



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in
Biologia Molecolare e Applicata

RUOLO METABOLICO E ANTIOSSIDANTE DEL SULFORAFANO IN UN
MODELLO MURINO DI CARDIOMIOCITI (H9c2)

METABOLIC AND ANTIOXIDANT ROLE OF SULFORAPHANE IN A MURINE
MODEL OF CARDIOMYOCYTES (H9c2)

Tesi di Laurea Magistrale
di: Ilaria Chiaraberta

Relatore:
Chiar.mo Prof. Rosamaria Fiorini

Correlatore:
Dott. Patrick Orlando

Sessione straordinaria (Febbraio 2021)

Anno Accademico 2019/2020

Sommario

1. INTRODUZIONE.....	2
1.1 <i>Lo stress ossidativo</i>	2
1.1.1 <i>I radicali liberi</i>	4
1.1.2 <i>Antiossidanti</i>	8
1.2 <i>Il Sulforafano</i>	15
1.2.1 <i>Fonti alimentari</i>	16
1.2.2 <i>Metabolismo</i>	18
1.2.3 <i>Attività biologiche</i>	21
1.3 <i>Diabete mellito</i>	29
1.2.1 <i>Diabete mellito di tipo 2</i>	31
1.2.2 <i>Complicanze</i>	33
1.2.3 <i>Diabete mellito e stress ossidativo</i>	35
2. SCOPO DELLA TESI.....	47
3. MATERIALI E METODI	48
3.1 <i>Modello cellulare</i>	48
3.2 <i>Saggio MTT</i>	49
3.3 <i>Analisi citofluorimetriche</i>	50
3.3.1 <i>Vitalità cellulare</i>	50
3.3.2 <i>Livelli di specie reattive dell'ossigeno</i>	51
3.3.3 <i>Livelli mitocondriali di anione superossido</i>	53
3.3.4 <i>Depolarizzazione di membrana mitocondriale</i>	55
3.3.5 <i>Uptake di glucosio</i>	57
3.4 <i>Analisi statistica</i>	58
4. RISULTATI	59
4.1 <i>Attività metabolica</i>	59
4.2 <i>Vitalità cellulare</i>	61

<i>4.3 Livelli di specie reattive dell'ossigeno</i>	63
<i>4.4 Livelli mitocondriali di anione superossido</i>	64
<i>4.5 Depolarizzazione della membrana mitocondriale</i>	66
<i>4.6 Uptake di glucosio</i>	67
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	70
6. BIBLIOGRAFIA.....	76

1. INTRODUZIONE

1.1 Lo stress ossidativo

Il termine stress ossidativo indica l'insieme delle alterazioni che si manifestano a livello di tessuti, cellule e macromolecole biologiche quando queste vengono esposte ad un eccesso di agenti ossidanti (1).

In condizioni fisiologiche queste specie chimiche ossidanti vengono continuamente prodotte dalle cellule attraverso numerosi processi biochimici e sono indispensabili per il corretto funzionamento cellulare, regolando i meccanismi propri dell'omeostasi e le risposte ai vari stimoli provenienti dall'interno e dall'esterno dell'organismo (2-3).

In tutti gli organismi aerobi esiste un delicato equilibrio, detto "ossido-riduttivo", tra la produzione di sostanze ossidanti (ad esempio i radicali liberi dell'ossigeno e dell'azoto) e il sistema di difesa antiossidante che ha il compito di prevenire e/o riparare l'eventuale danno creato (**Fig. 1**) (2).



Figura 1 Lo stress ossidativo è uno squilibrio tra antiossidanti e radicali liberi a favore di questi ultimi

Se tale condizione di squilibrio perdura nel tempo, queste specie chimiche altamente reattive possono modificare le proteine, i lipidi e gli acidi nucleici producendo alterazioni strutturali della cellula tali da determinare processi apoptotici (3-4).

Evidenze sperimentali mostrano che i danni provocati dai radicali liberi alle varie componenti cellulari sono coinvolti nel processo di invecchiamento e nello sviluppo di numerose patologie incluse neoplasie, malattie cardiovascolari, patologie associate al diabete e gravi malattie neurodegenerative, come il morbo di Parkinson e il morbo di Alzheimer (5).

1.1.1 I radicali liberi

I radicali liberi sono specie chimiche altamente instabili e reattive in quanto possiedono uno o più elettroni spaiati nell'orbitale più esterno. Essi tendono ad ossidare altre molecole per raggiungere una stabilità elettronica, innescando un meccanismo di propagazione radicalica a catena (6).

Esiste una grande varietà di specie reattive che vengono classificate in base all'atomo instabile elettronicamente, tra cui i più comuni sono i radicali dell'ossigeno, dello zolfo, del carbonio e dell'azoto (7).

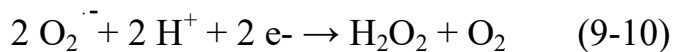
Buona parte dello stress ossidativo di derivazione endogena nasce nella cellula per riduzione incompleta dell'ossigeno molecolare a livello della membrana mitocondriale interna lungo la catena di trasporto. Le cellule per generare energia ossidano enzimaticamente i principi nutritivi (in particolare lipidi e carboidrati) e ciò comporta una riduzione dell'ossigeno ad acqua.

Durante queste reazioni biochimiche si producono degli intermedi radicalici altamente instabili e reattivi indicati come specie reattive dell'ossigeno o ROS (Reactive Oxygen Species) (6-8). Di seguito sono descritte le ROS più studiate.

Radicale superossido $O_2^{\cdot -}$

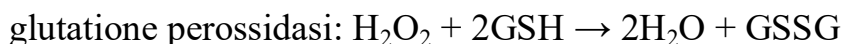
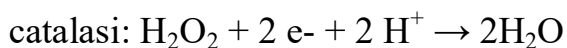
Può essere prodotto dai mitocondri durante la fosforilazione ossidativa oppure da enzimi come xantina ossidasi nel citoplasma delle cellule e la NADPH ossidasi presente nella membrana cellulare dei granulociti polimorfonucleati.

È fortemente reattivo e citotossico poiché attacca un ampio numero di substrati per completare i propri orbitali. Il danno che può causare è però minimizzato dalla compartimentazione biologica, in quanto il radicale superossido non è in grado di attraversare la membrana mitocondriale; inoltre può essere neutralizzato da composti come la vitamina A e dall'enzima superossido dismutasi (SOD) che lo converte a perossido di idrogeno come descritto dalla seguente reazione



Perossido di idrogeno H_2O_2

Dalla reazione di dismutazione si forma perossido di idrogeno che normalmente non è tossico perché viene rapidamente neutralizzato dagli enzimi catalasi e perossidasi come la glutatione perossidasi all'interno di compartimenti cellulari quali microsomi, perossisomi e mitocondri.

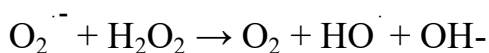


Il perossido di idrogeno è considerato una specie chimica ossidante perché è in grado di attraversare velocemente le membrane cellulari, diffondendo in altri distretti dove può attivare processi perossidativi. Può inoltre reagire con ferro o rame ridotti (reazione di Fenton) e portare alla produzione del radicale ossidrilico: (9-11)



Radicale idrossile HO[·]

Viene prodotto dalla decomposizione dei perossidi, risulta estremamente ossidante e in grado di attivare reazioni a catena. Si può generare dalla combinazione di una molecola di radicale superossido $\text{O}_2^{\cdot -}$ ed una molecola di H_2O_2 secondo la reazione di Haber-Weiss, catalizzata da ioni Fe^{2+} o Cu^+ :



Il radicale idrossile si può formare anche dalla scissione di H_2O_2 , reazione favorita dal calore o da radiazioni ionizzanti, ma avviene anche in condizioni fisiologiche con interazione diretta fra H_2O_2 e ferro, secondo la reazione di Fenton:



Il radicale idrossile è, fra i radicali dell'ossigeno, la molecola più tossica perché altamente reattiva e priva di ogni meccanismo di inattivazione endogena. Costituisce l'agente responsabile della fase iniziale dei processi perossidativi che avvengono a livello dei tessuti dell'organismo. HO[·] è in grado infatti di danneggiare tutte le macromolecole cellulari: le proteine, gli acidi nucleici e gli acidi grassi poliinsaturi dei fosfolipidi di membrana (12-13).

Ossigeno singoletto ¹O₂

Forma molto reattiva di ossigeno molecolare caratterizzato da una configurazione elettronica in cui tutti gli elettroni di valenza hanno spin opposti. Si può formare per dismutazione spontanea del radicale superossido (O₂^{·-}), per interazione di questo con H₂O₂ (reazione di Haber Weiss) o con il radicale idrossile HO[·].

Anche questa specie si rivela dannosa poiché da studi in vitro è emerso che ¹O₂ può nuocere ai sistemi viventi ossidando diverse molecole organiche, quali lipidi di membrana, proteine, acidi nucleici, nucleotidi, carboidrati e tioli (14-15).

1.1.2 Antiossidanti

Le cellule, per proteggersi dagli effetti dannosi dell'ossidazione, possiedono numerosi sistemi di difesa anti-ossidante, in grado di neutralizzare l'azione lesiva dei radicali liberi (**Fig. 2**).

Con il termine antiossidante vengono indicate tutte quelle molecole ed enzimi capaci di stabilizzare o disattivare i radicali liberi prima che danneggino le cellule (16).

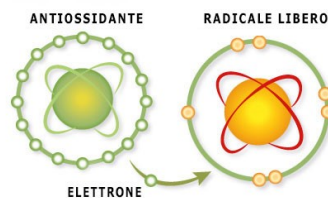


Figura 2 L'antiossidante dona un elettrone alla specie radicalica stabilizzandola

L'azione antiossidante di una sostanza dipende dalla sua biodisponibilità, dall'efficienza nell'eliminare i radicali liberi e nel chelare i metalli ridotti e dalla capacità di essere attiva in ambienti acquosi e/o di membrana (16).

Gli antiossidanti, in base alla loro origine, sono classificati in endogeni ed esogeni: i primi vengono prodotti dall'organismo stesso, i secondi sono introdotti tramite la dieta o l'assunzione di integratori (17).

Gli antiossidanti inoltre si dividono, secondo la loro natura chimica, in molecole enzimatiche e non enzimatiche (18).

Antiossidanti enzimatici

I principali antiossidanti enzimatici sono la superossido dismutasi, la catalasi e la glutazione perossidasi.

La *superossido dismutasi* (SOD) è un enzima appartenente alla famiglia delle metalloproteine e presente in varie isoforme che si distinguono per la presenza di diversi ioni a livello del sito attivo (rame, ferro o manganese) e per la diversa composizione in amminoacidi.

In particolare nell'uomo sono presenti tre isoforme: la Cu/Zn-SOD1 nel citoplasma, la Mn-SOD2 nei mitocondri e la Cu/Zn- SOD3 a livello extracellulare (19-20).

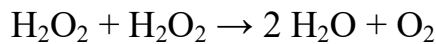
La sua funzione è quella di convertire l'anione superossido in ossigeno molecolare secondo la seguente reazione:



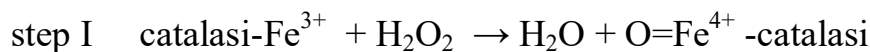
Il prodotto è un'altra specie reattiva non radicalica ma con attività ossidante, il perossido di idrogeno che è il substrato di altri due enzimi, la catalasi e la glutazione perossidasi (19-21).

Le *catalasi* (CAT) sono metalloproteine localizzate nei perossisomi e il cui gruppo prostetico è rappresentato dal ferro (21).

Questi enzimi proteggono i tessuti dai perossidi catalizzando la loro reazione di decomposizione ad acqua ed ossigeno molecolare:



Il meccanismo attraverso cui le catalasi agiscono non è in realtà ancora del tutto noto ma si pensa che la reazione possa avvenire in due steps:



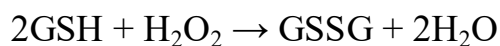
Nel momento in cui il H_2O_2 entra nel sito attivo, interagisce con gli amminoacidi asparagina (Ans 147) ed istidina (His 74), causando il trasferimento di un protone tra due atomi di ossigeno. Gli atomi di ossigeno liberi inducono la formazione di H_2O e reagiscono con il ferro per formare O=Fe^{4+} , il quale reagisce con una seconda molecola di H_2O_2 per produrre O_2 e H_2O (21-23).

Le CAT hanno un'alta velocità di turnover grazie alla quale una sola molecola può convertire, ogni minuto, circa 6 milioni di molecole di H_2O_2 ad H_2O e O_2 (22).

Quando i livelli di perossido di idrogeno sono troppo bassi per attivare le catalasi, viene attivata la *glutathione perossidasi*, che può essere presente nella

forma selenio-dipendente (GPx) o selenio indipendente (glutathione-S-tranferasi, GST). Le differenze sono dovute, oltre che alla presenza del selenio nel centro attivo, anche al numero di subunità e ai meccanismi catalitici (20-26). Nell'uomo sono presenti quattro tipi differenti di GPx che agiscono in associazione con il glutathione per ridurre i perossidi.

La GPx utilizza come donatore di elettroni il glutathione e come substrato un perossido, che può essere perossido d'idrogeno o un perossido organico (ROOH), e catalizza la sua conversione ad acqua o alcol:



La GPx è un enzima molto importante nel prevenire la perossidazione lipidica e proteggere quindi la struttura e la funzione delle membrane biologiche (26).

Antiossidanti non enzimatici

Gli antiossidanti non enzimatici si distinguono in antiossidanti ad azione diretta, che comprendono vitamine, polifenoli e carotenoidi, e quelli ad azione indiretta, che non neutralizzano di per sé i radicali liberi ma accrescono l'attività antiossidante endogena (27).

La *vitamina E* è un potente antiossidante liposolubile presente nell'organismo umano in diverse forme di cui la più attiva è l' α - tocoferolo. La sua funzione

principale è quella di arrestare la perossidazione lipidica neutralizzando i radicali perossilipidici, rendendoli quindi meno reattivi. Questa reazione trasforma a sua volta la vitamina E in un radicale α -tocoferossilico che può reagire con la vitamina C o con il glutathione per riformare l' α -tocoferolo (28).

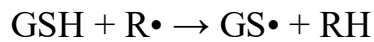
Un altro importante antiossidante è la *Vitamina C*, molecola idrosolubile che può essere presente in due forme interconvertibili: acido ascorbico (ridotta) e acido deidroascorbico (ossidata).

Oltre ad essere coinvolta nella rigenerazione della vitamina E, la vitamina C cede i suoi elettroni per dare stabilità ad alcune ROS come l'anione superossido e il radicale idrossile ma può anche agire da agente riducente innescando, in presenza di metalli di transizione (Fe^{3+} e Cu^{2+}), la perossidazione lipidica (29).

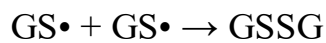
L'azione antiossidante dei composti tiolici è dovuta all'atomo di zolfo che può facilmente perdere un singolo elettrone e dare origine al radicale tiile ($\text{GS}\cdot$) la cui emivita risulta significativamente più lunga di molti altri radicali generati durante lo stress ossidativo (30). Tra i tioli l'antiossidante di maggior rilevanza è il *glutathione ridotto* (GSH), un tripeptide costituito da cisteina, glicina e glutammato che viene prodotto a livello intracellulare. È considerato il principale antiossidante solubile in diversi compartimenti cellulari dove

risulta molto abbondante: il citosol (1-11 mM), il nucleo (3-15 mM) e i mitocondri (5-11 mM) (30).

La reazione attraverso cui il glutathione ridotto reagisce con un radicale R• è la seguente:



Il radicale così formato può dimerizzare e formare il glutathione ossidato (GSSG):



Il glutathione ossidato (GSSG) è accumulato all'interno delle cellule e il rapporto GSH/GSSG è un buon indice di stress ossidativo di un organismo.

Il GSH oltre ad avere funzione di “scavenger”, come visto sopra, nei confronti degli idrossidi e dell'ossigeno singoletto, è anche un cofattore di diversi enzimi come la glutathione perossidasi e la glutathione transferasi ed è in grado di rigenerare alcuni importanti antiossidanti quali vitamina C ed E (30).

Un'altra classe di antiossidanti comprende i carotenoidi, pigmenti diversi dal punto di vista strutturale e funzionale, presenti nelle piante e in diversi microrganismi. Questi hanno la capacità di eliminare l'ossigeno singoletto e i perossidi e di prevenire il danno a livello di compartimenti lipofilici proteggendo i lipidi dall'attacco di superossido e radicale idrossile (31).

Infine ricordiamo i flavonoidi che rappresentano i principali composti polifenolici presenti nelle piante e suscitano particolare interesse per le loro proprietà antiossidanti. Fungono infatti da agenti riducenti e donatori di elettroni, sono in grado di neutralizzare l'ossigeno singoletto e possono chelare gli ioni metallici prevenendo così la rottura del perossido di idrogeno (32).

Gli antiossidanti ad azione indiretta, invece, sono tutti quei composti endogeni o esogeni che sono in grado di contrastare lo stress ossidativo indirettamente attraverso vari meccanismi. Possono ad esempio riciclare gli antiossidanti diretti in modo da consentirgli di neutralizzare altri radicali, aumentare l'espressione degli enzimi disintossicanti di fase II, fornire gli aminoacidi e i minerali necessari alle cellule per sintetizzare gli enzimi antiossidanti oppure chelare i metalli di transizione in modo da prevenire la formazione di radicali. Di questa categoria fanno parte composti quali l'acido ellagico, l'epigallocatechina gallato, la curcumina, il resveratrolo e i sulforafani (33-34).

1.2 Il Sulforafano

Il sulforafano (1-isotiocianato-(4R)-(metilsulfinil)butano) è stato isolato per la prima volta nel 1992 ad opera di Zhang Y. et al ed in seguito è stato ampiamente studiato per i suoi numerosi effetti benefici (35). È una molecola lipofila alifatica di piccole dimensioni (MW = 177.29) appartenente al gruppo degli isotiocianati, fitocomposti contenenti zolfo. È infatti costituito da un gruppo funzionale isotiocianato ($-N = C = S$) e una catena laterale metilsolfonilica (R- (SO) - R) (36) (**Fig. 3**).

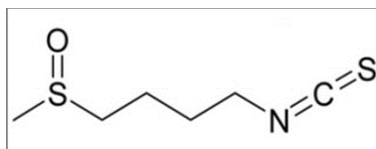


Figura 3 Struttura molecolare del sulforafano

Il sulforafano viene sintetizzato a partire da un precursore biologicamente inattivo, la glucorafanina, un glucosinolato (GLS) presente in elevate quantità nei vegetali appartenenti alla famiglia delle *Brassicaceae* o *Crucifereae*. Nelle piante, i GLS ed i loro prodotti di degradazione, oltre ad essere responsabili dell'odore e del gusto pungenti tipici, hanno proprietà fungicide, battericide, nematocide e la loro composizione varia in funzione della specie, del clima e

delle condizioni di coltivazione (37). Quando i GLS vengono a contatto con la mirosinasi, un enzima che coesiste con i GLS nelle piante ma che è fisicamente separato da essi, formano diversi prodotti di idrolisi con differenti attività biologiche. Tra questi, gli isotiocianati (ITC), ed in particolare il Sulforafano (SFN), hanno suscitato un interesse sempre maggiore per le loro notevoli proprietà, tra cui quelle antitumorali, antiossidanti e antidiabetiche (38).

1.2.1 Fonti alimentari

Le piante più ricche di Glucorafanina, GLS precursore del SFN, appartengono alla famiglia delle *Brassicaceae* e comprendono cavolo bianco, rosso e cinese, broccoli, cavolfiore e cavolini di Bruxelles. È abbondante anche in radici come il ravanello e la rapa, in vegetali in foglia come la rucola e il crescione e in salse come senape e wasabi (39).

Il contenuto di Glucorafanina nelle piante varia in base a fattori intrinseci come la specie, il tipo di tessuto considerato, l'età e la salute della pianta, le pratiche agricole e le condizioni climatiche. Molto importanti sono anche i fattori estrinseci come i processi di preparazione, cottura e conservazione a cui i vegetali sono sottoposti e che spesso portano ad una riduzione del contenuto di Glucorafanina (40).

Le quantità presenti in alcuni membri della famiglia delle *Brassicaceae* sono riportate nella **Tabella 1** da cui si può evincere che la migliore fonte alimentare è rappresentata dai germogli di broccoli, che ne contengono da 10 a 100 volte di più rispetto ai broccoli maturi (40-43).

Classificazione botanica	Range (media)	Unità
Kohlrabi (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gongylodes</i>)	7.8–8.7	mg/100 g (fw)
Cavolo rosso (<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> f. <i>rubra</i>)	4.0–18.2	mg/100 g (fw)
Rucola (<i>Eruca sativa</i>)	2.2–4.4 1.3	mg/g (dw) lmol/g (dw)
Broccolo verde (<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>)	0.8–21.7 (7.1) 4.5–28.5 2.4–18.4 (15.7) 1.3–8.3 (4.0) 0.3–12.6 (4.6) 24–185 (95) 11.6–34.0 (22.2) 4.1–14.9 (10.5) 0.37–4.7 (2.2)	lmol/g (dw) lmol/g (dw) lmol/g (dw) lmol/g (dw) lmol/g (dw) lmol/100 g (fw) mg/100 g (fw) lmol/g (dw) lmol/g (dw)
Broccolo viola (<i>B. oleracea</i> var. <i>italic</i>)	6.7	mg/100 g (fw)
Cavolo viola (<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>)	11.6	mg/100 g (fw)
Broccolo cinese (<i>Brassica rapa</i> var. <i>alboglabra</i>)	39.7 118.9 0.01	mg/100 g (fw) lmol/100 g (fw) lmol/g (dw)
Germogli di broccoli (<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>)	23.3–67.6 11.1–28.7 17.4–49.5	lmol/g (dw) lmol/g (dw) lmol/g (dw)

Tabella 1 Quantità di glucorafanina presenti in alcuni dei più importanti membri della famiglia delle *Brassicaceae*; dw=peso secco, fw=peso fresco

1.2.2 Metabolismo

Il SFN si ottiene dall'idrolisi enzimatica della Glucorafanina operata dalla mirosinasi, una β -tioglucosidasi, che viene rilasciata quando la pianta viene tagliata o masticata. Questo enzima si trova anche nell'intestino, prodotto dalla microflora batterica, e ciò garantisce che la glucorafanina contenuta nell'alimento venga interamente idrolizzata anche nel caso in cui la cottura portasse all'inattivazione della mirosinasi presente nelle cellule vegetali (44).

L'enzima in realtà, in presenza della proteina epitiospecifica (ESP), idrolizzando la glucorafanina, produce un intermedio instabile che viene convertito in sulforafano nitrile (5-methylsulfinylpentane nitrile), biologicamente inattivo. Se invece la ESP non è presente, l'unica altra via biosintetica possibile è quella che porta l'intermedio verso la produzione di SFN (45). Inoltre la mirosinasi e la ESP hanno una stabilità termica diversa, per cui la cottura per tempi brevi e a temperature ridotte (60-70 °C) porta alla denaturazione della ESP e quindi all'aumento della quantità di SFN, mentre un'eccessiva cottura può portare alla denaturazione anche dell'enzima e quindi all'abbattimento del contenuto di SFN (45).

Grazie alla sua elevata lipofilia [$\log P$ (ottanolo/acqua) 0.72] e al suo peso molecolare (177 g/mol), una volta formatosi, a livello del cavo orale in

seguito a masticazione o nell'intestino ad opera della microflora, il SFN viene rapidamente assorbito per diffusione passiva negli enterociti (46-47).

Dopo l'assorbimento, il SFN si lega al GSH grazie all'azione dell'enzima glutatione S-trasferasi (GST). Ciò porta alla formazione di un gradiente di concentrazione che guida il passaggio del SFN attraverso la membrana cellulare (48).

I coniugati formati dall'interazione sulforafano-GSH (ditiocarbammati) ed il sulforafano in forma libera, sono rapidamente rimossi dal citoplasma da trasportatori di membrana (48).

I ditiocarbammati e il sulforafano libero raggiungono il fegato dove, data l'elevata concentrazione di GSH e l'alta attività della GST, subiscono un'ulteriore coniugazione con GSH, e da qui sono poi trasportati nel sangue legati alle proteine plasmatiche (albumina) o alle glicoproteine. Raggiungono quindi le cellule bersaglio all'interno delle quali permeano con lo stesso meccanismo descritto per l'assorbimento negli enterociti e si accumulano nel citoplasma dove svolgono la loro funzione raggiungendo concentrazioni nell'ordine dei millimolari (49-50).

Successivamente, i coniugati vengono metabolizzati attraverso la via dell'acido mercapturico, sia nel fegato a cui tornano tramite il circolo enteroepatico, ma principalmente a livello dei reni attraverso l'azione di vari

enzimi come la glutamiltranspeptidasi, la cisteinilglicinasi e la N-acetiltransferasi.

Questa serie di reazioni conduce alla formazione di diversi metaboliti tra qui l'acido mercapturico che, data la sua idrofilia, viene facilmente escreto con le urine (50) (**Fig. 4**).

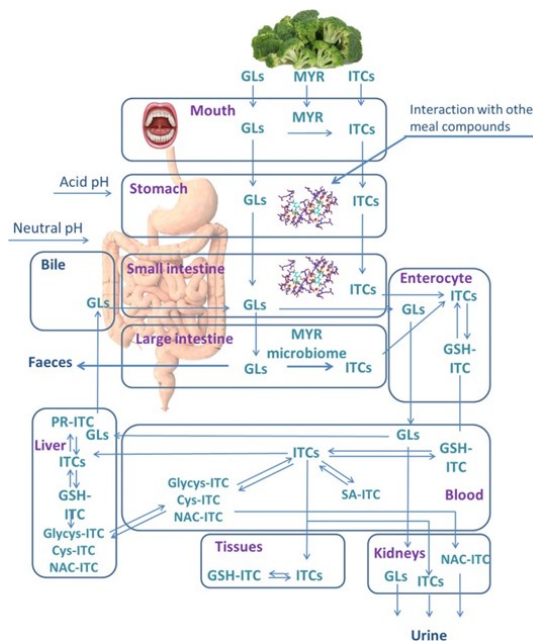


Figura 4 Panoramica del destino metabolico dei glucosinolati (GLs) e degli isotiocianati (ITCs)

1.2.3 Attività biologiche

Evidenze sperimentali hanno mostrato che il SFN è responsabile di diversi effetti benefici per la salute dell'uomo grazie alle sue proprietà antiossidanti, antimicrobiche, antitumorali, antinfiammatorie, antiaging, neuroprotettive e antidiabetiche, contribuendo a contrastare alcune patologie come quelle cardiovascolari e neurodegenerative per le quali il diabete mellito rappresenta uno dei principali fattori di rischio. I principali meccanismi attraverso cui esplica tali funzioni sono descritti di seguito (51-52).

Inibizione degli enzimi di fase I

Gli enzimi di fase I come il citocromo p450 (CYP), localizzato a livello del reticolo endoplasmatico delle cellule epatiche, sono responsabili della trasformazione e bioattivazione dei pro-cancerogeni a cancerogeni. Attraverso le reazioni catalizzate da tali enzimi infatti, gli intermedi elettrofili altamente reattivi si legano covalentemente ai siti nucleofili di importanti macromolecole quali DNA, RNA e proteine formando degli addotti. Queste reazioni, insieme ad un processo di riparazione inadeguato può, a sua volta, causare errori di codifica e mutazioni in geni critici e dare avvio alla carcinogenesi. A tal proposito molteplici studi hanno riportato la capacità del SFN di inibire l'attività catalitica di alcuni enzimi di fase I come il citocromo p450-1A1 e -2B1 / 2. Inoltre riduce significativamente l'espressione dei geni

CYP1A1, 1A2 e CYP3A4, che codificano rispettivamente per il citocromo p450-1A1, -1A2 e -, poichè è un efficace antagonista del recettore di steroidi e xenobiotici (SXR) che regola la loro espressione (53-55)

Induzione degli enzimi di fase II

Gli enzimi di fase II catalizzano reazioni dette di detossificazione, ovvero reazioni di coniugazione di composti altamente reattivi che aumentano la loro solubilità in acqua, favorendone così l'escrezione per via renale. Tali enzimi proteggono quindi le cellule dal danno al DNA, in particolare da parte di cancerogeni e specie reattive dell'ossigeno (ROS). Secondo studi clinici, il SFN è uno dei più potenti induttori conosciuti di questi enzimi e agisce potenziando l'attività del fattore nucleare Nrf2. Una volta attivato, Nrf2 induce citoprotezione fornendo antiossidanti diretti, aumentando il metabolismo di GSH (sintesi e rigenerazione), stimolando la sintesi di NADPH e migliorando il riconoscimento e lo smaltimento di proteine danneggiate. Questo fattore nucleare, in condizioni normali, è sintetizzato costitutivamente nella cellula così come il suo repressore Keap1 a cui si lega e ne favorisce la degradazione attraverso la via dell'ubiquitina-proteasoma. Il SFN può reagire con alcuni residui di Cys di Keap1 inibendo il suo legame con Nrf2 e permettendo così la sua traslocazione nucleare (**Fig. 5**). Nrf2, una

volta nel nucleo, agisce da attivatore trascrizionale per alcune sequenze di DNA note come elementi di risposta antiossidante (ARE) e può migliorare l'espressione di alcuni geni, inclusi quelli per la sintesi di NADPH: chinone ossidoreduttasi 1 (NQO1), eme ossigenasi-1 (HO-1), γ -glutamilcisteina ligasi (γ GCL), glutatione S-transferasi (GST) e tioredossina (56-58).

Il SFN è quindi un antiossidante indiretto che protegge le cellule dalla eccessiva produzione di radicali liberi, non agendo da donatore o accettore di elettroni, ma andando a modulare l'espressione dei geni di alcuni enzimi coinvolti nei meccanismi di difesa antiossidante e modificando i livelli intracellulari di GSH (58).

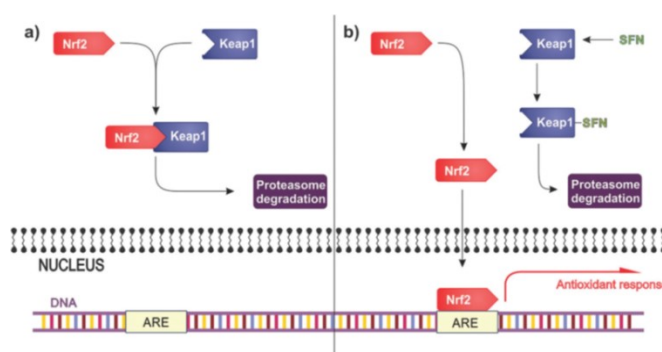


Figura 5 Attivazione del fattore nucleare Nrf2 da parte del sulforafano

Attività antiinfiammatoria

La famiglia dei fattori nucleari κ B (NF- κ B) che sono costituiti da dimeri di diverse proteine, quali RelA (p65), RelB, c-Rel, p52 o p50, ha una grande

rilevanza nella risposta infiammatoria. Uno dei principali meccanismi con cui la via NF- κ B viene avviata prevede l'attivazione, da parte di diversi stimoli come batteri, virus e citochine proinfiammatorie, del complesso chinasi IKK. Tale complesso, costituito da due subunità catalitiche IKK α e IKK β e una subunità regolatoria IKK γ , una volta attivato va a fosforilare l'inibitore di NF- κ B (I κ B) che viene degradato dal proteosoma lasciando NF- κ B libero di entrare nel nucleo ed iniziare la trascrizione di alcuni geni come le citochine proinfiammatorie interleuchine 6 e 10 (IL-6 e IL-10) e il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α). (59)

Il SFN agisce come antiinfiammatorio attraverso diversi meccanismi: da un lato blocca la via dell' NF- κ B impedendone la traslocazione, l'attività trascrizionale e inibendo la fosforilazione dell'inibitore I κ B (**Fig. 6**). In questo modo viene meno la sintesi di tutti quei mediatori proinfiammatori come la cicloossigenasi-2 (COX-2), la prostaglandina E (PGE) sintasi e l'ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS). Dall'altro lato il SLF agisce attivando la via dell'NrF2 che a sua volta è in grado sia di indurre l'espressione di geni di sostanze anti-infiammatorie come NQO1 e HO-1, che di diminuire l'espressione delle subunità catalitiche (IKK α e IKK β) e aumentare quella dell'inibitore (I κ B) (60-61).

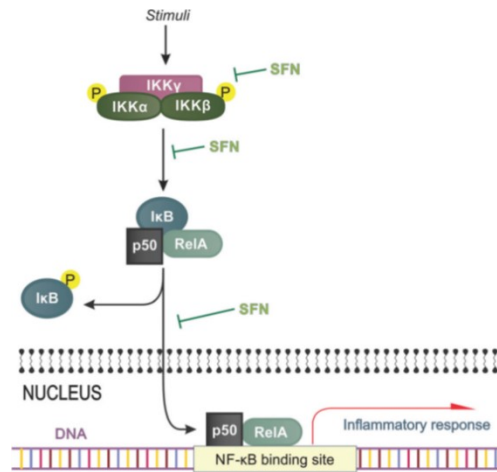


Figura 6 Effetti del sulforafano sul pathway della risposta infiammatoria

Regolazione del ciclo cellulare

La progressione attraverso le varie fasi del ciclo cellulare è finemente regolata da un sistema di controllo che non consente l'inizio di una fase se quella precedente non è stata completata in modo corretto. In questo modo si assicura che cromosomi danneggiati o incompleti non vengano replicati. Le proteine più importanti coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare sono le chinasi ciclina-dipendenti (CDK) e le cicline che si uniscono a formare dei complessi CDK-ciclina caratteristici per ogni fase e che conducono alla fosforilazione di substrati specifici. In condizioni normali si instaura un equilibrio tra i complessi ciclina / CDK che promuovono la crescita cellulare e gli inibitori delle CDK che promuovono invece l'arresto del ciclo cellulare. È stato dimostrato che il SFN può arrestare il ciclo cellulare in diversi stadi della sua progressione attraverso diversi meccanismi (62). Legandosi

all'istone deacetilasi (HDAC), è in grado infatti di modulare l'espressione dei regolatori del ciclo cellulare causando, in modo dipendente dalla concentrazione e dal tempo di trattamento, una riduzione della vitalità cellulare e un arresto del ciclo soprattutto in G2 / M delle cellule tumorali. In base alla tipologia di cellule tumorali provoca la down-regulation di diversi tipi di cicline quali ad esempio la ciclina B1, D1, A, Cdc25B e Cdc25C (63). Viene inoltre costantemente controllata, indipendentemente dal tipo di cellula, l'induzione di p21, proteina inibitrice del ciclo cellulare (64).

Infine, è stato dimostrato che il SFN può inibire la polimerizzazione della tubulina che ha un ruolo fondamentale non solo nella divisione cellulare ma anche nella motilità e nel traffico intracellulare. In questo modo interferisce con la mitosi provocandone il blocco (65).

Induzione dell'apoptosi

L'apoptosi, o morte cellulare programmata, è un processo finemente regolato e altamente controllato che svolge un ruolo fondamentale nel ciclo vitale degli organismi, sia in condizioni fisiologiche che patologiche.

Ha due meccanismi di azione: una via estrinseca che richiede l'attivazione dei recettori di morte cellulare da parte di agenti esogeni, e una via intrinseca avviata da danni al DNA o agenti ossidanti (66).

Studi *in vivo* e *in vitro* hanno dimostrato elevate concentrazioni di SFN inducono entrambe queste vie apoptotiche attraverso la produzione di ROS e la regolazione dell'espressione genica (66).

Il SLF è infatti in grado di bloccare l'azione del fattore nucleare Nf-kB, con i meccanismi precedentemente descritti, il quale è responsabile dell'espressione degli inibitori dell'apoptosi. Tra questi in particolare alcuni stabilizzatori dei mitocondri che governano la permeabilità della membrana mitocondriale esterna come Bcl-2 e Bcl-xl e gli inibitori delle caspasi (IAPs) (67).

Il SFN inoltre, legandosi all'enzima istone deacetilasi (HDAC), ne inibisce l'attività e porta ad un aumento della trascrizione di fattori proapoptotici come Bax, Bad e APAF-1 (67).

L'altro meccanismo attraverso cui induce l'apoptosi è la formazione di ROS che avviene in seguito ad un trattamento con elevate quantità di SFN. Alte concentrazioni di SFN infatti, grazie alla coniugazione che avviene durante il suo metabolismo, abbassano i livelli intracellulari di GSH e di conseguenza anche la soglia di specie reattive tollerate dalle cellule prima che si instauri una condizione di stress ossidativo (68).

Sia la diminuzione di Bcl-2 che l'aumento dei ROS possono compromettere l'integrità dei mitocondri causando l'apertura del poro di transizione della permeabilità mitocondriale (mPTP). Tale evento consente l'ingresso

deregolamentato di piccoli soluti nella matrice mitocondriale e porta alla dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) e a gonfiore osmotico della matrice, con successiva rottura della membrana e rilascio di fattori pro-apoptotici. In particolare vengono rilasciati Ca^{2+} e citocromo c che sono responsabili rispettivamente dell'attivazione della proteasi calpaina e della caspasi 9. Questa a sua volta attiva la caspasi 3 il cui principale bersaglio è la poli ADP-ribosio polimerasi (PARP) e porta all'apoptosi della cellula (68-69).

L'aumento dei ROS indotto da SFN è stato anche correlato al blocco di JAK2, una protein-chinasi che attraverso la fosforilazione del suo substrato STAT3 induce l'espressione di geni legati alla proliferazione e alla sopravvivenza. Le ROS vanno ad ossidare sia i residui di cisteina di JAK2 a livello del dominio catalitico impedendone l'attività, che STAT3 inibendo il suo legame col DNA (69).

1.3 Diabete mellito

Il diabete mellito (DM), secondo la definizione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), è un gruppo di disordini metabolici, a carico di glucidi, lipidi e proteine, che ha come manifestazione principale un aumento delle concentrazioni ematiche di glucosio (iperglicemia). Il diabete può essere causato o da un deficit assoluto di secrezione insulinica o da una ridotta risposta all'azione dell'insulina a livello degli organi bersaglio (insulino-resistenza) o da una combinazione di entrambi (70).

Oltre all'iperglicemia ci sono molti altri fattori che giocano un ruolo importante nella patogenesi del diabete come l'iperlipidemia e lo stress ossidativo che portano ad un alto rischio di complicanze (70).

La prevalenza del diabete è tale da aver raggiunto proporzioni epidemiche: attualmente 460 milioni di individui in tutto il mondo ne sono affetti e si stima che oltre 580 milioni svilupperanno tale condizione entro il 2035 e 700 milioni entro il 2045 (71).

Esistono diverse tipologie di diabete mellito e i criteri per la loro classificazione hanno subito nel corso degli anni continue modificazioni e ridefinizioni fino al 1997, quando l'ADA (American Diabetes Association) e l'OMS hanno proposto una classificazione, attualmente ancora in vigore,

basata su criteri eziopatogenetici che prevedono la suddivisione in quattro classi (Tabelle 2,3) (70):

1. Diabete tipo 1
2. Diabete tipo 2
3. Altre forme di diabete
4. Diabete mellito gestazionale (GDM)

Diabete di tipo 1	È il risultato della distruzione, autoimmune o idiopatica, delle cellule β pancreatiche che porta ad un deficit di insulina con tendenza alla chetoacidosi.
Diabete di tipo 2	È causato da un deficit parziale di secrezione insulinica che in genere progredisce nel tempo ma non porta mai ad una carenza assoluta di ormone e si instaura su una condizione, più o meno severa, di insulino-resistenza.
Diabete gestazionale	È caratterizzato da un'alterata tolleranza al glucosio di entità variabile con insorgenza o primo riconoscimento durante la gravidanza. Compare infatti solitamente nel II-III trimestre e nella maggior parte dei casi si risolve non molto tempo dopo il parto.
Altre forme di diabete	Sono forme di diabete che non rientrano nelle precedenti classi e che sono dovute ad altre cause. Possono essere la conseguenza di difetti genetici delle β -cellule o nell'azione insulinica, di malattie del pancreas esocrino, di endocrinopatie, infezioni o forme indotte da droghe, sostanze chimiche e farmaci.

Tabella 2 Classificazione del diabete mellito (70-73)

	Tipo 1	Tipo 2
Prevalenza	Circa 0.5 %	Circa 5%
Sintomatologia	Sempre presente Spesso eclatante e a inizio brusco	Spesso modesta o assente
Tendenza alla chetosi	Presente	Assente
Peso	Generalmente normale	Generalmente in eccesso
Età di esordio	Più comunemente < 30 anni	Più comunemente > 40 anni
Complicanze	Non prima di alcuni anni dopo la diagnosi	Spesso presenti al momento della diagnosi
Insulina circolante	Ridotta o assente	Normale o aumentata
Autoimmunità	Presente	Assente
Terapia	Insulina necessaria sin dall'esordio	Dieta, farmaci orali, iniettivi, terapia sostitutiva con insulina

Tabella 3 Caratteristiche cliniche differenziali del diabete di tipo 1 e di tipo 2 (73)

1.2.1 Diabete mellito di tipo 2

Il DM2 è definito come un disordine metabolico ad eziologia multipla caratterizzato da iperglicemia cronica e da alterazioni nel metabolismo di zuccheri, grassi e proteine. Ciò è dovuto ad un difetto nella secrezione di insulina da parte del pancreas, ad un variabile grado di resistenza all'ormone da parte dei tessuti insulino-sensibili, quali fegato, muscoli e tessuto adiposo e ad un'aumentata produzione epatica di glucosio (74).

La malattia è il risultato di una complessa interazione tra fattori genetici e ambientali a cui un individuo può essere esposto. Tra questi, quelli che sembrano predisporre maggiormente al DM2 sono l'obesità (in particolare il grasso viscerale), l'inattività fisica, l'alcol, il fumo e l'alimentazione. Alcuni

comportamenti alimentari infatti, come un'elevata assunzione di acidi grassi saturi aumentano il rischio di DM2, mentre una dieta ricca in acidi grassi insaturi, fibre e alimenti a basso indice glicemico risulta protettiva (74-75). La resistenza all'insulina, ovvero la ridotta capacità dei tessuti periferici di rispondere all'azione dell'ormone, ha un ruolo centrale nella patogenesi del DM2 ed è fortemente correlata all'obesità e all'inattività fisica. In seguito all'aumento del tessuto adiposo viscerale e sottocutaneo, si verifica infatti una maggior produzione, da parte degli adipociti, di adipochine che modulano l'azione dell'insulina conducendo all'insulino-resistenza (76-77).

A livello del tessuto adiposo stesso questa resistenza si traduce in una ridotta utilizzazione del glucosio e in un aumento della lipolisi che normalmente viene bloccata dall'azione dell'ormone. Questo meccanismo conduce ad un incremento dei livelli circolanti di acidi grassi liberi (FFA) e ad insulino-resistenza da parte del muscolo scheletrico e del fegato. In particolare nel tessuto muscolare, viene ridotta la capacità dell'insulina di promuovere l'utilizzazione di glucosio e il suo immagazzinamento sotto forma di glicogeno, contribuendo all'iperglicemia della fase post-prandiale.

A livello epatico invece, le elevate concentrazioni di FFA, l'insulino-resistenza con conseguente eccesso relativo di glucagone, comportano un incremento della gluconeogenesi epatica che si traduce in una eccessiva

produzione di glucosio principalmente responsabile degli aumentati livelli di glicemia a digiuno (77-79).

Nelle fasi precoci del DM2 le cellule β del pancreas, per contrastare l'insulino-resistenza, producono maggiori quantità di insulina permettendo così ai livelli di glucosio di rimanere nella norma. Quando però la resistenza all'insulina progredisce, le cellule β non sono più in grado di sostenere tale meccanismo compensatorio, la secrezione pancreatica si riduce e si ha quindi iperglicemia postprandiale. Infine con l'ulteriore riduzione della secrezione di insulina e l'aumento della produzione di glucosio a livello epatico, si instaura il DM2 conclamato e compare iperglicemia anche a digiuno (80).

La capacità secretiva della cellula β rappresenta una condizione critica per lo sviluppo del diabete: se la cellula β , in risposta all'aumentata richiesta di ormone, è in grado di produrre maggiori quantità di insulina il diabete non si sviluppa, anche se è presente uno stato di insulino-resistenza (80).

1.2.2 Complicanze

Le complicanze del diabete mellito possono essere distinte in acute e croniche (81).

Le complicanze acute sono a breve termine e la loro insorgenza è improvvisa e repentina. Comprendono ipoglicemia e/o iperglicemia, chetoacidosi

diabetica, che caratterizza più spesso il diabete di tipo 1, e coma iperosmolare non chetosico, che è invece più frequente nel diabete di tipo 2. Tali complicanze se non trattate in modo tempestivo e appropriato possono essere potenzialmente mortali per il paziente (81-82).

Le complicanze croniche sono conseguenze tardive, quindi a lungo termine, che contraddistinguono maggiormente il diabete di tipo 2. Sono legate ad un'iperglicemia severa e prolungata capace di causare, in diversi distretti corporei, alterazioni che sono dovute a situazioni micro e macroangiopatiche (81).

La microangiopatia coinvolge i vasi di piccolo calibro e determina disfunzioni endoteliali, ispessimento della membrana basale e alterazioni dei meccanismi di scambio fra sangue e tessuti. Le maggiori conseguenze vengono riportate a livello di retina (retinopatia diabetica), reni (nefropatia diabetica) e nervi (neuropatia diabetica) (81-83).

La macroangiopatia coinvolge invece i vasi di grosso calibro e comporta una tendenza a sviluppare aterosclerosi precocemente. Particolarmente importanti sono le alterazioni vascolari a livello cerebrale, causa di ictus, disturbi ischemici ed emorragie, e a livello cardiaco, responsabili di coronopatia, angina pectoris e infarto. La cardiomiopatia diabetica in particolare, è caratterizzata da modificazioni morfologiche, funzionali e metaboliche a

livello del cuore. Tali disordini cardiaci sono dovuti ad iperglicemia ed iperlipidemia costanti che determinano un aumento dello stress ossidativo, dello stato infiammatorio, della fibrosi e un'alterazione della funzione mitocondriale (81-85).

1.2.3 Diabete mellito e stress ossidativo

È indispensabile dire che stress ossidativo e diabete mellito sono legati da complesse interazioni a seguito delle quali si intensificano a vicenda. Da un lato infatti ci sono alcune vie molecolari attraverso cui i radicali liberi alterano la normale omeostasi glucidica contribuendo allo sviluppo e alla progressione del diabete mellito e delle complicanze associate, dall'altro lato l'iperglicemia cronica promuove lo stress ossidativo attraverso la generazione de novo di radicali liberi e la soppressione dei sistemi di difesa antiossidante (86-87). Di seguito sono riportate le possibili vie molecolari attraverso cui lo stress ossidativo contribuisce allo sviluppo della resistenza all'insulina e del DM (Fig. 7).

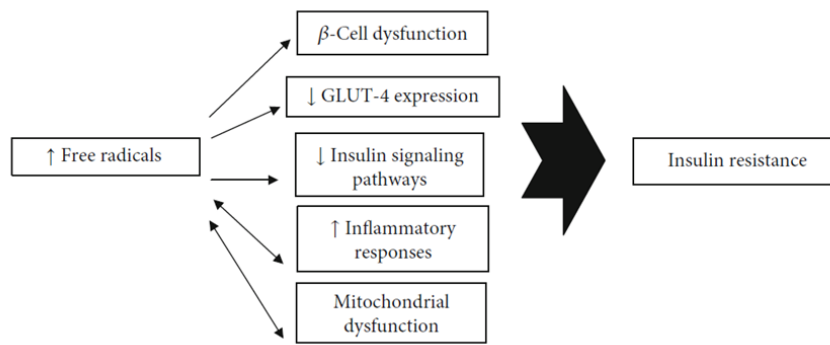


Figura 7 Lo stress ossidativo la resistenza all'insulina attraverso cinque principali pathways molecolari

1. Disfunzione delle cellule β

I meccanismi attraverso cui lo stress ossidativo altera la funzione delle cellule β sono molteplici e portano inevitabilmente ad una riduzione sia della produzione che della secrezione di insulina alterando la fusione delle vescicole di proinsulina con la membrana plasmatica e la loro esocitosi in risposta al glucosio nella circolazione (88).

I radicali possono interagire con agenti proapoptotici e modulatori trascrizionali quali Pdx-1, Nkx6.1, Ngn.3, FOXO e MafA, che sono altamente sensibili allo stress ossidativo. In tal modo inducono processi apoptotici e diminuiscono la proliferazione e differenziazione delle cellule β . Inoltre, le specie radicaliche hanno un effetto negativo su diverse vie metaboliche nelle cellule β e interagendo con i gruppi SH dei canali KATP, determinano una

minore secrezione di insulina. Concentrazioni più elevate di radicali liberi inibiscono i fattori di trascrizione nucleare coinvolti nell'espressione del gene dell'insulina come Pdx-1 e MafA riducendo così la produzione di insulina a livello del DNA. Lo stress ossidativo infine può indurre pathway molecolari coinvolti nella risposta infiammatoria, proliferazione, differenziazione e apoptosi cellulare come Nf- κ b, JNK/SAPK e p38 MAPK, attivare i TLRs (toll-like receptors) e provocare disfunzione mitocondriale, compromettendo la funzionalità delle cellule β (88-90).

2. Espressione e/o localizzazione di GLUT4

La riduzione dell'espressione e della traslocazione di GLUT-4 è uno dei principali meccanismi molecolari attraverso cui lo stress ossidativo induce la resistenza all'insulina e contribuisce allo sviluppo del DM. GLUT-4 regola l'entrata del glucosio nelle cellule insulino-dipendenti, ovvero quelle del tessuto muscolare scheletrico, cardiaco e adiposo, e qualsiasi fattore che ne riduce l'espressione o la localizzazione porta alla diminuzione del glucosio che entra nelle cellule bersaglio, traducendosi in una minore sensibilità all'insulina in questi tessuti. Uno stress ossidativo prolungato può sopprimere sia fattori di trascrizione (PPAR- γ , CEB / Ps, fattore nucleare-1, p85, HIF-1 α , MEF2 e Nf- κ b) sia microRNA (miR-21a-5p, miR-222- 3p, miR-133b-3p,

miR-10b, miR-106b-5p, miR-29c-3p e miR-133a-3p) coinvolti nell'espressione di GLUT-4 (91-92).

3. Vie metaboliche insulino-dipendenti

Eventuali difetti nelle vie metaboliche insulino-dipendenti (ISP) possono contribuire allo sviluppo di insulino-resistenza e DM e lo stress ossidativo può compromettere la normale ISP a diversi livelli. I radicali liberi infatti sono in grado di indurre la fosforilazione della serina in molteplici targets come IRS-1 e IRS-2 sia direttamente che indirettamente attraverso l'attivazione di diverse serina/treonina chinasi sensibili allo stress ossidativo come IKK- β , Akt (o PKB), GSK-3, AMPK e mTOR. L'aumento delle specie radicaliche inoltre provoca la sottoregolazione delle proteine coinvolte nell'ISP come Akt, IRS, IRS-1, e GSK-3 e induce meccanismi molecolari p38 MAPK-dipendenti. Tutto ciò contribuisce all'alterazione del normale ISP portando alla resistenza all'insulina e al diabete mellito (93-95).

4. Processi infiammatori

L'interazione tra risposte infiammatorie e DM è complessa e non completamente chiarita ma è ormai noto che un'infiammazione cronica di basso grado è coinvolta nella fisiopatologia di insulino-resistenza, DM e

complicanze correlate, sia direttamente che indirettamente dando inizio ad altri meccanismi come la compromissione dell'ISP e la disfunzione delle cellule β . Le citochine infatti, così come altri mediatori infiammatori quali TNF- α e Nf- κ b, possono modulare la fosforilazione della serina in IRS-1 in vari siti e quindi compromettere la normale ISP, inducendo le vie Janus chinasi (JNK). Lo stress ossidativo promuove l'infiammazione nel fase prediabetica e diabetica, inducendo l'attivazione di monociti e macrofagi. Inoltre, incrementa l'espressione delle procitochine e quindi aumenta i mediatori infiammatori sia a livello dell'mRNA che delle proteine. L'infiammazione indotta dai radicali liberi è quindi un altro possibile collegamento tra stress ossidativo e resistenza all'insulina (96-98).

5. Disfunzione mitocondriale sistemica

Nonostante i meccanismi sottostanti siano poco chiari, è stato mostrato che la disfunzione mitocondriale, in cui lo stress ossidativo ha un ruolo chiave nella maggior parte dei casi, è coinvolta nella fisiopatologia di insulino-resistenza e DM. L'aumento dei radicali infatti compromette la funzione di questi organelli attraverso una serie di meccanismi come:

- l'alterazione del normale funzionamento della catena respiratoria mitocondriale (MRC)

- l'alterazione della differenza di potenziale a livello della membrana mitocondriale interna
- la riduzione della capacità respiratoria
- la diminuzione dell'integrità delle membrane dei mitocondri
- l'aumento della perdita di protoni nella MRC.

Questi processi possono avvenire localmente nelle isole pancreatiche e/o sistemicamente in adipociti e muscoli.

La disfunzione mitocondriale inoltre riduce notevolmente la capacità cellulare di produrre l'ATP e altera l'assorbimento di glucosio indotto dall'insulina negli adipociti e nelle cellule muscolari. In queste condizioni le cellule non sono in grado di assorbire il glucosio circolatorio in risposta all'insulina con conseguente resistenza all'ormone.

Infine lo stress ossidativo può compromettere la normale funzione mitocondriale aumentando l'ossidazione degli acidi grassi mitocondriali e la produzione di DAG (diacilglicerolo), che di conseguenza attiva maggiormente la serina/ treonina chinasi che portano ad una ISP compromessa (99-100).

L'iperglicemia a sua volta promuove la produzione e l'accumulo di ROS attraverso molteplici vie metaboliche che di seguito sono illustrate (101-102)

(Fig. 8).

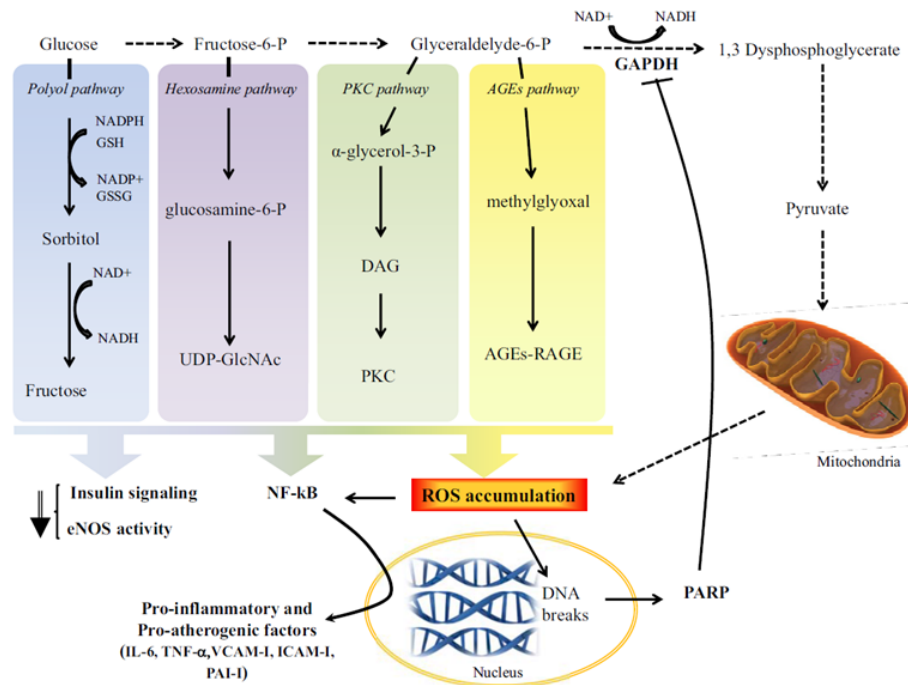


Figura 8 Le vie dei polioli, dell'esosamina, della protein chinasi C (PKC) e dei prodotti finali della glicazione avanzata (AGE) indotte dall'iperglicemia possono alterare la segnalazione dell'insulina e l'attività endoteliale di ossido nitrico sintasi (eNOS), promuovono l'espressione di fattori pro-infiammatori e pro-coagulanti e inducono l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS). L'iperglicemia promuove anche la disfunzione mitocondriale che contribuisce alla sintesi dei ROS. Lo stress ossidativo può indurre vie pro-infiammatorie e pro-coagulanti dipendenti dal fattore nucleare Kappa B (NF-kB) e causa anche danni al DNA. Tali danni possono attivare la poli (ADP-ribosio) polimerasi (PARP) che inibisce la gliceraleide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), aumentando così tutti gli intermedi glicolitici a monte di GAPDH e, quindi, la sintesi di polioli, esosamina, PKC e AGE.

1. L'aumento del flusso di glucosio attraverso la via dei Polioli

La via dei polioli è responsabile della riduzione NADPH-dipendente di un'ampia varietà di composti carbonilici intracellulari in polialcoli grazie all'azione dell'aldoso-reduttasi, un'ossido-reduttasi citosolica che ha una bassa affinità per il glucosio.

In condizioni normoglicemiche il glucosio segue il suo normale metabolismo (glicolisi) e soltanto una piccolissima parte viene metabolizzata attraverso questa via. Quando invece si instaura l'iperglicemia, notevoli quantità di glucosio vengono convertite attraverso questa via in sorbitolo riducendo la concentrazione intracellulare degli agenti antiossidanti NADPH-dipendenti e GSH e, di conseguenza, inducendo un'iperproduzione di anione superossido. L'accumulo di ROS inibisce la glucosio-6-fosfato deidrogenasi, un enzima necessario nel sistema antiossidante, amplificando lo stress ossidativo.

Il sorbitolo inoltre viene ossidato in fruttosio dalla sorbitolo deidrogenasi (SDH) che utilizza come cofattore NAD^+ riducendolo a NADH e aumentando così il rapporto intracellulare di NADH/NAD^+ , che porta all'inibizione della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH). Questo a sua volta aumenta la concentrazione di trioso fosfati (gliceraldeide-3-P e diidrossiacetone-3-P) e l'accumulo di queste molecole promuove la formazione dei precursori degli AGE (Advanced Glycation End products)

tramite autossidazione e l'attivazione della via PKC attraverso la sintesi de novo di DAG (103-104).

2. L'attivazione delle isoforme di PKC

La proteina chinasi C (PKC), di cui ne esistono 12 isoforme, appartiene alla famiglia delle serina/treonina chinasi che, fosforilando altre proteine, partecipa alle vie di segnalazione cellulare che coinvolgono il DAG, la fosfatidilserina e il calcio. In condizioni di iperglicemia, a causa dell'inibizione della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, si verifica un accumulo di gliceraldeide-3-fosfato che porta ad elevati livelli di diidrossiacetone-3-fosfato (DHA-3-P) che è un suo isomero. Il DHA-3-P viene successivamente ridotto a glicerolo-3-fosfato che a sua volta si combina con acidi grassi portando alla sintesi de novo del diacilglicerolo (DAG).

L'aumento del livello cellulare di DAG induce la via della PKC che, come detto in precedenza, è stimolata anche dall'interazione degli AGE con i loro recettori extracellulari (RAGE). L'aumentata attività della PKC stimola a sua volta l'attività pro-ossidante di enzimi come NADPH-ossidasi e lipoossigenasi, che vanno ad esacerbare l'ambiente ossidativo cellulare e contribuiscono al danno vascolare inibendo l'espressione dell'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS) nelle cellule endoteliali, la produzione di ossido

nitrico nelle cellule muscolari lisce, aumentando l'espressione di PAI-1 e l'attività del fattore nucleare NF-kB (105-106).

3. L'aumento della formazione di AGE

L'iperglicemia è la principale causa responsabile della formazione dei precursori degli AGEs: l'accumulo di glucosio dovuto all'iperglicemia porta infatti alla sua autoossidazione a gliosale, alla trasformazione del prodotto di Amadori in 3-desossiglucosone e alla frammentazione della gliceraldeide-3-fosfato e del diidrossiacetone fosfato in metilgliosale. Queste sostanze reagiscono principalmente con i gruppi amminici liberi di proteine intra ed extracellulari, ma anche con lipidi, acidi nucleici, carboidrati e alcuni componenti della matrice extra cellulare, formando gli AGE. Una volta formati, gli AGE possono legarsi a proteine intracellulari alterandone la funzione biologica, a componenti della matrice extracellulare modificando la loro interazione con gli altri componenti della stessa e a diversi recettori AGE (AGE-R 1, AGE-R 2, AGE-R 3 e RAGE). Tali legami promuovono la generazione di ROS e la conseguente attivazione del fattore di trascrizione NF-kB che modula l'espressione di vari geni associati ad infiammazione vascolare e aterosclerosi come IL-6, TNF- α , ICAM-1, VCAM-1, MCP-1 e PAI-1. Inoltre, gli AGE che sono presenti nella matrice extracellulare

diminuiscono la disponibilità dell'ossido nitrico e l'elasticità dell'endotelio riducendo la vasodilatazione (107-109).

4. Iperattivazione della via dell'Esosamina

La via dell'esosamina è coinvolta nel metabolismo del fruttosio-6-fosfato derivante dalla glicolisi. Il processo coinvolge l'attività della glucosamina-fruttosio aminotransferasi (GFAT) che metabolizza il fruttosio-6-fosfato in glucosamina-6-fosfato, un intermedio che viene successivamente convertito in uridina difosfato-N-Acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) dall'UDP-N-Acetilglucosamina sintasi. Quando i livelli di glucosio nel sangue sono normali, soltanto una piccola quantità di fruttosio-6-fosfato viene convogliata nella via dell'esosamina mentre, in condizioni iperglicemiche, tale quantità diviene elevata e porta di conseguenza ad un aumento sia di UDP-GlcNAc che dell'attività di O-Glucosamina-N-Acetil transferasi (OGT). Questo enzima utilizza l'UDP-GlcNAc per la glicosilazione post-traduzionale di diverse proteine e la sua iperattività è associata all'aumento dell'espressione di fattori di trascrizione come TGF- α e TGF- β che inibiscono la proliferazione delle cellule mesangiali e di quelli che a loro volta regolano l'espressione di geni proinfiammatori e procoagulanti, come PAI-I, ICAM-I, VCAM-1, implicati nella patogenesi delle complicazioni vascolari. L'iperattivazione

della via dell'inosammina può anche inibire l'attività di eNOS compromettendo la via IRS/PI3-K/Akt e promuove lo stress ossidativo aumentando la produzione di ROS (110-112).

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo studio è stato la valutazione del ruolo antiossidante e metabolico del sulforafano in un modello murino di cardiomiociti (H9C2) in coltura, preventivamente sottoposte ad una condizione di stress ossidativo e di resistenza insulinica mediante trattamento con palmitato.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Modello cellulare

Per questo studio sono state utilizzate le cellule H9c2, cardiomioblasti derivati dalla porzione ventricolare di cuore di ratto embrionale. Le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti (25000 cellule / pozzetto), coltivate a 37°C in un incubatore umidificato contenente il 5% di CO₂ utilizzando il terreno DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium). Al mezzo sono stati addizionati il 10% di siero fetale bovino, 100 µg/mL di penicillina e 100 µg/mL di streptomicina. Il mezzo è stato cambiato ogni due giorni fino a quando le cellule non hanno raggiunto la confluenza.

Successivamente i cardiomiociti sono stati trattati con acido palmitico 0.25 mM per 24 ore. Da precedenti studi (113) tale trattamento risulta infatti sufficiente per compromettere la respirazione mitocondriale e indurre insulino-resistenza, causando di conseguenza stress ossidativo e metabolico nelle cellule.

Infine sono state aggiunte due diverse concentrazioni di Sulforafani (2.5 µM e 5 µM) per altre 24 ore.

3.2 Saggio MTT

L'attività metabolica dei cardiomiociti è stata valutata mediante l'impiego del saggio colorimetrico MTT. In particolare esso misura l'attività metabolica delle cellule vitali basandosi sulla loro capacità di ridurre il sale di tetrazolio MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) a formazzano (**Fig 9**). Ciò è dovuto alla succinato deidrogenasi mitocondriale, attiva solo in cellule vive, che spezza l'anello tetrazolico dell'MTT (di colore giallo) formando dei cristalli insolubili di formazzano (di colore blu-violaceo). Questi cristalli vengono solubilizzati e il formazzano contenuto nella soluzione colorata risultante viene quantificato misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 570 nm.

Nello specifico, i campioni sono stati trasferiti in una piastra da 96 pozzetti, in ciascuno dei quali è stata aggiunta una soluzione MTT di 0.5 mg/mL in PBS. In seguito a 30 minuti di incubazione a 37°C, è stata impiegata una soluzione di solubilizzazione contenente DMSO per favorire la completa dissoluzione dei sali di formazzano formati durante la reazione. Infine la lettura spettrofotometrica è stata eseguita in microplate reader (Synergy HT, Biotek). I risultati sono stati espressi come percentuale dell'attività metabolica.

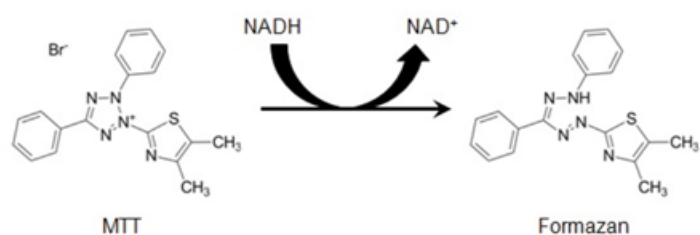


Figura 9 Riduzione del sale di tetrazolio MTT a formazzano

Al fine di valutare la citotossicità dei sulforafani, è stato dapprima eseguito il saggio dell'MTT in cellule incubate con 2.5-5-10 μM di sulforafani. Sulla base dei risultati ottenuti, per gli esperimenti successivi sono state scelte le concentrazioni di 2.5 μM e 5 μM del composto da aggiungere nelle cellule pre-incubate con 0.25 mM di acido palmitico.

3.3 Analisi citofluorimetriche

3.3.1 Vitalità cellulare

La conta e la vitalità cellulare sono state determinate mediante l'impiego della sonda citofluorimetrica denominata Guava ViaCount Reagent, abbinata alla DCFH-DA che verrà illustrata in seguito. Il Guava ViaCount Reagent è un colorante intercalante che si lega al DNA colorando soltanto le cellule

nucleate e permettendo quindi di distinguere quelle vitali, da quelle morte o apoptotiche ed escludendo dalla conta anche i debris (frammenti di cellule). Nello specifico sono stati miscelati 15 μL di sospensione cellulare, di ciascun campione, con 135 μL di Guava ViaCount Reagent diluito 4 volte con Phosphate Buffer Saline (PBS) e incubati per 5 minuti a temperatura ambiente. Successivamente all'incubazione è stata effettuata la lettura al citofluorimetro.

I risultati sono stati espressi come percentuale di vitalità cellulare.

3.3.2 Livelli di specie reattive dell'ossigeno

La produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è stata determinata attraverso l'utilizzo del citofluorimetro (Guava EasyCyteTM, Millipore) e di una sonda denominata Diclorofluoresceina Diacetato (DCFH-DA), una molecola non polare in grado di diffondere facilmente attraverso la membrana cellulare. Una volta all'interno della cellula, viene idrolizzata da un'esterasi che la trasforma in un derivato polare (DCFH) e ne determina l'accumulo intracellulare. La DCFH non è di per sé fluorescente ma lo diviene a seguito dell'ossidazione (DCF) da parte di specie ossidanti e quindi

emetterà una fluorescenza che sarà direttamente proporzionale ai livelli di specie reattive dell'ossigeno intracellulari (**Fig 10**).

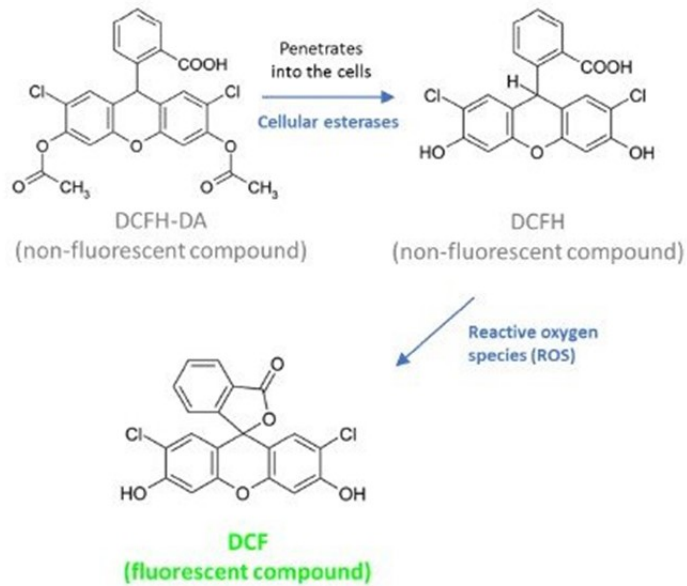


Figura 10 Attività esterasica e ossidazione della Diclorofluoresceina Diacetato da parte delle specie reattive

Il protocollo del saggio con la Diclorofluoresceina Diacetato prevede l'incubazione al buio di ciascun pozzetto in cui sono stati coltivati i cardiomiociti con 1 mL di una soluzione di DCFH-DA 10 μ M in PBS per 30 minuti a 37°C. In seguito a lavaggio con PBS, sono stati aggiunti 350 μ L di tripsina per favorire il distaccamento delle cellule dalla superficie della piastra e si è nuovamente incubato per 5 minuti a 37°C. Dopo aver neutralizzato la

tripsina con 1,2 mL di DMEM, le cellule sono state centrifugate, il pellet cellulare è stato risospeso in 500 µL di PBS ed è stata effettuata la lettura al citofluorimetro (i picchi di eccitazione e di emissione sono rispettivamente 492-495 nm e 517-527 nm).

I dati sono stati analizzati settando i campioni di controllo con una popolazione di cellule ad elevato contenuto di ROS pari a circa il 15%.

I risultati sono stati espressi come percentuale di cellule ad alto contenuto di ROS.

3.3.3 Livelli mitocondriali di anione superossido

I livelli mitocondriali di anione superossido sono stati valutati al citofluorimetro mediante l'impiego di una sonda denominata MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide indicator altamente selettiva e specifica. Il MitoSOX consente infatti di quantificare soltanto i livelli di anione superossido e solo nei mitocondri di cellule vive. E' in grado di attraversare la membrana plasmatica delle cellule vive e viene accumulata all'interno dei mitocondri dove, in presenza di anione superossido, si ossida diventando di colore rosso (**Fig. 11**). Non viene ossidata né da altre Specie Reattive

dell'Ossigeno (ROS) e né da quelle dell'azoto (RNS) e la sua ossidazione è prevenuta solo dalla presenza della superossido dismutasi (SOD).

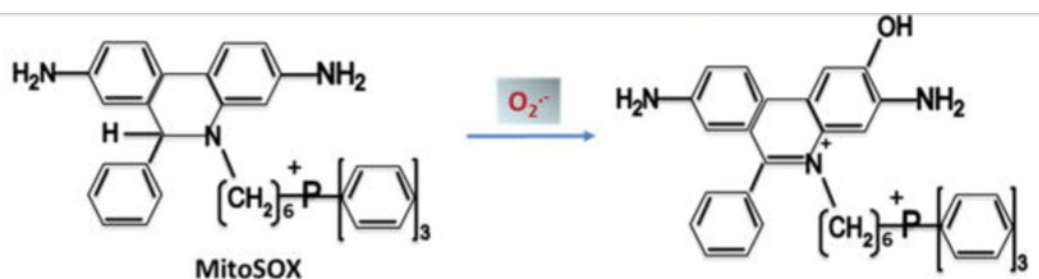


Figura 11 Ossidazione del MitoSOX ad opera dell'anione superossido

Il protocollo del saggio MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide indicator prevede l'incubazione al buio di ciascun pozzetto in cui sono stati coltivati i cardiomiociti con 1 mL di una soluzione MitoSOX Red 5 μ M in PBS per 10 minuti a 37°C. In seguito a lavaggio con PBS, sono stati aggiunti 350 μ L di tripsina per favorire il distaccamento delle cellule dalla superficie della piastra e si è nuovamente incubato per 5 minuti a 37°C. Dopo aver neutralizzato la tripsina con 1,2 mL di DMEM, le cellule sono state centrifugate, il pellet cellulare è stato risospeso in 300 μ L di PBS ed è stata effettuata la lettura al citofluorimetro (i picchi di eccitazione e di emissione sono rispettivamente 510 nm e 580 nm).

I dati sono stati analizzati settando i campioni di controllo con una popolazione di cellule con elevato contenuto di anione superossido pari a circa il 15%.

I risultati sono stati espressi come percentuale di cellule ad alto contenuto di anione superossido.

3.3.4 Depolarizzazione di membrana mitocondriale

La valutazione della depolarizzazione della membrana mitocondriale è stata effettuata attraverso l'utilizzo della sonda citofluorimetrica MitoProbe DilC1(5) Assay kit (**Fig. 12**). È una sonda cationica, in grado di penetrare nel citosol delle cellule eucariotiche accumulandosi all'interno di esse in risposta ad un cambiamento del potenziale di membrana mitocondriale. L'intensità della colorazione della sonda tende a diminuire quando il potenziale di membrana mitocondriale viene alterato.

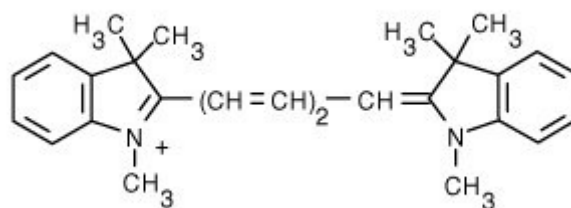


Figura 12 Struttura chimica del MitoProbe DilC1(5)

Il protocollo del saggio MitoProbe DilC1(5) kit prevede l'incubazione al buio di ciascun pozzetto in cui sono stati coltivati i cardiomiociti con 1 mL di MitoProbe 40 nM per 15 minuti a 37°C. In seguito a lavaggio con PBS, sono stati aggiunti 350 µL di tripsina per favorire il distacco delle cellule dalla superficie della piastra e si è nuovamente incubato per 5 minuti a 37°C. Dopo aver neutralizzato la tripsina con 1,2 mL di DMEM, le cellule sono state centrifugate, il pellet cellulare è stato risospeso in 300 µL di PBS ed è stata effettuata la lettura al citofluorimetro (i picchi di eccitazione e di emissione sono rispettivamente 638 nm e 658 nm).

I dati sono stati analizzati settando i campioni di controllo con una popolazione di cellule con membrana mitocondriale depolarizzata di circa il 15%.

I risultati sono stati espressi come percentuale di cellule con membrana mitocondriale depolarizzata.

3.3.5 Uptake di glucosio

Per la misurazione dell'assorbimento diretto del glucosio da parte delle cellule H9c2 è stata utilizzata la sonda citofluorimetrica 2-NBDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose) (**Fig.13**). È un analogo fluorescente del D-glucosio che viene trasportato all'interno della cellula dagli stessi trasportati sfruttati dal glucosio (GLUT). Le cellule che hanno assorbito il composto emetteranno una fluorescenza di colore verde la cui intensità sarà proporzionale alla quantità di analogo internalizzata.

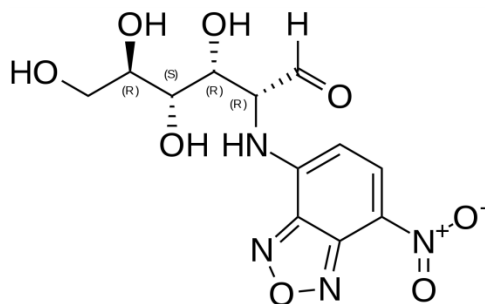


Figura 13 Struttura chimica del 2-NBDG

Il protocollo del saggio 2-NBDG prevede la rimozione del mezzo di trattamento e l'incubazione delle cellule con 10 μ M di 2-NBDG in terreni senza siero per 30 minuti a 37 ° C in 5% di CO₂. In seguito a lavaggio con

PBS, sono stati aggiunti 350 μ L di tripsina per favorire il distacco delle cellule dalla superficie della piastra e si è nuovamente incubato per 5 minuti a 37°C. Dopo aver neutralizzato la tripsina con 1,2 mL di DMEM, le cellule sono state centrifugate, il pellet cellulare è stato risospeso in 300 μ L di PBS ed è stata effettuata la lettura al citofluorimetro (i picchi di eccitazione e assorbimento sono rispettivamente a 465 nm e 540 nm).

I risultati sono stati espressi come variazione percentuale dell'uptake di glucosio.

3.4 Analisi statistica

Gli esperimenti sopra descritti sono stati tutti eseguiti in triplicato. I dati raccolti sono stati analizzati mediante Test T di student per dati non appaiati e considerati significativamente diversi (*) per $p \leq 0.05$ e altamente significativi per (**) $p \leq 0.01$. I risultati sono stati espressi come media \pm deviazione standard e rappresentati graficamente come istogrammi.

4. RISULTATI

4.1 Attività metabolica

Al fine di scegliere le concentrazioni di sulforafani da utilizzare nel co-trattamento dei cardiomiciti H9c2 con palmitato, è stata valutata la citotossicità di tre diverse concentrazioni (2.5, 5 e 10 μM) di sulforafani mediante il saggio MTT (**Fig 14**).

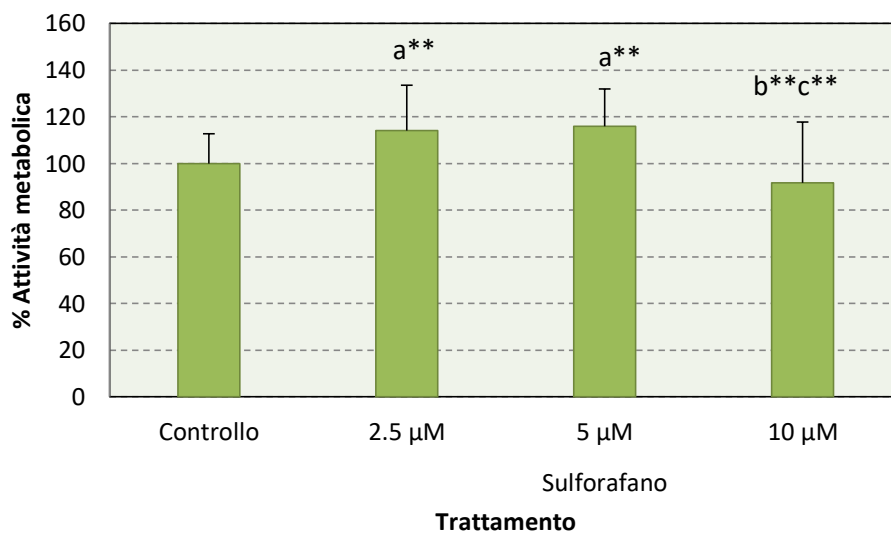


Figura 14 Percentuale dell'attività metabolica di H9c2 di controllo ed in seguito a trattamento con 2.5 , 5 e 10 μM di sulforafani. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ rispetto al controllo (a), a 2.5 μM (b) e a 5 μM (c) di sulforafano

L'attività metabolica delle cellule trattate con 2.5 e 5 μM ($114.2 \pm 19,4 \%$; $116 \pm 15.8 \%$) di sulforafani aumenta in modo altamente significativo

($p=0.00$) rispetto al controllo ($100 \pm 12.8 \%$), così come risulta significativa la diminuzione dell'attività metabolica nelle cellule incubate con $10 \mu\text{M}$ ($91.7 \pm 26.2 \%$) del composto rispetto alle precedenti.

Ciò ha determinato la scelta di impiegare le concentrazioni di 2.5 e $5 \mu\text{M}$ di sulforafano da aggiungere nelle cellule incubate con 0.25 mM di palmitato.

L'attività metabolica dei cardiomiociti H9c2 in seguito a trattamento con palmitato da solo o in associazione ai sulfurafani è stata valutata mediante l'impiego del saggio colorimetrico MTT (**Fig 15**).

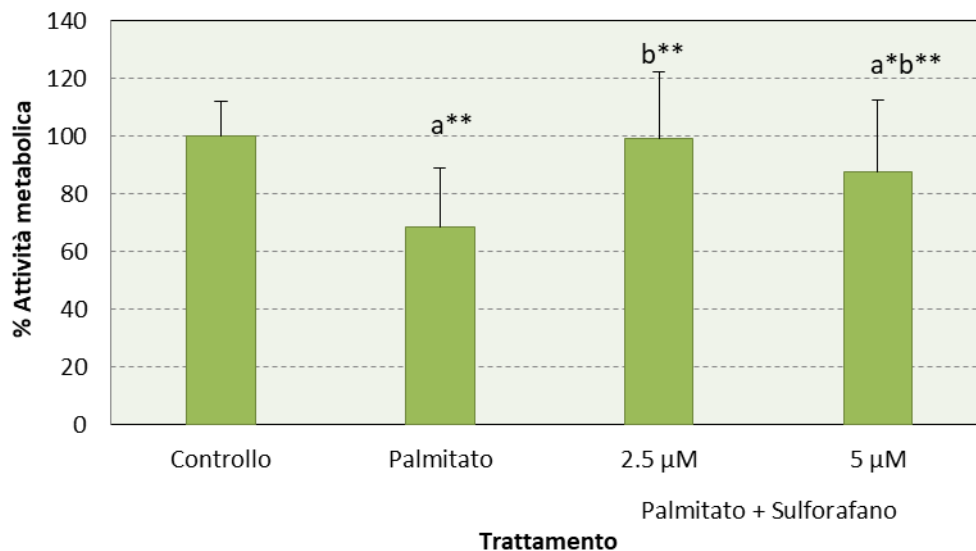


Figura 15 Percentuale dell'attività metabolica di H9c2 di controllo ed in seguito a trattamento con 0.25 mM di acido palmitico da solo o in associazione a 2.5 e $5 \mu\text{M}$ di sulfurafani. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ rispetto al controllo (a) e al palmitato (b)

L'attività metabolica delle cellule incubate con il palmitato (0.25 mM) (69 ± 20 %) diminuisce in maniera altamente significativa rispetto al controllo (100 ± 12 %).

L'aggiunta di sulforafano è in grado di contrastare l'effetto del palmitato significativamente, sebbene l'effetto non sia proporzionale alla concentrazione impiegata; infatti alla concentrazione più bassa di sulforafani corrisponde un'attività metabolica pari al 99 ± 23 %, mentre a 5 μ M della stessa molecola viene registrata un'attività di 88 ± 25 %. Nonostante quest'ultima concentrazione di sulforafano sia in grado di contrastare efficacemente l'effetto tossico del palmitato, l'attività metabolica registrata è rimasta significativamente minore rispetto alle cellule di controllo ($p=0.03$).

4.2 Vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata determinata tramite l'utilizzo della sonda citofluorimetrica Guava ViaCount Reagent, in grado di discriminare le cellule vitali da quelle apoptotiche e morte. La **figura 16** mostra la vitalità dei cardiomiociti in seguito ad incubazione con palmitato e sulforafani per 72 ore a 37°C

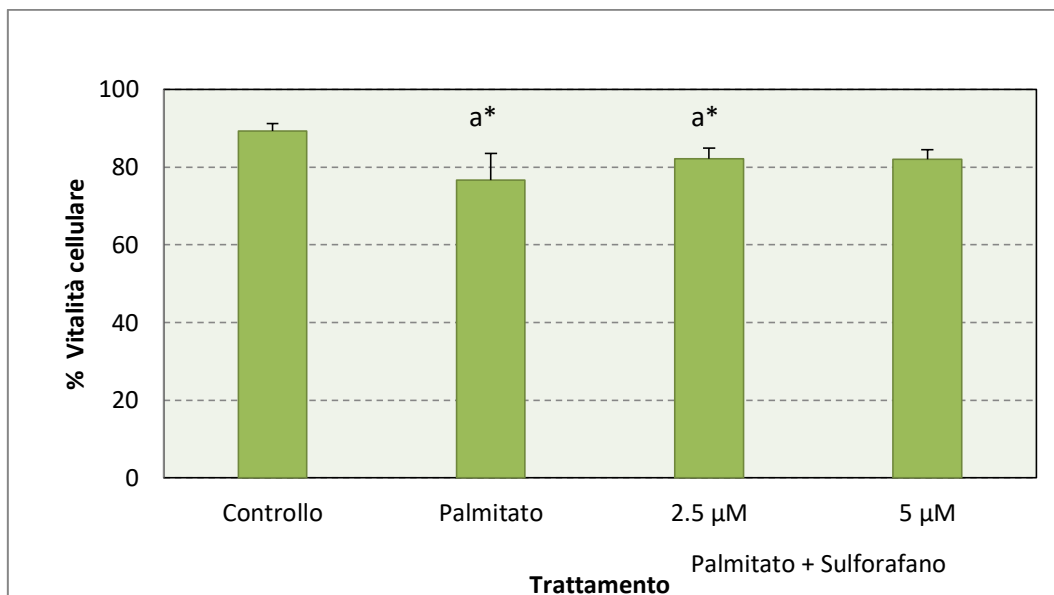


Figura 16 Percentuale della vitalità di H9c2 di controllo ed in seguito a trattamento con 0.25 mM di acido palmitico da solo o in associazione a 2.5 e 5 µM di sulforafani. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ rispetto al controllo (a)

Il trattamento con palmitato ha determinato una diminuzione significativa della vitalità cellulare rispetto al controllo ($89.3 \pm 7.0\%$ vs $76.6 \pm 11.7\%$, $p=0.013$).

Nessuna delle due concentrazioni di sulforafani studiate sono state in grado di preservare la vitalità cellulare.

4.3 Livelli di specie reattive dell'ossigeno

I livelli di ROS sono stati determinati mediante la sonda citofluorimetrica DCFH-DA, la cui emissione di fluorescenza è tanto maggiore quanto più elevata è la quantità di specie reattive dell'ossigeno presenti all'interno della cellula.

La **figura 17** mostra la produzione di ROS nei cardiomiociti trattati con palmitato e sulforafani.

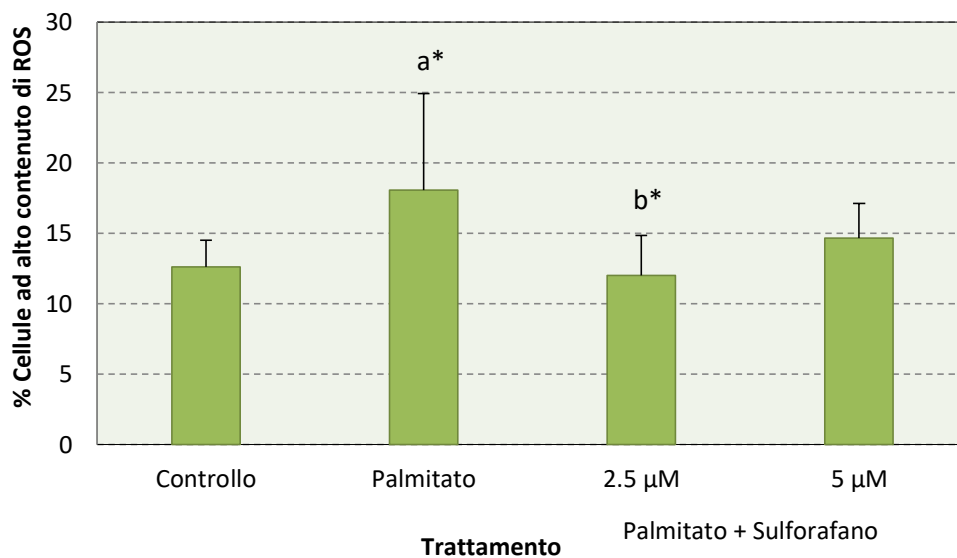


Figura 17 Percentuale di H9c2 ad alto contenuto di ROS di controllo ed in seguito a trattamento con 0.25 mM di acido palmitico da solo o in associazione a 2.5 e 5 µM di sulforafani. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ rispetto al controllo (a) e al palmitato (b)

Dalla figura si evince come il trattamento con il palmitato abbia favorito uno sbilanciamento dello stato redox della cellula, aumentando significativamente i livelli citosolici di ROS ($18.1 \pm 6.9 \%$) rispetto al controllo ($12.6 \pm 1.9 \%$) ($p=0.02$).

Il Sulforafano, in tale condizione, risulta protettivo per le cellule contrastando la produzione di specie reattive dell'ossigeno indotta dall'acido palmitico, in maniera significativa alla concentrazione di $2.5 \mu\text{M}$ ($12.0 \pm 2.9 \%$).

4.4 Livelli mitocondriali di anione superossido

Attraverso l'utilizzo della sonda MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide indicator è stato possibile quantificare le cellule con un alto contenuto di anione superossido, il principale ROS prodotto nei mitocondri. In **figura18** è riportata la produzione di anione superossido mitocondriale nei cardiomiociti trattati con acido palmitico e sulforafani.

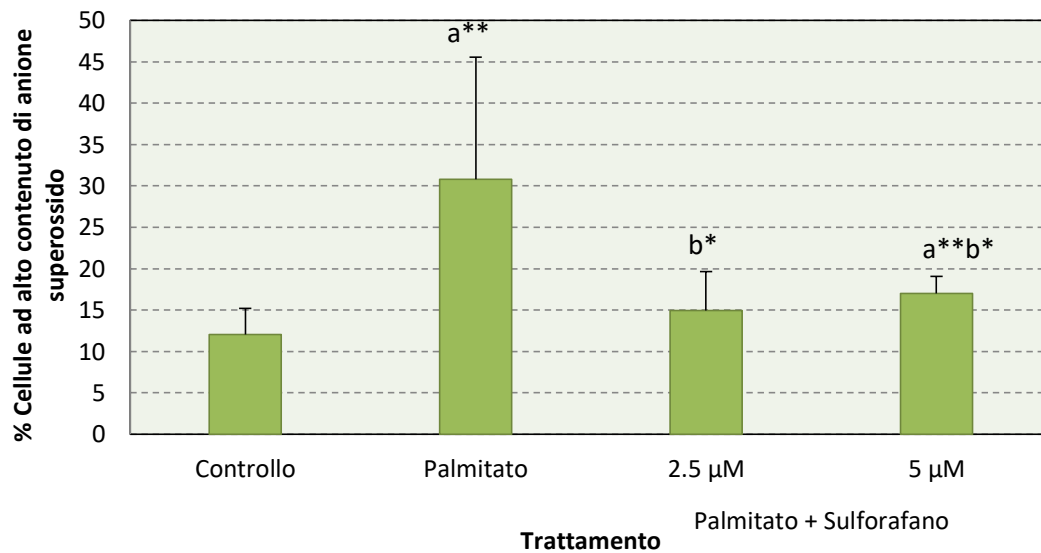


Figura 18 Percentuale di H9c2 ad alto contenuto di anione superossido nel controllo ed in seguito a trattamento con 0.25 mM di acido palmitico da solo o in associazione a 2.5 e 5 µM di sulforafani. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ rispetto al controllo (a) e al palmitato (b)

Il palmitato induce un incremento altamente significativo della produzione di anione superossido a livello mitocondriale. Si passa infatti da una percentuale pari a 12.0 ± 3.1 % delle cellule di controllo a 30.8 ± 14.8 % di quelle trattate con palmitato ($p=0.00$).

Il trattamento con sulforafani è risultato essere protettivo nei confronti dello stress ossidativo indotto da palmitato. Si nota infatti una significativa diminuzione dei livelli mitocondriali di anione superossido per entrambe le concentrazioni di sulforafano impiegate (14.9 ± 3.9 % ; 17.0 ± 2.5 %), rispetto alle cellule stressate con il palmitato ($p=0.03$; $p=0.04$). Tuttavia le cellule

trattate con 5 μM di sulforafano presentano una produzione di anione superossido significativamente più alta rispetto al controllo ($p=0.01$) anche se entrambe le concentrazioni non dimostrano una differenza significativa tra loro.

4.5 Depolarizzazione della membrana mitocondriale

Mediante l'analisi citofluorimetrica delle cellule con la sonda MitoProbe DilC1(5) è stato possibile determinare la depolarizzazione della membrana mitocondriale. La **figura19** mostra la depolarizzazione della membrana mitocondriale in seguito ad incubazione delle cellule con palmitato e sulforafani.

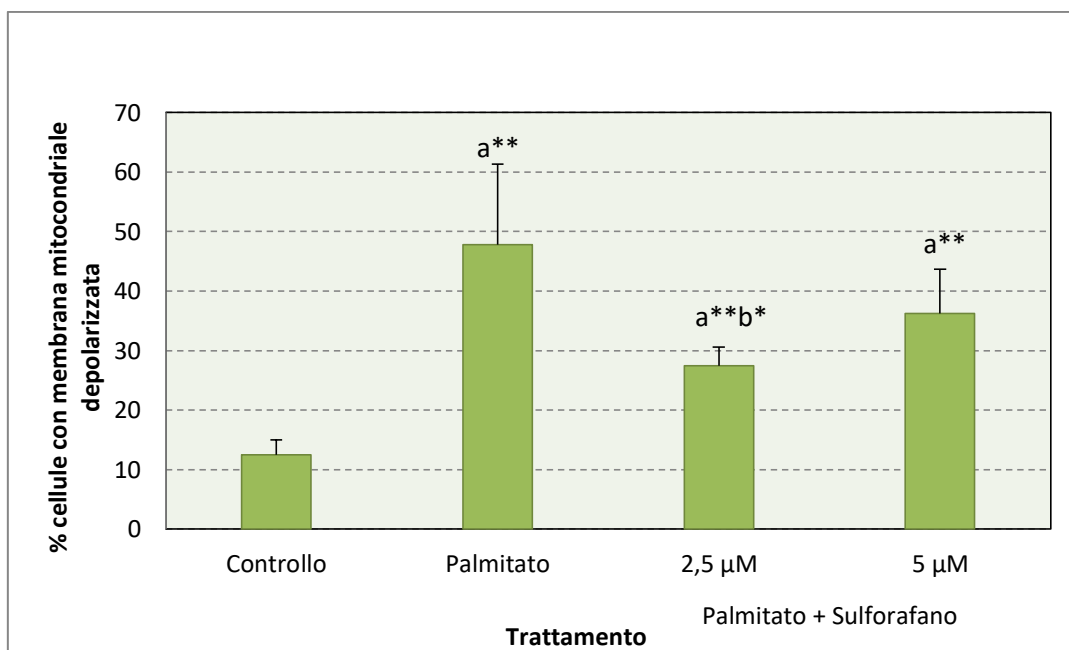


Figura 19 Percentuale di H9c2 con membrana mitocondriale depolarizzata nel controllo ed in seguito a trattamento con 0.25 mM di acido palmitico da solo o in associazione a 2.5 e 5 μ M di sulforafani. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ rispetto al controllo (a) e al palmitato (b)

Il trattamento con il palmitato ha provocato un aumento altamente significativo della percentuale di cellule con membrana mitocondriale depolarizzata, a dimostrazione del forte stress creato dall'acido palmitico ($47.8 \pm 13.6 \%$) rispetto al controllo ($12.5 \pm 2.5 \%$; $p=0.00$).

L'aggiunta dei sulforafani ha avuto un effetto protettivo sui mitocondri determinando una diminuzione delle cellule con membrana mitocondriale depolarizzata che è risultata essere significativa alla concentrazione 2.5 μ M ($27.5 \pm 3.2 \%$; $p=0.03$).

4.6 Uptake di glucosio

L'assorbimento del glucosio da parte delle cellule H9c2 è stato valutato citofluorimetricamente mediante misure di intensità di fluorescenza della sonda 2-NBDG incorporata nei cardiomiociti.

L'intensità di fluorescenza risulta proporzionale alla quantità di glucosio assorbita dalle cellule. In **figura 20** è riportato la variazione percentuale

dell'assorbimento di glucosio in cardiomiociti trattati con palmitato e sulforafani.

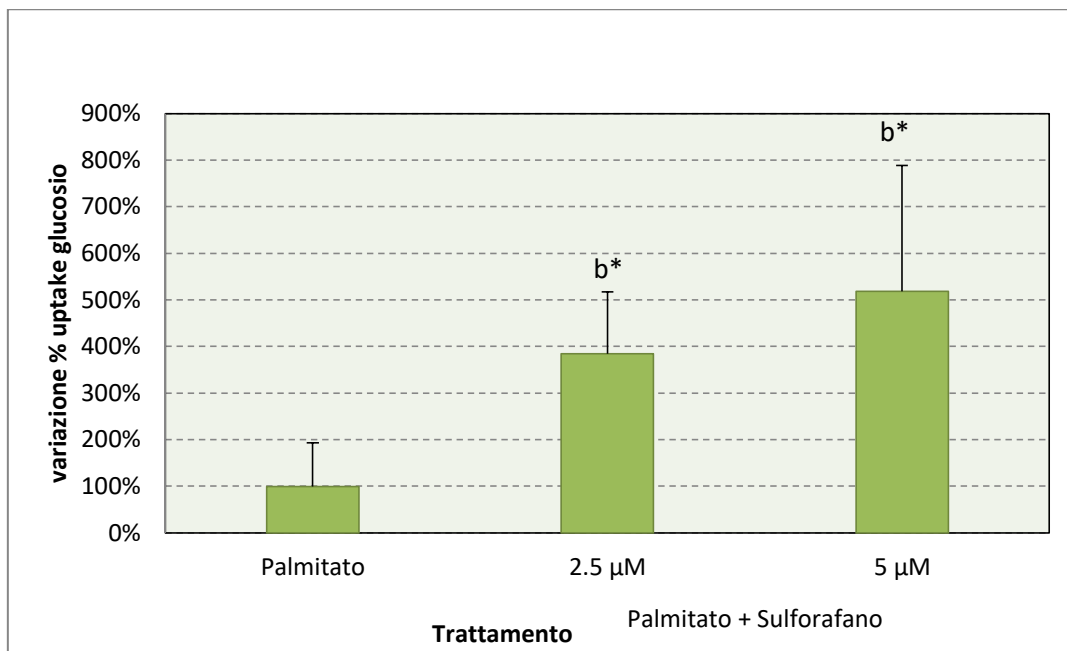


Figura 20 Variazione percentuale dell'uptake di glucosio di H9c2 nel controllo ed in seguito a trattamento con 0.25 mM di acido palmitico da solo o in associazione a 2.5 e 5 µM di sulforafani. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ rispetto al palmitato (b)

Il trattamento con i sulforafani ha favorito l'internalizzazione del glucosio nei cardiomiociti trattati con acido palmitico in maniera dose dipendente. Nello specifico l'incubazione con 2.5 µM di queste molecole bioattive hanno determinato un aumento dell'uptake di glucosio del 385 ± 132 %, mentre

l'impiego di una concentrazione doppia ha favorito un incremento pari a 518
 ± 270 % rispetto alle cellule trattate solo con palmitato.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'utilizzo di alimenti funzionali, e dei componenti nutraceutici contenuti al loro interno, come ad esempio i sulforafani, rappresenta un nuovo approccio per migliorare la gestione di alcune patologie tra cui il diabete e per prevenirne le sue complicanze a lungo termine.

Il diabete mellito di tipo 2 (DM2) è un grave disordine endocrino e metabolico la cui prevalenza è in continuo aumento in tutto il mondo, dove più di 400 milioni di persone ne sono affette e un numero ancora maggiore si trova in uno stato prediabetico.

Attualmente la metformina rappresenta la terapia di prima linea per tenere sotto controllo la glicemia, riducendo nello specifico la produzione epatica di glucosio attraverso meccanismi dipendenti e indipendenti dalla AMP chinasi. Non tutti i pazienti affetti da DM2 possono però usufruire di tale farmaco sia per una funzionalità renale compromessa, caratterizzata da una velocità di filtrazione glomerulare ridotta, sia per lo sviluppo, a seguito del trattamento, di una serie di effetti collaterali quali nausea, vomito, diarrea e dolore addominale.

Tra i vari composti studiati per controllare la glicemia nei soggetti prediabetici e diabetici, negli ultimi anni la comunità scientifica ha identificato un nuovo ruolo dei sulforafani in questo campo. Infatti, sebbene un numero sempre maggiore di evidenze suggeriscono la capacità di questi composti di agire come agenti antitumorali (119), solo recentemente sono stati riscontrati effetti benefici significativi per il trattamento del diabete e delle sue complicanze (114).

È noto da tempo che un aumento dello stress ossidativo nei soggetti con patologia diabetica rappresenta un fattore da limitare. In questo contesto il sulforafano, essendo un potente modulatore di diverse vie trascrizionali redox sensibili, può rappresentare un valido supporto per migliorare lo sbilanciamento ossidativo e la resistenza all'insulina caratteristico di questa patologia. (115)

Lo scopo di questo lavoro è stato infatti quello di valutare le proprietà antiossidanti e antidiabetiche di questo composto bioattivo su un modello murino di cardiomiociti (H9c2) in coltura, a seguito di trattamento con palmitato.

L'acido palmitico è in grado, come confermato dallo studio condotto da Phiwayinkosi V Dlodla et al. (2020), di indurre stress ossidativo e metabolico

nelle cellule, grazie alla sua capacità di causare insulino-resistenza e compromettere la respirazione mitocondriale.

In accordo con lo studio sopra citato, i nostri risultati hanno evidenziato che il palmitato ha determinato un aumento sia della produzione di ROS citosolico che di anione superossido mitocondriale. Inoltre nei cardiomiociti incubati con 0.25 mM di palmitato è stata riscontrata anche una depolarizzazione della membrana mitocondriale confermando un suo coinvolgimento nell'attività mitocondriale.

Il sulforafano, in tali condizioni, è risultato protettivo per le cellule nei confronti dello stress ossidativo, inducendo una diminuzione significativa sia della percentuale di cellule ad elevato contenuto di ROS che di anione superossido.

Tale effetto è stato riscontrato utilizzando entrambe le concentrazioni di sulforafano, anche se l'azione antiossidante della 2.5 μ M è risultata essere più significativa.

Questi dati confermano, come già osservato da Zahra Bahadoran et al. (2012), che il Sulforafano agisce da antiossidante indiretto, preservando le cellule dallo stress ossidativo. Questo effetto è dovuto all'attivazione, da parte dell'isotiocianato, del fattore di trascrizione Nrf2 responsabile

dell'espressione di numerosi enzimi coinvolti nel mantenimento dell'equilibrio ossido-riduttivo cellulare, neutralizzando le specie reattive.

Nel nostro studio, inoltre, si evince che il sulforafano ha un ruolo protettivo dell'attività mitocondriale compromessa dal palmitato, confermando lo studio di Bo Li et al. (2015), in cui è stato dimostrato che l'isotiocianato è in grado di contrastare lo stress ossidativo mitocondriale; pertanto esso è in grado di preservare la funzionalità e prevenire il rilascio di fattori proapoptotici in seguito alla dissipazione del potenziale della membrana mitocondriale.

Oltre all'attività antiossidante, in questo studio è stata studiata anche la capacità del Sulforafano di influenzare l'assorbimento di glucosio da parte dei cardiomiociti. L'isotiocianato è in grado di favorire l'internalizzazione da parte delle cellule determinando un aumento dell'uptake di glucosio che risulta proporzionale alla concentrazione di molecola bioattiva utilizzata.

Ciò può essere potenzialmente dovuto al fatto che, come dimostrato nello studio di Bijal Patel et al. (2018) seppur in una linea cellulare differente ovvero adipociti bianchi maturi (3T3-L1), il sulforafano, grazie all'induzione di Nrf2, è in grado di attivare il recettore nucleare PPAR- γ (recettore γ attivato dai proliferatori perossisomiali) il cui promotore ha una sequenza consenso ARE. Una volta attivato, PPAR- γ forma un eterodimero con il

recettore X per i retinoidi (RXR) costituendo un complesso che si lega a specifiche sequenze di DNA ed induce la trascrizione di diverse proteine tra cui il trasportatore del glucosio GLUT4. Quindi il sulforafano può aumentare l'espressione e migliorare la traslocazione sulla membrana cellulare di questo trasportatore favorendo l'assorbimento del glucosio.

In conclusione, il presente studio ha messo in evidenza come il Sulforafano sia in grado di contrastare in modo efficace lo stress ossidativo indotto da palmitato, riducendo i livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno.

Inoltre, abbiamo evidenziato la sua azione di preservare la funzionalità mitocondriale contrastandone la depolarizzazione e la produzione di anione superossido promossi dal palmitato.

Infine risulta evidente che il Sulforafano abbia anche ruolo protettivo rilevante nei confronti dello stress metabolico poiché ha la capacità di indurre un significativo aumento dell'assorbimento di glucosio da parte delle cellule.

Questi effetti possono partecipare alla prevenzione dell'insorgenza della resistenza all'insulina e delle complicazioni a lungo termine del diabete, rendendo il sulforafano un possibile efficace supplemento della terapia per i pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2.

6. BIBLIOGRAFIA

1. **H. Sies**, On the History of Oxidative Stress: Concept and Some Aspects of Current Development, *Current Opinion in Toxicology* (2018), doi: 10.1016/j.cotox.2018.01.002.
2. **Lushchak VI**. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014 Dec 5;224:164-75. doi: 10.1016/j.cbi.2014.10.016. Epub 2014 Oct 28. PMID: 25452175.
3. **Sies H**. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015;4:180-3. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002. Epub 2015 Jan 3. PMID: 25588755; PMCID: PMC4309861.
4. **Jones DP**. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2006 Sep-Oct;8(9-10):1865-79. doi: 10.1089/ars.2006.8.1865. PMID: 16987039.
5. **Tan, B. L., Norhaizan, M. E., and Liew, W.-P.-P.** (2018). Nutrients and oxidative stress: friend or foe? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018, article ID 9719584, 24 pages. doi: 10.1155/2018/9719584
6. **Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N**. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010;4(8):118-126. doi:10.4103/0973-7847.70902
7. **Alkadi H**. A Review on Free Radicals and Antioxidants. *Infect Disord Drug Targets.* 2020;20(1):16-26. doi: 10.2174/1871526518666180628124323. PMID: 29952268.
8. **Di Meo S, Venditti P**. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxid Med Cell Longev.* 2020 Apr

23;2020:9829176. doi: 10.1155/2020/9829176. PMID: 32411336; PMCID: PMC7201853.

9. **Bayr, Hülya MD** Reactive oxygen species, *Critical Care Medicine*: December 2005 - Volume 33 - Issue 12 - p S498-S501 doi: 10.1097/01.CCM.0000186787.64500.12
10. **Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH.** Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly.* 2012 Aug 17;142:w13659. doi: 10.4414/smw.2012.13659. PMID: 22903797.
11. **Galli F, Piroddi M, Annetti C, Aisa C, Floridi E, Floridi A.** Oxidative stress and reactive oxygen species. *Contrib Nephrol.* 2005;149:240-260. doi: 10.1159/000085686. PMID: 15876848.
12. **Liochev SI.** Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic Biol Med.* 2013 Jul;60:1-4. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.011. Epub 2013 Feb 19. PMID: 23434764.
13. **Li R, Jia Z, Trush MA.** Defining ROS in Biology and Medicine. *React Oxyg Species (Apex).* 2016;1(1):9-21. doi: 10.20455/ros.2016.803. PMID: 29707643; PMCID: PMC5921829.
14. **Patel, R.; Rinker, L.; Peng, J.; Chilian, W.M.** Reactive Oxygen Species: The Good and the Bad, *Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells*, Cristiana Filip and Elena Albu; IntechOpen: London, UK, 2017
15. **Lambert AJ, Brand MD.** Reactive oxygen species production by mitochondria. *Methods Mol Biol.* 2009;554:165-81. doi: 10.1007/978-1-59745-521-3_11. PMID: 19513674.
16. **Aziz, M.A.; Diab, A.S.; Mohammed, A.A.** Antioxidant Categories and Mode of Action. In *Antioxidants*; IntechOpen: London, UK, 201

17. **Lü JM, Lin PH, Yao Q , Chen C.** Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2009;14(4):840-860
18. **Kumar S.** Free radicals and antioxidants: Human and food system. *Advanced in Applied Science Research.* 2011;2(1):129-135
19. **Kurutas EB.** The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: Current state. *Kurutas Nutrition Journal.* 2016;15:71-93
20. **Shebis Y et al.** Natural antioxidants: Function and sources. *Food and Nutrition Sciences.* 2013;4:643-649
21. **Nimse SB, Pal D.** Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Royal Society of Chemistry Advances.* 2015;5:27986-28006
22. **Krishnamurthy P, Wadhvani A.** Antioxidant enzymes and human health. In: El-Missiry MA, editor. *Antioxidant Enzyme.* Croatia: In Tech; 2012. pp. 3-18. DOI:10.3109/0886022X.2015.1103654
23. **Ighodaro OM, Akinloye OA.** First line defence antioxidants superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine.* 2017;54(4):287-293. [https:// doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001](https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001)
24. **MacMillan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA.** Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry.* 1998;37:1613-1622

25. **Fukai T.** Extracellular SOD and aged blood vessels. *American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology*. 2009;297(1):H10-H12
26. **Góth L, Rass P, Páy A.** Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnostics*. 2004;8:141-149
27. **JB DH et al.** Lack of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase-1 (GPx1) does not increase atherosclerosis in C57BL/J6 mice fed a high fat diet. *Journal of Lipid Research*. 2006;47(6):1157-1167
28. **Moon JK, Shibamoto T.** Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(5):1655-1666
29. **Arredondo ML.** Relationship between vitamin intake and total antioxidant capacity in elderly adults. *Universitas Scientiarum*. 2016;21(2):167-177
30. **Herrera E, Barbas C.** Vitamin E: Action, metabolism and perspective. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2001;57:43-56
31. **Rahman K.** Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*. 2007;2(2):219-236
32. **Homma T, Fujii J.** Application of glutathione as anti-oxidative and antiaging drugs. *Current Drug Metabolism*. 2015;16(7):560-571
33. **Dinkova-Kostova AT, Talalay P.** Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res*. 2008 Jun;52 Suppl 1:S128-38. doi: 10.1002/mnfr.200700195. PMID: 18327872.
34. **Jung KA, Kwak MK.** The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules*. 2010 Oct

- 20;15(10):7266-91. doi: 10.3390/molecules15107266. PMID: 20966874; PMCID: PMC6259123.
35. **Vanduchova A, Anzenbacher P, Anzenbacherova E.** Isothiocyanate from Broccoli, Sulforaphane, and Its Properties. *J Med Food*. 2019 Feb;22(2):121-126. doi: 10.1089/jmf.2018.0024. Epub 2018 Oct 27. PMID: 30372361.
36. **M.A. Farag, A.A. Motaal** Sulforaphane composition, cytotoxic and antioxidant activity of crucifer vegetables *J. Adv. Res.*, 1 (2010), pp. 65-70
37. **Houghton CA, Fassett RG, Coombes JS.** Sulforaphane and Other Nutrigenomic Nrf2 Activators: Can the Clinician's Expectation Be Matched by the Reality?. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:7857186. doi:10.1155/2016/7857186
38. **Fahey JW, Holtzclaw WD, Wehage SL, Wade KL, Stephenson KK, Talalay P.** Sulforaphane Bioavailability from Glucoraphanin-Rich Broccoli: Control by Active Endogenous Myrosinase. *PLoS One*. 2015;10(11):e0140963. Published 2015 Nov 2. doi:10.1371/journal.pone.0140963
39. **Totušek, J. & Triska, Jan & Lefnerova, Danuse & Strohalm, Jan & Vrchotova, Nadezda & Zendulka, Ondrej & Průchová, J. & Chaloupkova, Jana & Novotna, Pavla & Houška, Milan.** (2011). Contents of Sulforaphane and Total Isothiocyanates, Antimutagenic Activity, and Inhibition of Clastogenicity in Pulp Juices from Cruciferous Plants. *Czech Journal of Food Sciences*. 29. 548-556. 10.17221/394/2010-CJFS.
40. **Tortorella SM, Royce SG, Licciardi PV, Karagiannis TC.** Dietary Sulforaphane in Cancer Chemoprevention: The Role of Epigenetic Regulation and HDAC Inhibition. *Antioxid Redox Signal*. 2015;22(16):1382-1424. doi:10.1089/ars.2014.6097

41. **Jeffery, Elizabeth & Brown, Allan & Kurilich, Anne & Keck, Anna & Matusheski, Nathan & Klein, Barbara & Juvik, John.** (2003). Variation in content of bioactive compounds in broccoli. *Journal of Food Composition and Analysis*. 16. 323-330. 10.1016/S0889-1575(03)00045-0.
42. **Tang L, Paonessa JD, Zhang Y, Ambrosone CB, McCann SE.** Total isothiocyanate yield from raw cruciferous vegetables commonly consumed in the United States. *J Funct Foods*. 2013 Oct 1;5(4):1996-2001. doi: 10.1016/j.jff.2013.07.011. PMID: 24443655; PMCID: PMC3891790.
43. **Fahey JW, Zhang Y, Talalay P.** Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Sep 16;94(19):10367-72. doi: 10.1073/pnas.94.19.10367. PMID: 9294217; PMCID: PMC23369.
44. **Oliviero T, Verkerk R, Dekker M.** Isothiocyanates from Brassica Vegetables-Effects of Processing, Cooking, Mastication, and Digestion. *Mol Nutr Food Res*. 2018;62(18):e1701069. doi:10.1002/mnfr.201701069
45. **Holst B, Williamson G.** A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *Nat Prod Rep*. 2004 Jun;21(3):425-47. doi: 10.1039/b204039p. Epub 2004 May 12. PMID: 15162227.
46. **Shapiro TA, Fahey JW, Wade KL, Stephenson KK, Talalay P.** Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: metabolism and excretion in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001 May;10(5):501-8. PMID: 11352861.
47. **Petri N, Tannergren C, Holst B, Mellon FA, Bao Y, Plumb GW, Bacon J, O'Leary KA, Kroon PA, Knutson L, Forsell P, Eriksson**

- T, Lennernas H, Williamson G.** Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum in vivo. *Drug Metab Dispos.* 2003 Jun;31(6):805-13. doi: 10.1124/dmd.31.6.805. PMID: 12756216.
- 48.**Li F, Hullar MA, Beresford SA, Lampe JW.** Variation of glucoraphanin metabolism in vivo and ex vivo by human gut bacteria. *Br J Nutr.* 2011 Aug;106(3):408-16. doi: 10.1017/S0007114511000274. Epub 2011 Feb 23. PMID: 21342607; PMCID: PMC3137642.
- 49.**Bheemreddy RM, Jeffery EH.** The metabolic fate of purified glucoraphanin in F344 rats. *J Agric Food Chem.* 2007 Apr 18;55(8):2861-6. doi: 10.1021/jf0633544. Epub 2007 Mar 17. PMID: 17367161.
- 50.**Conaway CC, Krzeminski J, Amin S, Chung FL.** Decomposition rates of isothiocyanate conjugates determine their activity as inhibitors of cytochrome p450 enzymes. *Chem Res Toxicol.* 2001 Sep;14(9):1170-6. doi: 10.1021/tx010029w. PMID: 11559030.
- 51.Sulforaphane glucosinolate. Monograph. *Altern Med Rev.* 2010 Dec;15(4):352-60. PMID: 21194251.
- 52.**Briones-Herrera A , Eugenio-Pérez D , Reyes-Ocampo JG , Rivera-Mancía S , Pedraza-Chaverri J .** New highlights on the health-improving effects of sulforaphane. *Food Funct.* 2018 May 23;9(5):2589-2606. doi: 10.1039/c8fo00018b. PMID: 29701207.
- 53.**La Marca M, Beffy P, Della Croce C, Gervasi PG, Iori R, Puccinelli E, Longo V.** Structural influence of isothiocyanates on expression of cytochrome P450, phase II enzymes, and activation of Nrf2 in primary rat hepatocytes. *Food Chem Toxicol.* 2012 Aug;50(8):2822-30. doi: 10.1016/j.fct.2012.05.044. Epub 2012 Jun 1. PMID: 22664424.

54. **Hecht SS.** Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug Metab Rev.* 2000 Aug-Nov;32(3-4):395-411. doi: 10.1081/dmr-100102342. PMID: 11139137.
55. **Vanduchova A, Tomankova V, Anzenbacher P, Anzenbacherova E.** Influence of Sulforaphane Metabolites on Activities of Human Drug-Metabolizing Cytochrome P450 and Determination of Sulforaphane in Human Liver Cells. *J Med Food.* 2016 Dec;19(12):1141-1146. doi: 10.1089/jmf.2016.0063. Epub 2016 Oct 25. PMID: 27779894.
56. **Bayat Mokhtari R, Baluch N, Homayouni TS, Morgatskaya E, Kumar S, Kazemi P, Yeger H.** The role of Sulforaphane in cancer chemoprevention and health benefits: a mini-review. *J Cell Commun Signal.* 2018 Mar;12(1):91-101. doi: 10.1007/s12079-017-0401-y. Epub 2017 Jul 23. Erratum in: *J Cell Commun Signal.* 2017 Aug 26;: PMID: 28735362; PMCID: PMC5842175.
57. **Guerrero-Beltrán CE, Calderón-Oliver M, Pedraza-Chaverri J, Chirino YI.** Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances. *Exp Toxicol Pathol.* 2012 Jul;64(5):503-8. doi: 10.1016/j.etp.2010.11.005. Epub 2010 Dec 3. PMID: 21129940.
58. **Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, Park BK.** The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem Pharmacol.* 2013 Mar 15;85(6):705-17. doi: 10.1016/j.bcp.2012.11.016. Epub 2012 Dec 5. PMID: 23219527.
59. **Townsend BE, Johnson RW.** Sulforaphane reduces lipopolysaccharide-induced proinflammatory markers in hippocampus and liver but does not improve sickness behavior. *Nutr Neurosci.* 2017;20(3):195-202. doi:10.1080/1028415X.2015.1103463
60. **Subedi L, Lee JH, Yumnam S, Ji E, Kim SY.** Anti-Inflammatory Effect of Sulforaphane on LPS-Activated Microglia Potentially through JNK/AP-1/NF- κ B Inhibition and Nrf2/HO-1 Activation. *Cells.* 2019

Feb 22;8(2):194. doi: 10.3390/cells8020194. PMID: 30813369; PMCID: PMC6406309.

61. **Sun CC, Li SJ, Yang CL, et al.** Sulforaphane Attenuates Muscle Inflammation in Dystrophin-deficient mdx Mice via NF-E2-related Factor 2 (Nrf2)-mediated Inhibition of NF- κ B Signaling Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 2015 Jul;290(29):17784-17795. DOI: 10.1074/jbc.m115.655019.
62. **Stewart ZA, Westfall MD, Pietenpol JA.** Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*. 2003 Mar;24(3):139-45. doi: 10.1016/S0165-6147(03)00026-9. PMID: 12628359.
63. **Jabbarzadeh Kaboli P, Afzalipour Khoshkbejari M, Mohammadi M, Abiri A, Mokhtarian R, Vazifemand R, Amanollahi S, Yazdi Sani S, Li M, Zhao Y, Wu X, Shen J, Cho CH, Xiao Z.** Targets and mechanisms of sulforaphane derivatives obtained from cruciferous plants with special focus on breast cancer - contradictory effects and future perspectives. *Biomed Pharmacother*. 2020 Jan;121:109635. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109635. Epub 2019 Nov 15. PMID: 31739165.
64. **Jiang LL, Zhou SJ, Zhang XM, Chen HQ, Liu W.** Sulforaphane suppresses in vitro and in vivo lung tumorigenesis through downregulation of HDAC activity. *Biomed Pharmacother*. 2016 Mar;78:74-80. doi: 10.1016/j.biopha.2015.11.007. Epub 2016 Jan 14. PMID: 26898427.
65. **Ali Khan M, Kedhari Sundaram M, Hamza A, et al.** Sulforaphane Reverses the Expression of Various Tumor Suppressor Genes by Targeting DNMT3B and HDAC1 in Human Cervical Cancer Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:412149. doi:10.1155/2015/412149
66. **Jo GH, Kim GY, Kim WJ, Park KY, Choi YH.** Sulforaphane induces apoptosis in T24 human urinary bladder cancer cells through a

- reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway: the involvement of endoplasmic reticulum stress and the Nrf2 signaling pathway. *Int J Oncol.* 2014 Oct;45(4):1497-506. doi: 10.3892/ijo.2014.2536. Epub 2014 Jul 4. PMID: 24993616.
67. **Pledgie-Tracy A, Sobolewski MD, Davidson NE.** Sulforaphane induces cell type-specific apoptosis in human breast cancer cell lines. *Mol Cancer Ther.* 2007 Mar;6(3):1013-21. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0494. Epub 2007 Mar 5. PMID: 17339367.
68. **Kan SF, Wang J, Sun GX.** Sulforaphane regulates apoptosis- and proliferation-related signaling pathways and synergizes with cisplatin to suppress human ovarian cancer. *Int J Mol Med.* 2018 Nov;42(5):2447-2458. doi: 10.3892/ijmm.2018.3860. Epub 2018 Sep 6. PMID: 30226534; PMCID: PMC6192763.
69. **Miao Z, Yu F, Ren Y, Yang J.** d,l-Sulforaphane Induces ROS-Dependent Apoptosis in Human Gliomablastoma Cells by Inactivating STAT3 Signaling Pathway. *Int J Mol Sci.* 2017 Jan 4;18(1):72. doi: 10.3390/ijms18010072. PMID: 28054986; PMCID: PMC5297707.
70. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2013 Jan;36 Suppl 1(Suppl 1):S67-74. doi: 10.2337/dc13-S067. PMID: 23264425; PMCID: PMC3537273.
71. **Harreiter J, Roden M.** Diabetes mellitus – Definition, Klassifikation, Diagnose, Screening und Prävention (Update 2019) [Diabetes mellitus-Definition, classification, diagnosis, screening and prevention (Update 2019)]. *Wien Klin Wochenschr.* 2019 May;131(Suppl 1):6-15. German. doi: 10.1007/s00508-019-1450-4. PMID: 30980151.
72. **Cattin L.** Il diabete mellito: etiopatogenesi ed inquadramento clinico [Diabetes Mellitus: etiology, pathophysiology and clinical classification]. *G Ital Nefrol.* 2016 Malattie Metaboliche e Rene;33(S68):gin/33.S68.6. Italian. PMID: 27960014.

73. **Henning RJ.** Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Future Cardiol.* 2018 Nov;14(6):491-509. doi: 10.2217/fca-2018-0045. Epub 2018 Nov 9. PMID: 30409037.
74. **Brunton S.** Pathophysiology of Type 2 Diabetes: The Evolution of Our Understanding. *J Fam Pract.* 2016 Apr;65(4 Suppl):supp_az_0416. PMID: 27262256.
75. **Zheng Y, Ley SH, Hu FB.** Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol.* 2018 Feb;14(2):88-98. doi: 10.1038/nrendo.2017.151. Epub 2017 Dec 8. PMID: 29219149.
76. **Fletcher B, Gulanick M, Lamendola C.** Risk factors for type 2 diabetes mellitus. *J Cardiovasc Nurs.* 2002 Jan;16(2):17-23. doi: 10.1097/00005082-200201000-00003. PMID: 11800065.
77. **Kolb H, Martin S.** Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *BMC Med.* 2017 Jul 19;15(1):131. doi: 10.1186/s12916-017-0901-x. PMID: 28720102; PMCID: PMC5516328.
78. **Zhang Y, Pan XF, Chen J, Xia L, Cao A, Zhang Y, Wang J, Li H, Yang K, Guo K, He M, Pan A.** Combined lifestyle factors and risk of incident type 2 diabetes and prognosis among individuals with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabetologia.* 2020 Jan;63(1):21-33. doi: 10.1007/s00125-019-04985-9. Epub 2019 Sep 4. PMID: 31482198.
79. **Ndisang JF, Vannacci A, Rastogi S.** Insulin Resistance, Type 1 and Type 2 Diabetes, and Related Complications 2017. *J Diabetes Res.* 2017;2017:1478294. doi: 10.1155/2017/1478294. Epub 2017 Nov 15. PMID: 29279853; PMCID: PMC5723935.

80. **Pearson ER.** Type 2 diabetes: a multifaceted disease. *Diabetologia*. 2019 Jul;62(7):1107-1112. doi: 10.1007/s00125-019-4909-y. Epub 2019 Jun 3. PMID: 31161345; PMCID: PMC6560016.
81. **Sen S, Chakraborty R.** Treatment and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Its Complication: Advanced Approaches. *Mini Rev Med Chem*. 2015;15(14):1132-3. doi: 10.2174/138955751514151006154616. PMID: 26459815.
82. **Schlienger JL.** Complications du diabète de type 2 [Type 2 diabetes complications]. *Presse Med*. 2013 May;42(5):839-48. French. doi: 10.1016/j.lpm.2013.02.313. Epub 2013 Mar 23. PMID: 23528336.
83. **Faselis C, Katsimardou A, Imprialos K, Deligkaris P, Kallistratos M, Dimitriadis K.** Microvascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Vasc Pharmacol*. 2020;18(2):117-124. doi: 10.2174/1570161117666190502103733. PMID: 31057114.
84. **Andresen JL, Rasmussen LM, Ledet T.** Diabetic macroangiopathy and atherosclerosis. *Diabetes*. 1996 Jul;45 Suppl 3:S91-4. doi: 10.2337/diab.45.3.s91. PMID: 8674903.
85. **Wu D, Wu C, Zhong Y.** The association between paraoxonase 1 activity and the susceptibilities of diabetes mellitus, diabetic macroangiopathy and diabetic microangiopathy. *J Cell Mol Med*. 2018 Sep;22(9):4283-4291. doi: 10.1111/jcmm.13711. Epub 2018 Jul 7. PMID: 29981194; PMCID: PMC6111876.
86. **Asmat U, Abad K, Ismail K.** Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. *Saudi Pharm J*. 2016 Sep;24(5):547-553. doi: 10.1016/j.jsps.2015.03.013. Epub 2015 Mar 21. PMID: 27752226; PMCID: PMC5059829.

87. **Wei W, Liu Q, Tan Y, Liu L, Li X, Cai L.** Oxidative stress, diabetes, and diabetic complications. *Hemoglobin*. 2009;33(5):370-7. doi: 10.3109/03630260903212175. PMID: 19821780.
88. **Drews G, Krippeit-Drews P, Düfer M.** Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflugers Arch*. 2010 Sep;460(4):703-18. doi: 10.1007/s00424-010-0862-9. Epub 2010 Jul 23. PMID: 20652307.
89. **Gerber PA, Rutter GA.** The Role of Oxidative Stress and Hypoxia in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Antioxid Redox Signal*. 2017 Apr 1;26(10):501-518. doi: 10.1089/ars.2016.6755. Epub 2016 Jun 30. PMID: 27225690; PMCID: PMC5372767.
90. **Krippeit-Drews P, Britsch S, Lang F, Drews G.** Effects of SH-group reagents on Ca²⁺ and K⁺ channel currents of pancreatic B-cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Apr 29;200(2):860-6. doi: 10.1006/bbrc.1994.1530. PMID: 8179620.
91. **D. Pessler, A. Rudich, and N. Bashan,** “Oxidative stress impairs nuclear proteins binding to the insulin responsive element in the GLUT4 promoter,” *Diabetologia*, vol. 44, no. 12, pp. 2156–2164, 2001.
92. **Esteves JV, Enguita FJ, Machado UF.** MicroRNAs-Mediated Regulation of Skeletal Muscle GLUT4 Expression and Translocation in Insulin Resistance. *J Diabetes Res*. 2017;2017:7267910. doi: 10.1155/2017/7267910. Epub 2017 Mar 27. PMID: 28428964; PMCID: PMC5385897.
93. **J. W. Eriksson,** “Metabolic stress in insulin's target cells leads to ROS accumulation—a hypothetical common pathway causing insulin resistance,” *FEBS Letters*, vol. 581, no. 19, pp. 3734–3742, 2007
94. **Rains JL, Jain SK.** Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2011 Mar 1;50(5):567-75. doi:

10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.006. Epub 2010 Dec 13. PMID: 21163346; PMCID: PMC3557825.

95. **A. Bloch-Damti and N. Bashan**, “Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress,” *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 7, no. 11-12, pp. 1553–1567, 2005.
96. **S. Sindhu, N. Akhter, H. Arefanian et al.**, “Increased circulatory levels of fractalkine (CX3CL1) are associated with inflammatory chemokines and cytokines in individuals with type-2 diabetes,” *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, vol. 16, no. 1, p. 15, 2017.
97. **Gupta S, Maratha A, Siednienko J, Natarajan A, Gajanayake T, Hoashi S, Miggin S**. Author Correction: Analysis of inflammatory cytokine and TLR expression levels in Type 2 Diabetes with complications. *Sci Rep*. 2018 Apr 5;8(1):5768. doi: 10.1038/s41598-018-23475-3. Erratum for: *Sci Rep*. 2017 Aug 9;7(1):7633. PMID: 29622775; PMCID: PMC5886980.
98. **Guest CB, Park MJ, Johnson DR, Freund GG**. The implication of proinflammatory cytokines in type 2 diabetes. *Front Biosci*. 2008 May 1;13:5187-94. doi: 10.2741/3074. PMID: 18508580.
99. **Wada J, Nakatsuka A**. Mitochondrial Dynamics and Mitochondrial Dysfunction in Diabetes. *Acta Med Okayama*. 2016 Jun;70(3):151-8. doi: 10.18926/AMO/54413. PMID: 27339203.
100. **Supale S, Li N, Brun T, Maechler P**. Mitochondrial dysfunction in pancreatic β cells. *Trends Endocrinol Metab*. 2012 Sep;23(9):477-87. doi: 10.1016/j.tem.2012.06.002. Epub 2012 Jul 4. PMID: 22766318.
101. **Fiorentino TV, Priolella A, Zuo P, Folli F**. Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related

- cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des.* 2013;19(32):5695-703. doi: 10.2174/1381612811319320005. PMID: 23448484.
102. **Ighodaro OM.** Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother.* 2018 Dec;108:656-662. doi: 10.1016/j.biopha.2018.09.058. Epub 2018 Sep 20. PMID: 30245465.
103. **Srivastava SK, Ramana KV, Bhatnagar A.** Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocr Rev.* 2005 May;26(3):380-92. doi: 10.1210/er.2004-0028. Epub 2005 Apr 6. PMID: 15814847.
104. **Gleissner CA, Sanders JM, Nadler J, Ley K.** Upregulation of aldose reductase during foam cell formation as possible link among diabetes, hyperlipidemia, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Jun;28(6):1137-43. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.158295. Epub 2008 May 1. PMID: 18451330; PMCID: PMC2579797.
105. **T. Inoguchi, P. Li, F. Umeda, Kakimoto M. Yu HY, M. Imamura, T. Aoki, T. Etoh, T. Hashimoto, M. Naruse, H. Sano,** High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD (P) H oxidase in cultured vascular cells, *Diabetes* 49 (November (11)) (2000) 1939–1945.
106. **Maeno Y, Li Q, Park K, Rask-Madsen C, Gao B, Matsumoto M, Liu Y, Wu IH, White MF, Feener EP, King GL.** Inhibition of insulin signaling in endothelial cells by protein kinase C-induced phosphorylation of p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). *J Biol Chem.* 2012 Feb 10;287(7):4518-30. doi: 10.1074/jbc.M111.286591. Epub 2011 Dec 12. PMID: 22158866; PMCID: PMC3281670.

107. **Cho SJ, Roman G, Yeboah F, Konishi Y.** The road to advanced glycation end products: a mechanistic perspective. *Curr Med Chem.* 2007;14(15):1653-71. doi: 10.2174/092986707780830989. PMID: 17584071.
108. **Yao D, Brownlee M.** Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes.* 2010 Jan;59(1):249-55. doi: 10.2337/db09-0801. Epub 2009 Oct 15. PMID: 19833897; PMCID: PMC2797929.
109. **Boyer F, Vidot JB, Dubourg AG, Rondeau P, Essop MF, Bourdon E.** Oxidative stress and adipocyte biology: focus on the role of AGEs. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:534873. doi: 10.1155/2015/534873. Epub 2015 Mar 23. PMID: 25878764; PMCID: PMC4386674.
110. **Schleicher ED, Weigert C.** Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 2000 Sep;77:S13-8. doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.07703.x. PMID: 10997685.
111. **Buse MG.** Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 Jan;290(1):E1-E8. doi: 10.1152/ajpendo.00329.2005. PMID: 16339923; PMCID: PMC1343508
112. **Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M.** Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Oct 24;97(22):12222-6. doi: 10.1073/pnas.97.22.12222. PMID: 11050244; PMCID: PMC17322.

113. **Dludla PV, Silvestri S, Orlando P, Mazibuko-Mbeje SE, Johnson R, Marcheggiani F, Cirilli I, Muller CJF, Louw J, Chellan N, Obonye N, Nkambule BB, Tiano L.** Palmitate-induced toxicity is associated with impaired mitochondrial respiration and accelerated oxidative stress in cultured cardiomyocytes: The critical role of coenzyme Q9/10. *Toxicol In Vitro*. 2020 Oct;68:104948. doi: 10.1016/j.tiv.2020.104948. Epub 2020 Jul 16. PMID: 32683093.
114. **Axelsson AS, Tubbs E, Mecham B, Chacko S, Nenonen HA, Tang Y, Fahey JW, Derry JMJ, Wollheim CB, Wierup N, Haymond MW, Friend SH, Mulder H, Rosengren AH.** Sulforaphane reduces hepatic glucose production and improves glucose control in patients with type 2 diabetes. *Sci Transl Med*. 2017 Jun 14;9(394):eaah4477. doi: 10.1126/scitranslmed.aah4477. PMID: 28615356.
115. **Patel B, Mann GE, Chapple SJ.** Concerted redox modulation by sulforaphane alleviates diabetes and cardiometabolic syndrome. *Free Radic Biol Med*. 2018 Jul;122:150-160. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.004. Epub 2018 Feb 7. PMID: 29427794.
116. **Bahadoran Z, Tohidi M, Nazeri P, Mehran M, Azizi F, Mirmiran P.** Effect of broccoli sprouts on insulin resistance in type 2 diabetic patients: a randomized double-blind clinical trial. *Int J Food Sci Nutr*. 2012 Nov;63(7):767-71. doi: 10.3109/09637486.2012.665043. Epub 2012 Apr 26. PMID: 22537070.
117. **Bahadoran Z, Mirmiran P, Azizi F.** Potential efficacy of broccoli sprouts as a unique supplement for management of type 2 diabetes and its complications. *J Med Food*. 2013 May;16(5):375-82. doi: 10.1089/jmf.2012.2559. Epub 2013 Apr 30. PMID: 23631497.
118. **Wang Y, Zhang Z, Sun W, Tan Y, Liu Y, Zheng Y, Liu Q, Cai L, Sun J.** Sulforaphane attenuation of type 2 diabetes-induced

aortic damage was associated with the upregulation of Nrf2 expression and function. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:123963. doi: 10.1155/2014/123963. Epub 2014 Feb 23. PMID: 24707343; PMCID: PMC3953421.

119. **Jiang X, Liu Y, Ma L, Ji R, Qu Y, Xin Y, Lv G.** Chemopreventive activity of sulforaphane. *Drug Des Devel Ther*. 2018 Sep 11;12:2905-2913. doi: 10.2147/DDDT.S100534. PMID: 30254420; PMCID: PMC6141106.
120. **Hu R, Xu C, Shen G, Jain MR, Khor TO, Gopalkrishnan A, Lin W, Reddy B, Chan JY, Kong AN.** Gene expression profiles induced by cancer chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in the liver of C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice. *Cancer Lett*. 2006 Nov 18;243(2):170-92. doi: 10.1016/j.canlet.2005.11.050. Epub 2006 Mar 3. PMID: 16516379.
121. **Zhang HQ, Chen SY, Wang AS, et al.** Sulforaphane induces adipocyte browning and promotes glucose and lipid utilization. *Mol Nutr Food Res*. 2016;60(10):2185-2197. doi:10.1002/mnfr.201500915