossilici reagiscono con un acido grasso, ha un effetto due volte più potente rispetto alla semplice astaxantina libera. Esiste inoltre anche una forma monoestereica, dovuta alla reazione tra un acido grasso e un gruppo idrossilico. Le caratteristiche di questa molecola, come la configurazione polare e l'attività antiossidante, sono dovute ai gruppi chetonici e idrossilici presenti nei due anelli terminali che possono neutralizzare i radicali dell'ossigeno. Il doppio legame coniugato è responsabile del caratteristico colore rosso.

L'astaxantina può proteggere la cellula dai radicali liberi dell'ossigeno formando un composto stabile a partire da ossigeno singoletto e dai radicali perossile e idrossile (Kumar et al., 2021).

1.2 Via di biosintesi

La biosintesi dell'astaxantina è un processo complesso che avviene grazie a molte reazioni consecutive (Fig. 2). Questa molecola è un terpenoide (possiede quindi 40 atomi di carbonio) e per questo motivo la sua sintesi inizia dai due precursori di tutti i carotenoidi, IPP (isopentenil pirofosfato) e DMAPP (dimetilallile pirofosfato). Le vie che porteranno alla formazione di questi due ultimi composti sono due, la via dell'acido mevalonico (MVA) tipica degli eucarioti, e la via del MEP (2C-metil-D-eritritolo-4-fosfato) che avviene nei plastidi di procarioti e piante. Le due vie presentano anche altre differenze, come la quantità di IPP prodotta, che risulta essere maggiore nella via del MEP (Basiony et al., 2022).

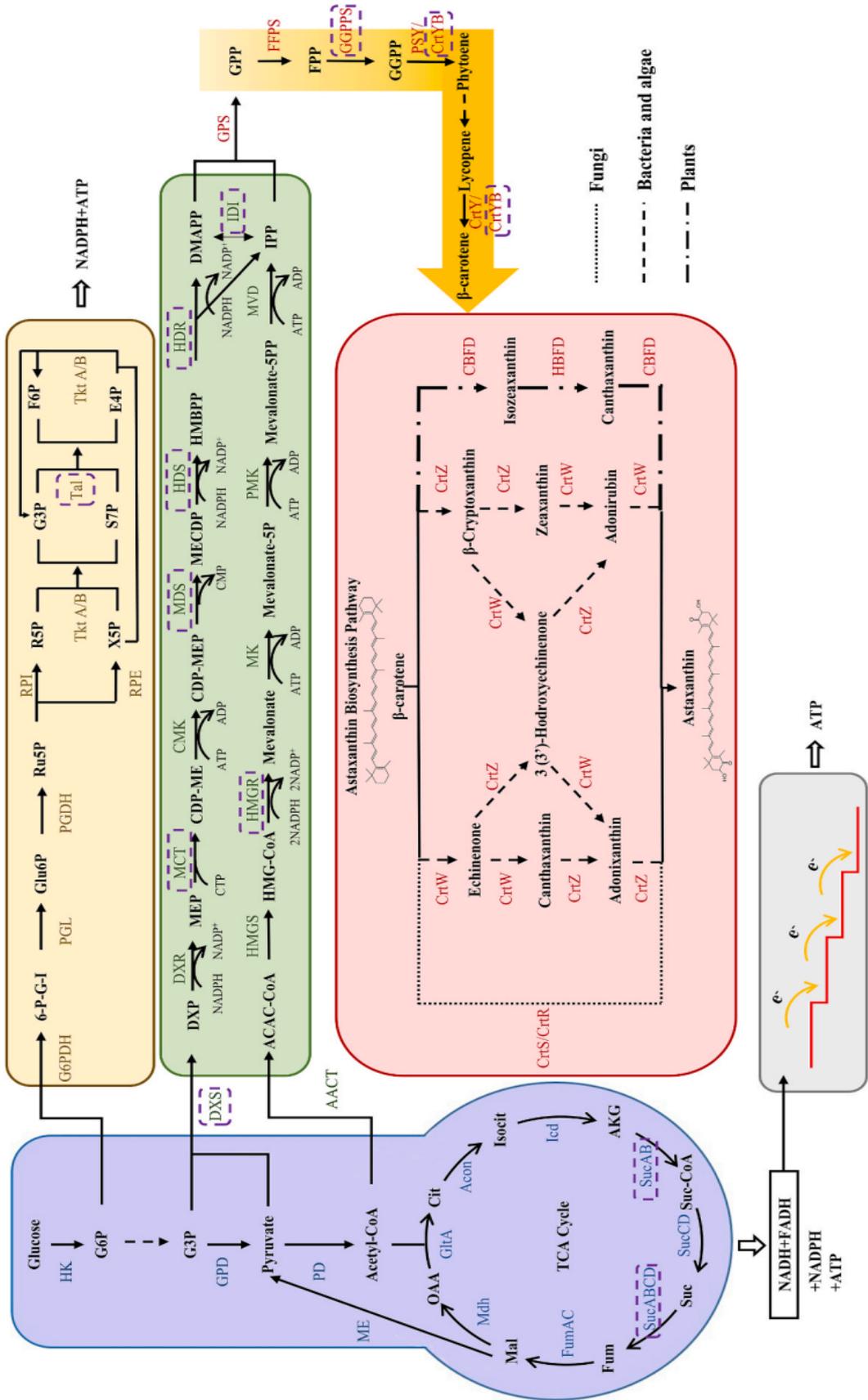


Figura 2. Le vie metaboliche di produzione dell'astaxantina (Basiony et al., 2022)

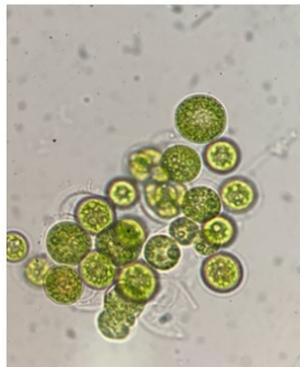
1.3 Produzione della molecola

1.3.1 In vivo

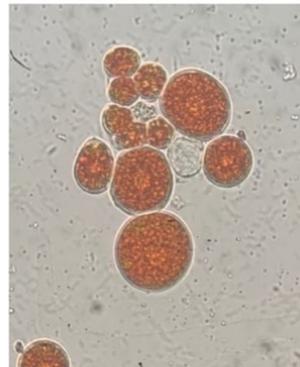
L'astaxantina è un pigmento di colore rosso scuro che si può ritrovare ad esempio in salmoni, fenicotteri e crostacei. La quantità di astaxantina che si ritrova in questi animali è però molto contenuta, in quanto essi assumono la molecola tramite la dieta, non essendo in grado di produrla autonomamente.

In natura, questa molecola viene prodotta da altri organismi, tra cui microalghe come *Haematococcus pluvialis* Flot. e *Chlorella zofingiensis* Donz, alcuni funghi (*Phaffia rhodozyma* M.W. Mill., Yoney. & Soneda) e batteri come *Paracoccus* spp. Davis e *Brevundimonas* spp. Segers et al. Inoltre, può anche essere prodotta in quantità inferiori da angiosperme, tra cui *Adonis aestivalis* L. e *Adonis annua* L. e da alcuni protisti, come *Aurantiochytrium* sp. (Zhang et al., 2020) (Fig. 3). Tuttavia, il 50% della vendita di astaxantina naturale nell'industria nutraceutica è dovuta all'alga *H. pluvialis*, la quale, tra questi, risulta esserne il maggior produttore. Infatti, se coltivata nelle condizioni adatte, *H. pluvialis* può produrre questa molecola in quantità molto abbondanti, fino al 4% del suo peso secco (Basiony et al., 2022).

1



Haematococcus pluvialis
stadio verde

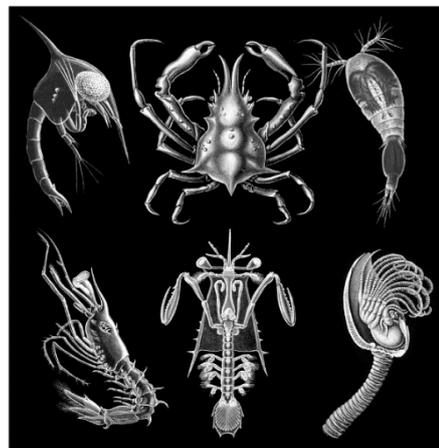


Haematococcus pluvialis
stadio rosso

2



3



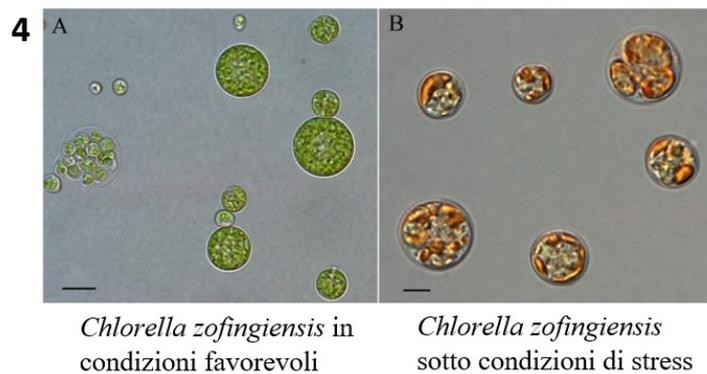


Figura 3. *Haematococcus pluvialis* (Mularczyk et al., 2020) (1), *Adonis aestivalis* (Stachowiak e Szulc, 2021) (2), alcuni crostacei (VanHook e Patel, 2008) (3), *Chlorella zofingiensis* (Liu et al., 2014) (4).

La produzione di astaxantina è un processo altamente automatizzato. Dapprima si fa crescere l'alga in condizioni favorevoli di temperatura, pH e illuminazione, fornendole tutti i nutrienti per favorire la formazione di più biomassa possibile. Una volta che la quantità di biomassa sarà adeguata verranno indotte delle condizioni di stress che stimoleranno la produzione di astaxantina da parte dell'alga (Kumar et al., 2021).

Le condizioni di stress che porteranno alla produzione di astaxantina sono molteplici. Ad esempio, in presenza di luce molto forte, si provocherà la formazione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS), portando l'alga a produrre questo carotenoide, che con il suo potere antiossidante può proteggere l'alga dallo stress ossidativo. Anche la lunghezza d'onda della luce influirà sulla produzione di astaxantina, in particolare la luce rossa indurrà una produzione maggiore di biomassa, la luce blu porterà ad una maggiore produzione di astaxantina (Basiony et al., 2022).

Le industrie usano due principali metodi per la produzione di astaxantina. Il primo è del tutto automatizzato e prevede la formazione di questa molecola in un processo a singolo stadio. Inizialmente la microalga è fatta crescere in un ambiente controllato e favorevole. Una volta raggiunta la biomassa necessaria, i nutrienti inizialmente messi a disposizione cominceranno a scarseggiare, portando ad un cambiamento di pH che creerà le condizioni avverse necessarie alla produzione di astaxantina che avverrà all'interno di cisti di resistenza (Kumar et al., 2021) (Fig. 4). Il ciclo vitale dell'alga presenta due fasi vitali, una vegetativa mobile (Fig. 4a) e una immobile (aplanospore) (Fig. 4b-c). In presenza di condizioni sfavorevoli, l'alga produce aplanospore (tramite riproduzione asessuata) che una volta mature diventeranno cisti di resistenza. A maturazione, stadio in cui viene prodotta astaxantina, la cisti di resistenza presenta una parete cellulare molto rigida (Fig. 4d). Il metabolita secondario può essere accumulato anche nelle zoospore (Fig. 4e). (Bauer e Minceva, 2021).

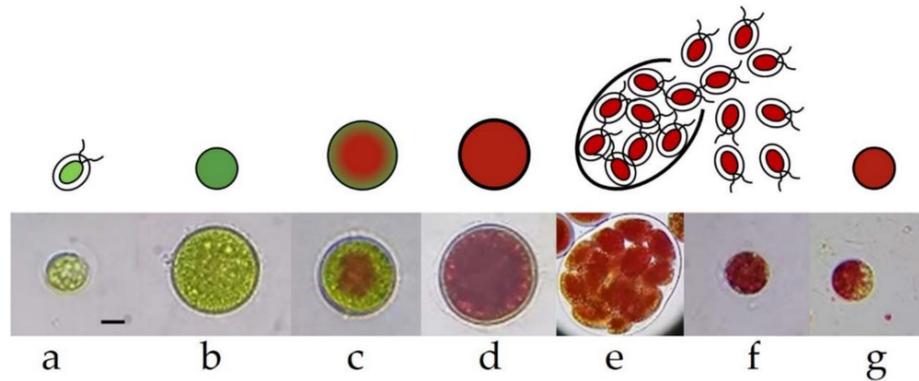


Figura 4. Ciclo di *H. pluvialis*, stadio verde e stadio rosso con cisti di resistenza (d) (Bauer e Minceva, 2021)

Il metodo a due passaggi prevede invece l'utilizzo dello stadio rosso e verde che formano il ciclo vitale di *H. pluvialis*.

Nello stadio verde la microalga produrrà nuova biomassa, in quello rosso andrà a produrre astaxantina (Kumar et al., 2021).

1.3.2 In vitro

L'astaxantina non viene prodotta solo naturalmente, ma può anche essere sintetizzata in laboratorio. Questo metodo di sintesi risulta essere più economico rispetto a quello di coltivazione di *H. pluvialis* e senza massicce emissioni di gas serra. La produzione in vitro di astaxantina è destinata esclusivamente alla nutrizione animale; infatti, la miscela che si viene a creare dalla biosintesi di questo carotenoide contiene vari stereoisomeri, alcuni non presenti in natura e quindi aventi possibili effetti negativi sulla salute umana.

In particolare, l'astaxantina naturale si trova nella forma *trans* (3*S*,3'*S*), mentre dalla produzione di astaxantina sintetica vengono a formarsi tre stereoisomeri diversi (Fig. 1), con una proporzione di 1:2:1 (3*R*, 3'*R*), (3*R*, 3'*S*), (3*S*, 3'*S*).

L'astaxantina derivante da *H. pluvialis*, oltre ad essere assimilata in maniera più efficace dai consumatori che ne fanno uso, risulta essere più stabile, presentando una attività antiossidante maggiore (Stachowiak e Szulc, 2021).

1.4 Biodisponibilità

La biodisponibilità dell'astaxantina è dovuta principalmente alla sua struttura. Essendo un carotenoide polare, avrà una biodisponibilità maggiore rispetto ad un qualsiasi altro carotenoide non polare.

L'astaxantina viene assorbita nell'uomo a livello di intestino tenue, dove viene idrolizzata. Questo carotenoide inoltre viene assorbito maggiormente se assunto insieme ad una dieta ad alto contenuto di colesterolo o contenente vari olii, tra cui ad esempio l'olio di pesce. Dapprima avviene la formazione di micelle nel tessuto intestinale. Il composto astaxantina-acidi biliari che viene a formarsi è quindi assorbito solo parzialmente da cellule della mucosa che provvederanno a inserire l'astaxantina sui chilomicroni per portarla nel liquido linfatico. Infine, il

complesso di astaxantina sarà digerito dall'enzima lipoproteina lipasi e, trasformato in lipoproteina, verrà trasportato nei vari tessuti (Kumar et al., 2021).

1.5 Il duplice uso dell'astaxantina

1.5.1 Nutrizione umana

L'astaxantina viene usata nella nutrizione umana come integratore. (EFSA NDA Panel, Turk et al., 2019).

Ad oggi, ne è stata approvata la consumazione solo se derivante dal suo produttore naturale, *H. pluvialis* (Basiony et al., 2022). Il consumo di astaxantina sintetica da parte dell'uomo non è permesso (regolamento EU No. 1925/2006), in quanto durante la sua produzione vengono a generarsi stereoisomeri diversi da quello naturale (prodotto da *H. pluvialis*) che, se assunti, potrebbero avere effetti negativi sulla salute umana e sull'ambiente. L'astaxantina sintetica viene comunque assunta indirettamente anche dall'uomo, che si nutre di pesci come i salmoni, i quali, negli allevamenti, vengono nutriti con astaxantina sintetica (Stachowiak e Szulc, 2021) per conferire il tipico colore rosso alle loro carni.

1.5.2 Nutrizione delle specie marine

Questo carotenoide dal colore rosso è molto usato negli acquari, come additivo per mangimi di pesci ornamentali, salmoni e anche crostacei.

Per la nutrizione delle specie marine, al contrario di quella umana, è stato approvato, dalla Food and Drug Administration nel maggio 1995, anche l'utilizzo di astaxantina sintetizzata in vitro. La dose non può però superare i 100 mg/kg di razione con un'umidità del 12% (Stachowiak e Szulc, 2021).

2. Azione dell'astaxantina

2.1 Modalità di azione nelle membrane biologiche

Il carotenoide astaxantina si può inserire efficacemente all'interno delle membrane biologiche grazie alla peculiare conformazione del suo scheletro carbonioso (Fig. 5). Lo scheletro centrale, non polare e quindi idrofobico, si può infatti inserire tra le code apolari dei fosfolipidi di membrana, mentre i due gruppi funzionali polari (idrofilici) alle due estremità della molecola si inseriscono tra le teste polari. Questo inserimento all'interno del doppio strato fosfolipidico, porta l'astaxantina ad avere un'altissima attività antiossidante, molto maggiore rispetto a tutti gli altri carotenoidi. In particolare, risulta essere un antiossidante 10 volte più potente rispetto al β -carotene e 100 volte più potente rispetto alla vitamina E (Stachowiak e Szulc, 2021).

L'astaxantina può inibire la perossidazione lipidica in quanto è in grado di intrappolare i radicali liberi dell'ossigeno da entrambi i lati della membrana, grazie alla sua disposizione ordinata tra i fosfolipidi (Landon et al., 2020). Inoltre, questo inserimento stabile nella membrana permette ai ROS di continuare a svolgere la loro funzione di segnali utili per la cellula (Snell e Carberry, 2022).

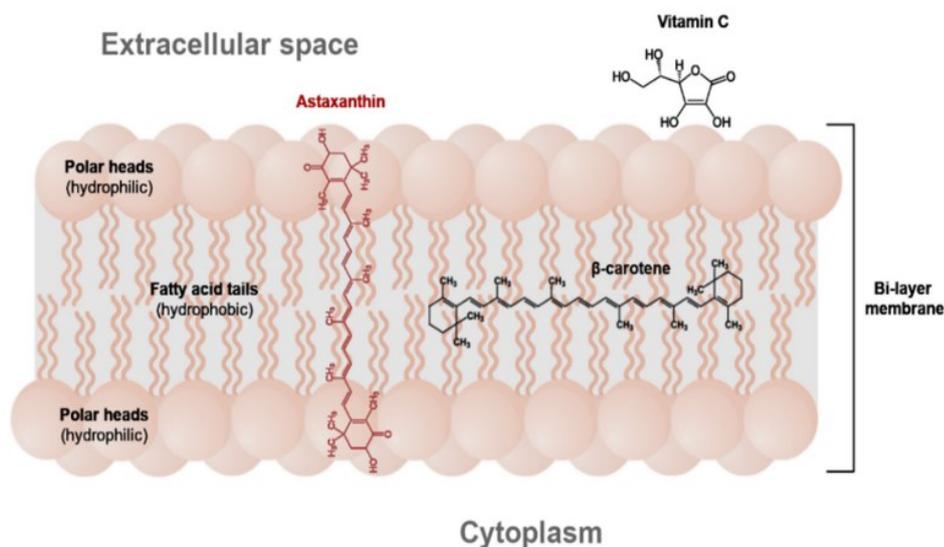


Figura 5. La disposizione dell'astaxantina e di altri antiossidanti all'interno delle membrane biologiche. (Stachowiak e Szulc, 2021)

2.2 Stereoisomeri efficaci e inefficaci per la salute umana

L'astaxantina può presentarsi sotto forma di diversi stereoisomeri, non tutti ugualmente efficaci nell'inserimento all'interno delle membrane biologiche. L'astaxantina naturale, derivata dal suo produttore primario, *H. pluvialis*, si presenta in forma esterificata e chirale, come stereoisomero 3S,3'S.

La produzione sintetica invece può dare luogo a tre diversi stereoisomeri, in particolare 3S,3'S (chirale), 3R,3'S (meso), 3R,3'R (chirale) rispettivamente in proporzione 1:2:1 (Fig. 1). Tra questi, lo stereoisomero più efficace è 3S,3'S, esterificato e chirale, derivato naturalmente dall'alga *H. pluvialis*.

La bioattività, e il conseguente possibile utilizzo dello stereoisomero 3S,3'S, sono legati alla conformazione spaziale che esso assume. Gli angoli che si formano in C-3, C-3' permettono infatti a questo stereoisomero chirale di inserirsi correttamente tra i fosfolipidi di membrana portando ad una localizzazione stabile con la possibilità per l'astaxantina di svolgere la sua attività antiossidante contro i ROS.

Gli stereoisomeri 3S,3'R e 3R,3'R, formati sinteticamente, presentano invece angoli che non permettono un corretto inserimento all'interno del doppio strato fosfolipidico, con conseguente mancato ancoraggio dell'astaxantina alla membrana, portando la molecola a fluttuare, senza la possibilità di svolgere l'attività antiossidante (Snell e Carberry, 2022).

3. Modelli sperimentali *in vivo* e *in vitro*

Per dimostrare il potenziale effetto benefico dell'astaxantina su soggetti diabetici con relative complicanze, sono stati usati come modelli sperimentali diverse

tipologie di ratti e topi, i quali presentano una fisiologia simile a quella umana in quanto mammiferi (Kleinert et al., 2018).

Tra i vari modelli, si ritrovano i topi db/db (diabete severo) i quali mostrano una mutazione spontanea nel gene *Lepr*, che comporta una mancata formazione del recettore per l'ormone leptina, portando questi topi ad avere una ridotta spesa energetica con aumento dell'appetito. Inoltre, dopo i primi 3 mesi di vita risultano avere una decrescita dei livelli di insulina con minore efficienza delle cellule β del pancreas (Kleinert et al., 2018). Livelli ematici di glucosio costanti porteranno dunque alla morte precoce.

Accanto a questi, si ritrovano i topi ob/ob (obesità severa) i quali manifestano una obesità precoce dovuta ad un aumento dell'appetito seguito da una limitata spesa energetica. Anche in questo caso manca l'effetto della leptina. Questi topi sono infatti soggetti ad una spontanea mutazione sul gene *Lep*, che non può codificare per l'ormone. Presentano inoltre elevati livelli di insulina, con resistenza a questo ormone. (Kleinert et al., 2018).

Altro modello sono i Zucker fatty rats (ZFR), ratti che presentano una mutazione missenso a livello del gene *Lepr*, con il conseguente blocco del recettore per l'ormone leptina all'interno della cellula con conseguente mancata trasduzione del segnale. Questi ratti non tendono a sviluppare il diabete mellito (Kleinert et al., 2018).

I topi HFD sono modelli in cui è stato indotto il diabete tramite una dieta ricca in grassi e molto calorica (Kleinert et al., 2018).

Nei ratti diabetici STZ-induced il diabete, causato da alti livelli ematici di glucosio, è indotto chimicamente, iniettando STZ (streptozotocina). STZ è un composto che elimina le cellule beta del pancreas con conseguente diminuzione di insulina, e relativo aumento di glucosio nel sangue (Pandey e Dvorakova, 2020).

Un altro modello usato sono i ratti Sprague-Dawley nutriti con una dieta ad alto contenuto di grassi.

Come modelli in vitro, invece, sono state usate una coltivazione di cellule epiteliali pigmentate della retina umana e cellule mesangiali glomerulari del rene.

4. Studi e risultati sull'efficacia dell'astaxantina contro il diabete

4.1 L'uso di astaxantina contro il diabete di tipo 1 e 2

Il diabete è una malattia che si può presentare in due forme, il diabete mellito di tipo 1 e di tipo 2. In entrambi i casi, queste forme di diabete si manifestano con alti livelli di glucosio nel sangue.

Il diabete di tipo 1 è dovuto ad una disfunzione autoimmune, in cui cellule del sistema immunitario dell'ospite (ad esempio macrofagi o linfociti T) rilasciano citochine e chemochine che producono segnali pro-apoptotici nelle isole pancreatiche dove si trovano le cellule β del pancreas che muoiono per apoptosi. Contemporaneamente, le cellule β morenti, richiamano ulteriormente macrofagi aumentando così l'infiammazione. Le cellule β del pancreas che vanno incontro ad apoptosi, morendo, perdono del tutto la loro funzione di secrezione

dell'insulina, l'ormone che permette di abbassare i livelli di glucosio nel sangue. Con la perdita della loro funzione, i livelli di glucosio troppo elevati potranno diminuire solo con una terapia di assunzione di insulina esogena. Ad oggi questa malattia non è curabile né prevenibile.

Il diabete di tipo 2 è invece associato a molte comorbidità. In questo caso gli alti livelli di glucosio sono dovuti ad una perdita parziale della capacità delle cellule β del pancreas di produrre insulina, che quindi risulterà insufficiente per abbassare il glucosio nel sangue a livelli fisiologici. Inoltre, è spesso accompagnato da resistenza all'insulina. In questo caso non si tratta di una malattia autoimmune, bensì questa patologia insorge adottando stili di vita non salutari, come ad esempio una vita sedentaria o l'obesità (Eizirik et al., 2020).

Sono stati effettuati vari studi volti a verificare se un antiossidante potente come l'astaxantina, se aggiunto alla dieta, potesse avere effetti positivi nel curare malattie come il diabete, caratterizzate da un alto livello di stress ossidativo (Tab.1).

In generale, si può vedere che l'astaxantina ha permesso di abbassare i livelli di glucosio nel sangue aumentandone anche il metabolismo, sia in soggetti umani che animali. Inoltre, viene diminuita anche la pressione sanguigna. Nei topi diabetici, la giusta quantità di astaxantina porta alla protezione delle cellule β del pancreas, che quindi conserveranno la loro attività permettendo la continua secrezione di insulina.

Accanto a questo, la somministrazione del carotenoide ha permesso anche di diminuire la resistenza a questo ormone nel fegato e, in altri modelli, di aumentarne la sensibilità, permettendo così un'azione amplificata (Landon et al., 2020). Si può intuire quindi il fondamentale ruolo del metabolita secondario nel controllo dei livelli di glucosio nel sangue.

Nel muscolo scheletrico, poi, l'astaxantina ha permesso l'attivazione di AMPK (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase) e una maggior biogenesi mitocondriale (Landon et al., 2020). AMPK, ovvero una chinasi attivata con la fosforilazione di AMPK α Thr172 (treonina 172) (Rhen e Shen, 2019), è un complesso proteico formato da tre subunità (α, β, γ) (Carling, 2017). La fosforilazione, con conseguente attivazione, è dovuta alla chinasi B1 del fegato (LKB1) in condizioni di stress energetico, quando si ha una riduzione dei livelli di ATP. In questo caso, l'attivazione di questa chinasi permette di limitare il consumo di ATP (tramite la sintesi di glicogeno) favorendo invece processi catabolici come l'utilizzo di glucosio e lipidi e la biogenesi mitocondriale (Rhen e Shen, 2017). L'astaxantina quindi, attivando AMPK, permette il consumo di glucosio in eccesso, perché questo verrà demolito una volta attivati i sistemi catabolici.

Il carotenoide presenterebbe anche un controllo sui livelli di lipidi oltre che di glucosio, nel fegato si è infatti notato un miglioramento della steatosi epatica (Landon et al., 2020), una patologia consistente nell'acquisizione massiccia di lipidi nel fegato associata anche alla resistenza all'insulina. Risulta essere una delle maggiori cause di trapianto di fegato negli USA (Ipsen et al. 2018). Sempre riguardo i lipidi, l'astaxantina ha portato ad una minore produzione di fattori di trascrizione ed enzimi con attività lipogenica e, aumentando l'attività PPAR α

(peroxisome proliferator-activated receptors alpha), ha permesso di diminuire la quantità di acidi grassi presenti, con conseguente miglioramento della malattia precedentemente vista (Landon et al., 2020).

L'astaxantina sembrerebbe poi provocare l'abbassamento dello stress ossidativo, deleterio per le cellule, aumentando la produzione di enzimi antiossidanti nel siero come la SOD (superossido dismutasi) o la GPx (glutazione perossidasi), dei quali viene anche aumentata l'espressione di mRNA. Di conseguenza saranno anche abbassati i livelli di MDA (malondialdeide) (Landon et al., 2020), un marker per lo stress ossidativo (Tsikas, 2016). Il metabolita secondario risulta quindi essere un ottimo antiossidante, infatti, aumentando l'attività di enzimi che neutralizzeranno i ROS, permetterà l'abbassamento dei livelli di stress ossidativo (indicato da MDA). Importante è anche l'effetto di accrescimento delle adiponectine (Landon et al., 2020), peptidi secreti dagli adipociti che, somministrati in umani e roditori, hanno dimostrato avere effetti antinfiammatori e di sensibilizzazione all'insulina (Achari e Jain, 2017).

Ci sono stati però anche alcuni studi che non sono riusciti a dimostrare l'effetto di abbassamento del glucosio dell'astaxantina, o in cui venivano riscontrati gli effetti dell'astaxantina solo usando dosi molto alte di questa, sui ratti ZFR.

In conclusione, si può affermare che vari studi hanno riportato risultati positivi, alcuni invece non hanno sortito effetto. Questo significa che saranno necessari ulteriori approfondimenti e ricerche per trovare le giuste quantità di astaxantina da somministrare ai soggetti malati per avere effetti positivi contro questa malattia (Landon et al., 2020).

Tabella 1. (Risultati riportati da Landon et al., 2020)

Modelli	Somministrazione di astaxantina	Risultati
Diabete di tipo 2 nell'uomo	8 mg/giorno per 8 settimane	Abbassamento dei livelli di fruttosammine e glucosio nel plasma sanguigno Innalzamento del metabolismo del glucosio Riduzione della pressione sanguigna
Topi diabetici db/db		Riduzione dei livelli di glucosio nel sangue a digiuno
Topi diabetici db/db	35 mg/kg per 12 settimane	Aumento dell'attività della SOD nel siero Abbassamento dei livelli di malondialdeide (MDA)
Topi diabetici db/db	1 mg/giorno per 18 settimane	Protezione e conservazione dell'attività delle cellule β del pancreas
Topi nutriti con dieta ad alto contenuto di grassi e fruttosio	6 mg/kg al giorno per 45 giorni	Abbassamento dei livelli di glucosio e insulina Aumento della sensibilità per l'insulina

Topi nutriti con una dieta ad alto contenuto di grassi		Aumento del metabolismo del glucosio grazie al maggior afflusso di glucosio nel muscolo scheletrico Regolazione dell'attivazione di AMPK nel muscolo (con miglioramento della resistenza all'insulina e intolleranza al glucosio) Maggior biogenesi mitocondriale nel muscolo
Ratti STZ	50 mg/kg di peso corporeo al giorno per 18 giorni	Riduzione di AGEs, ROS e perossidazione lipidica nel fegato
Topi ob/ob e topi obesi nutriti con una dieta ad alto contenuto di grassi	10 settimane	Miglioramento della steatosi epatica Diminuzione della resistenza all'insulina nel fegato
Ratti Sprague-Dawley nutriti con una dieta ad alto contenuto di grassi	Diluita in olio di semi di lino	Accrescimento dell'attività di PPAR α Minore produzione di fattori di trascrizione ed enzimi con attività lipogenica
Topi nutriti con dieta ad alto contenuto di saccarosio e grassi	Mescolata con squalene (triterpene precursore del colesterolo)	Abbassamento dei livelli di glucosio Aumento dell'espressione del mRNA di Sod1 e GPx Aumento adiponectine

4.2 *L'astaxantina e il suo ruolo benefico contro le complicanze del diabete*

L'infiammazione, dovuta ad alti livelli di ROS, causati a loro volta da iperglicemia, ha un ruolo molto importante nello sviluppo del diabete, sia di tipo 1 che di tipo 2, quest'ultimo in particolare, in quanto caratterizzato da bassi livelli di infiammazione costanti. Varie citochine, come IL-1 β (interleuchina-1 beta), attivando cellule del sistema immunitario, provocano la distruzione delle cellule β del pancreas, bloccando quindi la secrezione di insulina (Landon et al., 2020). Importante nella risposta infiammatoria, è il fattore di trascrizione dimerico NF-kB (nuclear factor kappa B), regolato secondo due vie, la non canonica e la canonica. Nei mammiferi NF-kB è formato da 5 famiglie di proteine diverse (monomeri), tra cui p65. Questi monomeri possono legarsi al DNA, formando tra loro omodimeri o eterodimeri. Nella via di segnalazione canonica è importante la chinasi I κ B (inhibitor of nuclear factor kappa B) (Mitchell et al., 2016) (Fig. 6).

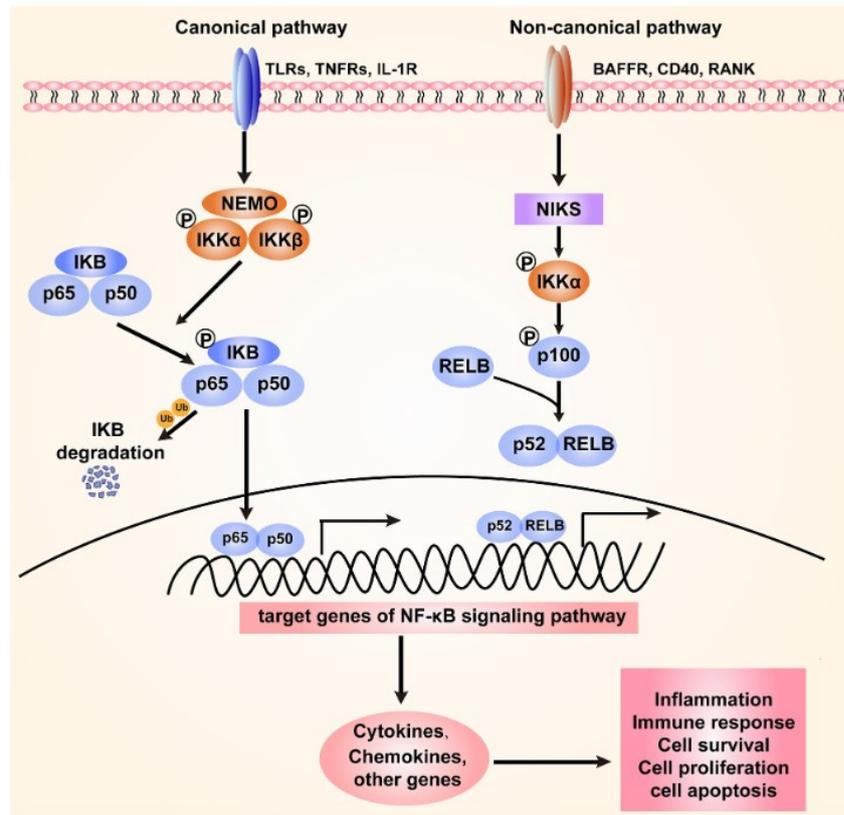


Figura 6. NF-κB pathway (Peng et al., 2020)

Le complicanze del diabete sono tutte riconducibili a danni provocati da stress ossidativo indotto dall'iperglicemia. Tra queste si trovano i danni cardiovascolari, in particolare nel diabete di tipo 2, in quanto, livelli elevati e costanti di glucosio nel sangue, con l'accrescimento della quantità di AGEs (advanced glycation end-products) provocano l'insorgenza dell'arteriosclerosi (Landon et al., 2020). Gli AGEs, prodotti dalle reazioni del glucosio (che non prevedono l'utilizzo di enzimi) oppure reazioni di altri saccaridi, sono molecole molto eterogenee che possono provocare danni a livello di proteine o lipidi nelle cellule. Possono attivare fattori di trascrizione che portano alla formazione di mediatori infiammatori come le citochine. L'infiammazione sarà il risultato finale (Perrone et al., 2020). A causa dell'alto stress ossidativo, inoltre, gli enzimi antiossidanti fisiologici non riescono a regolare gli elevati livelli di ROS, dovuti all'eccessiva attivazione dell'enzima NOX (NADPH ossidasi) portando a trombosi e aggregazione di piastrine (Landon et al., 2020). Sempre a causa dello stress ossidativo, si viene a creare la retinopatia diabetica derivante da un danno microvascolare e disfunzioni della retina (Landon et al., 2020). Nella nefropatia diabetica, che comprende lesioni ai tubuli e ai glomeruli del rene, gli elevati livelli di ROS causano un reclutamento massiccio di cellule infiammatorie a livello renale, oltre ad una espressione eccessiva del fattore di trascrizione NF-κB. Inoltre, danno origine a fibrosi renale a causa della deposizione troppo elevata di matrice extracellulare. (Landon et al., 2020).

Altra complicanza è la neuropatia diabetica che colpisce il sistema nervoso periferico (in particolare assoni sensoriali e autonomi per poi colpire in maniera minore anche gli assoni motori) provocando dolore e aumento del rischio di cadute (Feldman et al., 2019). Lo squilibrio tra i livelli di ossidanti e antiossidanti è ancora una volta ritenuto alla base del collegamento tra gli elevati livelli di glucosio nel sangue e neuropatia diabetica e insorgenza di deficit cognitivi a livello dell'ippocampo (Landon et al., 2020). L'ippocampo è fondamentale per la memoria episodica e permette la rappresentazione spaziale dell'ambiente circostante (Lisman et al., 2017).

4.2.1 Effetto antinfiammatorio

In vari esperimenti (Tab. 2) è stato notato il ruolo antinfiammatorio dell'astaxantina, che permette di regolare l'infiammazione tramite un reclutamento minore di monociti e citochine. Questo metabolita secondario, inoltre, impedisce la fosforilazione della chinasi I κ B con conseguente blocco della subunità p65 di NF- κ B che rimane nel citosol e non trasloca nel nucleo (Landon et al., 2020). Impedire la traslocazione nel nucleo, tramite l'azione di astaxantina, è fondamentale, perché NF- κ B può portare ad infiammazione, essendo un fattore di trascrizione che controlla diversi fattori pro-infiammatori (Mitchell e Carmody, 2018).

Tabella 2. (Risultati riportati da Landon et al., 2020)

Modelli	Somministrazione di astaxantina	Risultati
Dieta ad alto contenuto grassi e fruttosio	2 mg/kg/giorno	Impedita la fosforilazione della chinasi I κ B
Ratti STZ	Livelli nella dieta compresi tra lo 0.01% e lo 0.05%	Riduzione di citochine pro-infiammatorie (IL-6 e TNF- α) e macrofagi nel plasma e nel rene
		Reclutamento minore dei monociti

4.2.2 Protezione cardiovascolare

L'astaxantina ha mostrato un potenziale effetto curativo contro i problemi cardiovascolari che possono insorgere a causa del diabete (Tab. 3). Questo carotenoide ha permesso infatti di abbassare i livelli di stress ossidativo (causato da un'azione troppo elevata di eNOS (ossido nitrico sintasi endoteliale)), e quindi la conseguente infiammazione, ripristinando l'azione fisiologica dell'enzima eNOS, proteggendo gli affetti da diabete da trombosi ed eventuale vasocostrizione (Landon et al., 2020). L'enzima eNOS, partendo dall'arginina, porta alla

produzione di NO (ossido nitrico), un fattore di rilassamento che permette la dilatazione dei vasi sanguigni bloccando anche l'adesione con conseguente aggregazione delle piastrine (Hong et al., 2019). L'astaxantina permette quindi, tramite la produzione di NO, il ripristino della vasodilatazione fisiologica, evitando le trombosi. Ha portato inoltre alla riduzione dei livelli di oxLDL (lipoproteine a bassa densità ossidate) e dei loro recettori sulle cellule endoteliali (LOX-1) (Landon et al., 2020).

Inoltre, il carotenoide può portare alla riduzione di citochine infiammatorie e problemi emostatici, senza provocare danni a livello renale (Landon et al., 2020).

Tabella 3. (Risultati riportati da Landon et al., 2020)

Modelli	Somministrazione di astaxantina	Risultati
Cellule endoteliali di ratti diabetici STZ	10 mg/kg per 42 giorni consecutivi	Ripristino dell'espressione di eNOS Riduzione dei livelli di oxLDL e di LOX-1
Malati di diabete di tipo 2	12 mg	Riduzione di citochine infiammatorie Riduzione problemi emostatici No danni a livelli renale

4.2.3 Retinopatia diabetica

L'utilizzo di astaxantina, nei soggetti affetti da retinopatia diabetica, ha permesso l'abbassamento dello stress ossidativo con conseguente diminuzione di AGEs (che possono portare infiammazione inducendo i fattori di trascrizione a produrre mediatori infiammatori (Perrone et al., 2020)), ROS e la conseguente perossidazione lipidica (Landon et al., 2020) che può provocare una riduzione nella fluidità dei lipidi di membrana, quindi in generale un'alterazione delle proprietà fisiche (Gaschler e Stockwell, 2017). Inoltre, risulta anche ridotta l'espressione sottoforma di mRNA del fattore di trascrizione VEGF (fattore di crescita vascolare endoteliale) (Landon et al., 2020). VEGF è un fattore di crescita vascolare che può fungere da mediatore infiammatorio (Rodríguez et al., 2019). L'astaxantina ha portato poi ad un abbassamento dei mediatori infiammatori, e questo si pensa sia dovuto alla regolazione negativa sul fattore di trascrizione NF-kB. (Landon et al., 2020). (Tab. 4).

Tabella 4. (Risultati riportati da Landon et al., 2020)

Modelli	Somministrazione di astaxantina	Risultati
----------------	--------------------------------------------	------------------

Colture di cellule epiteliali pigmentate della retina umana	Esperimento <i>in vitro</i>	Riduzione di AGEs, ROS e perossidazione lipidica Riduzione dell'espressione del mRNA di VEGF
Ratti STZ	Somministrazione orale	Abbassamento di mediatori infiammatori tramite l'azione sul fattore di trascrizione NF-kB Innalzamento dei livelli di antiossidanti Abbassamento di mediatori di stress ossidativo

4.2.4 Nefropatia diabetica

L'astaxantina gioca un ruolo importante anche nella cura della nefropatia diabetica (Tab. 5). Nei ratti diabetici, è stato riscontrato un miglioramento dell'ipertrofia glomerulare, livelli inferiori di urea e il ripristino dei livelli normali di creatinina e acido urico. Nei topi db/db sono stati ridotti i livelli di albumina nelle urine con diminuzione dei markers per lo stress ossidativo (Landon et al., 2020).

Studiando le cellule mesangiali umane, si è notato inoltre che l'astaxantina tende ad accumularsi nei mitocondri di queste, dove potrebbe avere effetti positivi, in primo luogo andando ad abbassare i livelli di ROS e in secondo luogo portando alla produzione di fattori come TGF- β 1 (fattore di crescita trasformante β 1) tramite l'attivazione dei giusti fattori di trascrizione (Landon et al., 2020). TGF- β (fattore di crescita trasformante β) rappresenta una famiglia di fattori polipeptidici importanti nell'adulto per l'omeostasi dei tessuti (Tzavlaki e Moustakas, 2020). TGF- β 1, una isoforma del fattore di trascrizione TGF- β , quando espresso in modo eccessivo causa fibrosi renale (Meng et al., 2016). L'astaxantina potrebbe avere effetto regolatorio positivo sullo sviluppo della fibrosi renale dovuta al diabete grazie alla modulazione della produzione di TGF- β 1 e della fibronectina, limitando quindi l'accumulo eccessivo di componenti della matrice.

Nelle cellule mesangiali glomerulari coltivate in vitro e nei topi db/db, il carotenoide ha portato alla traslocazione nucleare di Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), accrescendo la quantità di eme ossigenasi-1 e di superossido dismutasi. (Landon et al., 2020) (Tab. 5).

Tabella 5. (Risultati riportati da Landon et al., 2020)

Modelli	Somministrazione di astaxantina	Risultati
Topi db/db	12 settimane	Riduzione dei livelli di albumina nelle urine Riduzione di marker dello stress ossidativo

Ratti diabetici	20 mg/kg al giorno	Miglioramento ipertrofia glomerulare Riduzione dei livelli di urea Ripristino dei livelli normali di creatinina e acido urico Potenziamento di SOD e catalasi
Cellule mesangiali umane		Abbassamento della produzione di ROS nei mitocondri Inibizione della produzione di TGF- β 1
Cellule mesangiali glomerulari trattate con alti livelli di glucosio <i>in vitro</i> e topi db/db		Traslocazione nucleare di Nrf2 con accrescimento della quantità di eme-ossigenasi-1 e superossido dismutasi

4.2.5 Neuropatia diabetica

Anche nel caso della neuropatia diabetica è stato possibile verificare l'effetto positivo dell'astaxantina (Tab.6). Questo antiossidante naturale infatti, ha permesso, tra gli altri effetti, di abbassare i livelli di infiammazione e di limitare anche l'apoptosi, riducendo l'attività di caspasi 3 e 9 mediante l'attivazione della via di segnalazione PI3K-Akt (rispettivamente fosfoinositide 3-chinasi e protein chinasi B). La modulazione dei livelli di infiammazione è dovuta ad una ridotta produzione di mediatori infiammatori come, ad esempio, TNF- α (tumor necrosis factor alpha), riducendo la traslocazione nel nucleo del fattore di trascrizione NF- κ B (subunità p65) a livello di corteccia cerebrale e ippocampo. L'astaxantina ha permesso inoltre un miglioramento a livello cognitivo sui ratti STZ (Landon et al., 2020).

Altro ruolo importante di questo metabolita secondario è l'abbassamento dell'espressione della proteina GFAP (proteina fibrillare acida della glia) nel cervello (Landon et al., 2020). Questa proteina è un filamento intermedio, presente nel citoscheletro degli astociti maturi. Regolata da vari fattori di trascrizione, può portare ad infiammazione neurologica e neurodegenerazione quando viene sovraespressa (Li et al., 2019).

Inoltre, l'astaxantina sarebbe anche in grado di ridurre le interleuchine 6 e 1 β , oltre ad accrescere la concentrazione dell'enzima antiossidante SOD e ridurre la presenza di MDA nell'ippocampo (Landon et al., 2020).

Tabella 6. (Risultati riportati da Landon et al., 2020)

Modelli	Risultati
Ratti STZ	Miglioramento a livello cognitivo Aumento di enzimi antiossidanti Riduzione della produzione di mediatori infiammatori come TNF- α Diminuzione dell'attività di caspasi 3 e 9
Topi STZ	Abbassamento espressione di GFAP nel cervello Regolazione negativa di caspasi 3 e interleuchine 6 e 1 β
Topi diabetici	Aumento concentrazione di SOD Riduzione di MDA nell'ippocampo

5. Modalità di somministrazione

5.1 Dose giornaliera consigliata

Gli adulti possono assumere una quantità di astaxantina (proveniente da *H. pluvialis*) pari a 8 mg al giorno come integratore, senza controindicazioni, anche considerando l'assunzione già presente nella dieta ordinaria degli individui (EFSA NDA Panel, Turk et al., 2019).

5.2 Effetti collaterali nell'uso di astaxantina

Effetti collaterali nell'uso di astaxantina naturale, ad oggi usata come integratore nella dieta, non sono stati descritti nella letteratura scientifica.

6. Criticità osservate e nuove tecniche che potrebbero essere usate

Negli esperimenti presi in esame è stato riportato solamente l'effetto che l'astaxantina ha dimostrato avere su cellule del sistema immunitario innato, permettendo un minore afflusso di macrofagi in un determinato sito, con conseguente ridotta infiammazione. Non è stata considerata però l'inibizione del sistema immunitario specifico, i cui linfociti possono portare (assieme ai macrofagi) a infiammazione e distruzione delle cellule β del pancreas con conseguente sviluppo del diabete di tipo 1 (Eizirik et al., 2020). Forse questo è dovuto al fatto che l'astaxantina non ha mostrato effetti positivi in esperimenti passati qui non citati, o forse la sperimentazione dovrà ancora progredire in questa direzione. Inoltre, negli esperimenti riportati precedentemente, è stato sottolineato il ruolo inibitore di caspasi 3 e 9 pro-apoptotiche dell'astaxantina, invece altre caspasi, come la caspasi 8 pro-apoptotica, non sono state considerate.

Al di là di questo, se l'astaxantina, nel prossimo futuro, confermasse i suoi effetti positivi nella cura di varie malattie, potrebbero essere necessarie nuove tecniche o strategie per rendere questo carotenoide a più alta biodisponibilità e maggiormente disponibile, anche ad un costo minore di quello attuale. Tra le nuove tecniche che potrebbero essere usate, si ritrovano le biotecnologie con l'ingegnerizzazione metabolica e le nanotecnologie.

Le nanotecnologie potrebbero rappresentare un aiuto nell'assorbimento di varie molecole, aumentandone così la biodisponibilità. Queste sono sfruttate nell'ambito della nutrizione umana per creare in laboratorio dei trasportatori di molecole o composti con azione benefica per la salute. Grazie all'uso di questi trasportatori, si potrebbe quindi avere un controllo mirato sul rilascio della molecola di interesse nella cellula, garantendo che questa arrivi nel tessuto o nell'organo specifico dove svolgerà la sua funzione. Inoltre, i trasportatori avrebbero anche un effetto protettivo sul composto di interesse, che sarebbe quindi preservato dalla degradazione e potrebbe inserirsi in maniera più efficace nelle membrane biologiche (Hu et al., 2019). Sapendo che, l'astaxantina viene assorbita maggiormente se associata ad una dieta ad alto contenuto di grassi o olii (Kumar et al., 2021), potrebbero risultare utili le nanoemulsioni, dei trasportatori formati da gocce di olio immerse nell'acqua aventi un diametro inferiore ai 200nm. Le gocce sono rivestite da emulsionante e al loro interno racchiudono la molecola bioattiva.

Un altro trasportatore prevede l'utilizzo di nanoparticelle lipidiche (sempre aventi un diametro inferiore ai 200nm) formanti dispersioni colloidali. I trasportatori, chiamati nanopolisomi, sono formati dall'aggregazione spontanea di fosfolipidi che formano le membrane biologiche. Questi, avendo una struttura anfipatica, tendono a distribuirsi in modo concentrico su uno o più strati, con le code idrofiliche all'esterno e le catene idrofobiche interne. (McClements e Öztürk, 2021). L'astaxantina grazie alla sua peculiare conformazione scheletrica, potrebbe inserirsi in modo stabile tra i fosfolipidi che formano i nanoliposomi e quindi essere protetta e trasportata agli organi che necessitano della sua azione.

Le biotecnologie, invece, potrebbero essere considerate per aumentare la disponibilità di astaxantina, permettendo la produzione di questo carotenoide anche alle piante terrestri. L'uso dell'ingegneria metabolica, infatti, permette di aggiungere enzimi o parti della via metabolica mancante di una certa molecola di interesse, che sarà quindi prodotta in un altro organismo ospite, ingegnerizzato. Un esempio potrebbe essere l'aggiunta di enzimi specifici per la produzione di astaxantina nel pomodoro. Questo frutto, dal caratteristico colore rosso, è un grande produttore di licopene (Imran et al., 2020), presente nella via di biosintesi dell'astaxantina. Aggiungendo i giusti enzimi, come la licopene ciclasi per produrre β -carotene (precursore dell'astaxantina), si potrebbe arrivare alla produzione di astaxantina anche nelle piante di pomodoro. In questo modo, il carotenoide diventerebbe più disponibile e si potrebbe anche aumentarne la produzione.

7. Conclusioni

In conclusione, come visto negli esperimenti riportati, l'astaxantina ha dimostrato effetti positivi nella cura del diabete, abbassando i livelli di infiammazione e di stress ossidativo.

Il problema dell'astaxantina è però la sua disponibilità, si tratta infatti di un metabolita secondario di origine per lo più marina. La sua disponibilità è quindi molto inferiore alla eventuale richiesta, in quanto gli MNPs (Marin Natural Products) sono molto limitati.

Ad oggi, gli studi e le conoscenze sull'astaxantina sono ancora in sviluppo, saranno quindi necessari ulteriori studi e approfondimenti per capire meglio la modalità di azione e la quantità che bisognerebbe assumere per sfruttare le potenzialità di questo metabolita secondario. Anche se eventuali effetti negativi nell'uso di questo carotenoide dovranno essere accertati, se la sperimentazione continuasse portando a risultati positivi, l'astaxantina potrebbe anche essere presa in considerazione, forse, come farmaco.

8. Bibliografia

Achari A.E.; Jain S.K. (2017) Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences* 18.

Basiony M.; Ouyang L.; Wang D.; Yu J.; Zhou L.; Zhu M.; Wang X.; Feng J.; Dai J.; Shen Y.; Zhang C.; Hua Q.; Yang X.; Zhang L. (2022) Optimization of microbial cell factories for astaxanthin production: Biosynthesis and regulations, engineering strategies and fermentation optimization strategies. *Synthetic and Systems Biotechnology* 7: 689–704.

Bauer A.; Minceva M. (2021) Examination of Photo-, Mixo-, and Heterotrophic Cultivation Conditions on *Haematococcus pluvialis* Cyst Cell Germination. *Applied Sciences* 11.

Carling D. (2017) AMPK signalling in health and disease. *Current Opinion in Cell Biology* 45: 31-37.

EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens); Turck D.; Castenmiller J.; de Henauw S.; Hirsch-Ernst KI.; Kearney J.; Maciuk A.; Mangelsdorf I.; McArdle HJ.; Naska A.; Pelaez C.; Pentieva K.; Siani A.; Thies F.; Tsbouri S.; Vinceti M.; Cubadda F.; Engel K.; Frenzel T.; Heinonen M.; Marchelli R.; Neuhauser-Berthold M.; Poulsen M.; Sanz Y.; Schlatter J.R.; van Loveren H.; Ackerl R.; Gelbmann W.; Steinkellner H and Knutsen HK. (2020) Scientific Opinion on the safety of astaxanthin for its use as a novel food in food supplements. *EFSA Journal* 2020;18(2):5993, 9 pp.

Eizirik D.L.; Pasquali L.; Cnop M. (2020) Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. *Nature Reviews Endocrinology* 16: 349-362.

Feldman E.L.; Callaghan B.C.; Pop-Busui R.; Zochodne D.W.; Wright D.E.; Bennett D.L.; Bril V.; Russell J.W.; Viswanathan V. (2019) Diabetic neuropathy. *Nature Reviews Disease Primers* 5.

Gaschler M.M.; Stockwell B.R. (2017) Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 482: 419–425.

Hong F.; Liang X.; Liu W.; Lv S.; He S.; Kuang H.; Yang S. (2019) Roles of eNOS in atherosclerosis treatment. *Inflammation Research* 68: 429–441.

Hu Q.; Li H.; Wang L.; Gu H.; Fan C. (2019) DNA Nanotechnology-Enabled Drug Delivery Systems. *Chemical Reviews* 119: 6459-6506.

Imran M.; Ghorat F.; Ul-Haq I.; Ur-Rehman H.; Aslam F.; Heydari M.; Shariati M.A.; Okuskhanova E.; Yessimbekov Z.; Thiruvengadam M.; Hashem Hashempur M.; Rebezov M. (2020) Lycopene as a Natural Antioxidant Used to Prevent Human Health Disorders. *Antioxidants* 9.

Ipsen D.H.; Lykkesfeldt J.; Tveden-Nyborg P. (2018) Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 75: 3313-3327.

Kleinert M.; Clemmensen C.; Hofmann S.M.; Moore M.C.; Renner S.; Woods S.C.; Huypens P.; Beckers J.; Hrabe de Angelis M.; Schürmann A.; Bakhti M.; Klingenspor M.; Heiman M.; Cherrington A.D.; Ristow M.; Lickert H.; Wolf E.; Havel P.J.; Müller T.D.; Tschöp M.H. (2018) Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology* 14: 140-162.

Kumar S.; Kumar R.; Diksha; Kumari A.; Panwar A. (2021) Astaxanthin: A super antioxidant from microalgae and its therapeutic potential. *Journal of Basic Microbiology* 2021: 1-19.

Landon R.; Gueguen V.; Petite H.; Letourneur D.; Pavon-Djavid G.; Anagnostou F. (2020) Impact of Astaxanthin on Diabetes Pathogenesis and Chronic Complications. *Marine Drugs* 18.

Li D.; Liu X.; Liu T.; Liu H.; Tong L.; Jia S.; Wang Y. (2019) Neurochemical regulation of the expression and function of glial fibrillary acidic protein in astrocytes. *Wiley Periodicals Glia* 68: 878-897.

Lisman J.; Buzsáki G.; Eichenbaum H.; Nadel L.; Ranganath C.; Redish A.D. (2017) Viewpoints: how the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition *Nature Neuroscience* 20: 1434-1448.

- Liu J.; Sun Z.; Gerken H.; Liu Z.; Jiang Y.; Chen F. (2014) *Chlorella zofingiensis* as an Alternative Microalgal Producer of Astaxanthin: Biology and Industrial Potential. *Marine Drugs* 12: 3487-3515.
- McClements D.J.; Öztürk B. (2021) Utilization of Nanotechnology to Improve the Handling, Storage and Biocompatibility of Bioactive Lipids in Food Applications. *Foods* 10.
- Meng X.; Nikolic-Paterson D.J.; Lan H.Y. (2016) TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nature Reviews Nephrology* 12: 325-338.
- Mitchell J.P.; Carmody R.J. (2018) NF- κ B and the Transcriptional Control of Inflammation. *International Review of Cell and Molecular Biology* 335: 41-84.
- Mitchell S.; Vargas J.; Hoffmann A. (2016) Signaling via the NF κ B system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 8(3): 227-241.
- Mularczyk M.; Michalak I.; Marycz K. (2020) Astaxanthin and other Nutrients from *Haematococcus pluvialis*—Multifunctional Applications. *Marine Drugs* 18.
- Pandey S.; Dvorakova M.C. (2020) Future Perspective of Diabetic Animal Models. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders* 20: 25-38.
- Peng C.; Ouyang Y.; Lu N.; Li N. (2020) The NF- κ B Signaling Pathway, the Microbiota, and Gastrointestinal Tumorigenesis: Recent Advances. *Frontiers in Immunology* 11.
- Perrone A.; Giovino A.; Benny J.; Martinelli F. (2020) Advanced Glycation End Products (AGEs): Biochemistry, Signaling, Analytical Methods, and Epigenetic Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020.
- Rascio N.; Carfagna S.; Esposito S.; La Rocca N.; Lo Gullo M.A.; Trifilò P.; Trost P.; Vona V. (2021) *Elementi di Fisiologia Vegetale III Edizione*. EdiSES Edizioni S.r.l., Napoli, pp. 117.
- Ren Y.; Shen H.M. (2019) Critical role of AMPK in redox regulation under glucose starvation. *Redox Biology* 25.
- Rodríguez M.L.; Pérez S.; Mena-Mollá S.; Desco M.C.; Ortega Á.L. (2019) Oxidative Stress and Microvascular Alterations in Diabetic Retinopathy: Future Therapies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Snell T.W.; Carberry J. (2022) Astaxanthin Bioactivity Is Determined by Stereoisomer Composition and Extraction Method. *Nutrients* 14.
- Stachowiak B.; Szulc P. (2021) Astaxanthin for the Food Industry. *Molecules* 26.

Tsikak D. (2017) Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry* 524: 13-30.

Tzavlaki K.; Moustakas A. (2020) TGF- β Signaling. *Biomolecules* 10.

VanHook A.M.; Patel N.H. (2008) Crustaceans. *Current Biology* 18: R547-R550.

Zhang C.; Chen X.; Too H.P. (2020) Microbial astaxanthin biosynthesis: recent achievements, challenges, and commercialization outlook. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104: 5725-5737.