



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

**Attività anti-infiammatoria dell'estratto di
radice di *Zingiber officinale* in modelli
cellulari umani**

Relatore: Chiar.ma
Prof.ssa Fabiola Olivieri

Tesi di Laurea di:
Edgine Mae Ablon

Correlatore:
Dott.ssa Giulia Maticchione

A.A. 2020/2021

Sommario

<i>Introduzione</i>	4
1. <i>Infiammazione</i>	4
1.2 <i>La senescenza cellulare</i>	5
1.3 <i>Inflammaging e Immunosenescenza</i>	7
1.4 <i>Inflammaging e patologie età-associate</i>	8
1.5 <i>Disfunzione endoteliale nelle patologie età-associate</i>	9
1.6 <i>Principali pathways e mediatori infiammatori</i>	10
<i>NF-κB</i>	10
<i>p38 MAP-chinasi</i>	12
2. <i>Proprietà anti-infiammatorie delle sostanze naturali</i>	13
2.1 <i>Lo zenzero</i>	14
2.1.1 <i>Origine e utilizzi</i>	14
2.1.2 <i>Composizione</i>	14
2.1.3 <i>Proprietà farmacologiche</i>	15
<i>Obiettivo dello studio</i>	17
<i>Materiali e metodi</i>	18
1. <i>Coltura cellulare</i>	18
1.1 <i>Tripsinizzazione delle cellule</i>	18
1.2 <i>Congelamento delle cellule</i>	19
1.3 <i>Semina su piastra multi-well</i>	19
1.4 <i>Determinazione del dosaggio dell'estratto di Zenzero</i>	20
1.5 <i>Induzione dell'infiammazione</i>	21
1.6 <i>Trattamento con estratto di zenzero</i>	22
1.7 <i>Valutazione della senescenza</i>	23
2. <i>RNA messaggeri e microRNA</i>	23
2.1 <i>Estrazione RNA</i>	23

2.2 Retrotrascrizione RNA messaggeri	24
2.3 Real Time PCR RNA messaggeri	26
3. Proteine	28
3.1 Estrazione proteine	28
3.2 Corsa elettroforetica	30
3.3 Western Blot.....	30
3.4 Incubazione con anticorpi.....	31
Risultati.....	32
1. Curva dose-risposta dell'estratto di zenzero nelle cellule endoteliali giovani e senescenti	32
2. Effetto anti-infiammatorio dell'estratto di zenzero sulle HUVEC trattate con lipopolissaccaride (LPS).....	33
3. Effetto anti-infiammatorio dell'estratto di zenzero nelle HUVEC senescenti.....	35
4. La componente terpenica dell'estratto di zenzero come responsabile dell'effetto anti-infiammatorio nelle HUVEC trattate con LPS.....	38
Discussione	39
Bibliografia.....	41

Introduzione

1. Infiammazione

Il mantenimento vitale di un organismo, si basa sull'equilibrio dinamico dell'omeostasi che a sua volta è supportata dai processi chimici e fisici. Il mantenimento dell'equilibrio omeostatico è costantemente influenzato da fattori endogeni (genetici) ed esogeni (fattori ambientali). Nel corso dell'evoluzione sono stati selezionati processi fondamentali nel promuovere la sopravvivenza.

Tra questi processi vi è sicuramente l'infiammazione, la risposta immunitaria che protegge l'organismo dagli stimoli dannosi esterni ed interni permettendo l'attuazione di processi di riparo del danno. I meccanismi alla base dei processi infiammatori se da un lato proteggono l'organismo da stimoli dannosi di qualsiasi natura, non sono però esenti da effetti potenzialmente dannosi per l'ospite, tanto che se prolungati nel tempo possono causare danni collaterali responsabili del declino delle funzionalità tissutali (Medzhitov R., 2010). Nei tessuti coinvolti nei processi infiammatori le funzioni possono essere alterate fino a quando non si ristabilisce l'omeostasi (August H., 2006). Un esempio di questo fenomeno è la disfunzione endoteliale (Rubanyi G.M., 1993), tipica delle cellule endoteliali che cronicamente stimulate da stimoli pro-infiammatori alterano il proprio profilo fenotipico (morfologia e secrezione) e la propria funzionalità.

L'infiammazione è un processo che garantisce la sopravvivenza, ma un'eccessiva attivazione diventa un fattore di rischio per lo sviluppo di numerose patologie umane (Pahwa R., 2021).

La ricerca dei meccanismi coinvolti nelle patologie età correlate (age-related diseases o ARDs), classificate da WHO come le più grandi minacce per la salute dell'uomo, ha consentito di descrivere i fenomeni della senescenza cellulare, dell'immunosenescenza e dell'inflammaging.

1.2 La senescenza cellulare

La senescenza cellulare è una condizione, inizialmente identificata nelle colture cellulari in vitro, che viene oggi considerata di fondamentale importanza nei processi patologici e di invecchiamento in vivo. La cellula senescente va incontro a profonde trasformazioni morfologico e funzionali, perdendo la capacità di proliferare ed acquisendo un fenotipo secretorio pro-infiammatorio. Nella senescenza cellulare si attiva infatti la risposta al danno, soprattutto a danni non risolvibili, come il danno al DNA o l'attivazione eccessiva di oncogeni (Muñoz-Espín D., 2014). La senescenza cellulare viene solitamente distinta in senescenza replicativa e senescenza indotta.

La senescenza replicativa è stata la prima forma di senescenza cellulare identificata e caratterizzata. Più di mezzo secolo fa Hayflick descrisse come cellule in coltura si replicassero per un numero finito di passaggi (Hayflick L., 1965). Gli studi molecolari permisero di scoprire che con l'aumentare delle replicazioni cellulari, i telomeri (sequenze ripetute dell'esamero TTAGG, che fungono da protezione delle estremità di tutti i cromosomi umani), si accorciano progressivamente. Questo è dovuto sia al meccanismo stesso della duplicazione del DNA che al fatto che i telomeri sono più suscettibili ai danni e poco accessibili agli enzimi di riparazione del DNA. Inoltre, la perdita di espressione dell'enzima telomerasi (che mantiene la sua attività solo nelle cellule staminali e nei gameti dell'adulto e può essere riattivata nei tumori) riduce la possibilità di un allungamento dei telomeri. Una volta passata una certa soglia di accorciamento telomerico, si attiva la risposta al danno al DNA (DNA Damage Response o DDR) simile a quella indotta da agenti che rompono la doppia elica del DNA (ad esempio radiazioni o chemioterapici). L'attivazione del sistema di riparazione induce il blocco del ciclo cellulare (attraverso l'espressione di p53 e p21) finché il danno non viene riparato; nel caso particolare dei telomeri corti, il blocco rimane permanente (Fumagalli M., 2021). La DDR si caratterizza per l'aumentato rilascio di molecole che attivano il processo infiammatorio, per permettere il riparo. Ne consegue quindi che la cellula senescente con telomeri corti aumentata la sintesi e secrezione di molecole infiammatorie (citochine, chemochine, metalloproteasi), va incontro a cambiamenti morfologici (le cellule si allargano ed hanno un nucleo più grande), ed aumenta l'attività dell'enzima lisosomiale β -galattosidasi, così come i processi autofagici (Muñoz-Espín D., 2014).

La senescenza indotta viene determinata da fenomeni diversi dal semplice processo replicativo. Ben caratterizzata è la senescenza indotta dall'espressione di oncogeni, considerata come un meccanismo di soppressione tumorale che limita la progressione dei tumori benigni. I meccanismi che regolano questa risposta sono costituiti prevalentemente da danni al DNA, alterazioni epigenetiche (formazione di eterocromatina), stress trascrizionale, stress ossidativo (ossia indotto da specie reattive dell'ossigeno). In ogni caso ad oggi non esiste ancora un modello unificato che integri tutti i risultati. Quello che sembra ormai chiaro è che questo tipo di senescenza cellulare non sia innescata da una singola serie lineare di eventi, ma sia invece regolata da una complessa rete di segnalazioni.

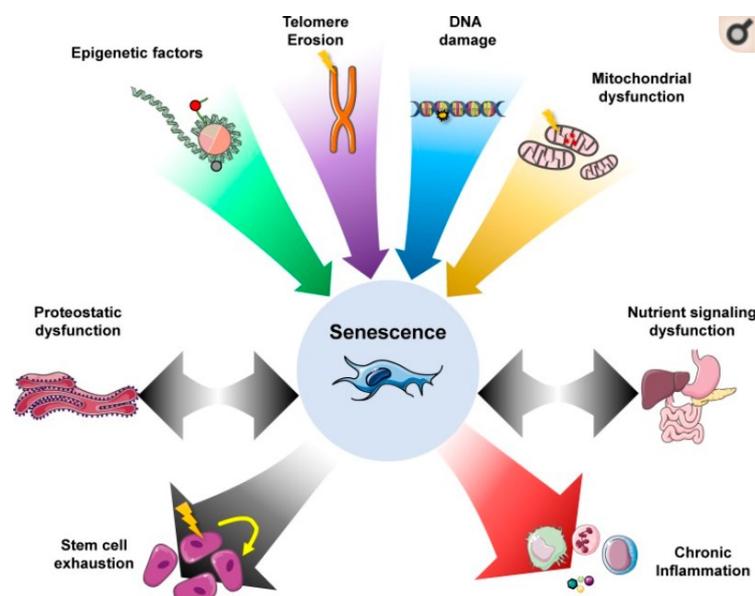


Figura 1 Fattori che innescano la senescenza. (McHugh D, *Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues*, 2018)

Sia nell'ambito della senescenza replicativa che indotta il processo di senescenza ha la funzione di frenare la proliferazione di cellule potenzialmente pericolose a causa di mutazioni o disfunzionalità. La senescenza, infatti, non si osserva solo nei tessuti adulti, ma è stato riscontrato anche durante l'embriogenesi per eliminare strutture cellulari.

Il fenotipo secretorio associato alla senescenza (SASP) è mediato dai fattori di trascrizione NF- κ B e CEBP β e include citochine infiammatorie (IL-1, IL-6; TNF α), chemochine (IL-8, MPC – Monocyte Chemoattractant Protein, MIP – Macrophage Inflammatory Protein), fattori di crescita (TGF β e GM-CSF) e proteasi. Alcuni di queste molecole sono deputate al richiamo di macrofagi in grado di attuare la clearance delle cellule senescenti (Muñoz-Espín D., 2014).

Il ruolo patologico delle cellule senescenti è quindi in gran parte dovuto all'attività pro-infiammatoria che, se protratta nel tempo, può apportare ulteriori danni a cellule normali adiacenti, inducendole ad acquisire esse stesse uno stato senescente. La senescenza cellulare è un fenomeno che tende quindi ad auto-amplificarsi se non contrastato, aumentando l'intensità dell'infiammazione fino a raggiungere il livello sistemico.

1.3 Inflammaging e Immunosenescenza

Con il termine di inflammaging si indica uno stato infiammatorio cronico, di basso grado ma sistemico che tende ad instaurarsi ed accrescersi con l'età (Franceschi C., 2000). Se inizialmente si riteneva che l'inflammaging fosse in gran parte determinato dall'attivazione ripetuta nel tempo dell'immunità innata, oggi si ritiene che anche l'accumulo di cellule senescenti in vivo, con fenotipo SASP, possa contribuire ad alimentare lo stato di infiammazione cronica età-associato. L'inflammaging è quindi oggi riconosciuto come il principale fattore di rischio per lo sviluppo di tutte le più comuni patologie età-associate (Fulop T., 2018) (Pahwa R., 2021).

Con il termine di immunosenescenza si indica invece il declino delle difese immunitarie che si osserva con il progredire dell'età (Santoro A., 2021).

Sia l'inflammaging che l'immunosenescenza rientrano in una visione integrata dei processi di invecchiamento fisio-patologico che include sia la perdita di funzione del sistema immunitario con l'età, sia una sorta di rimodellamento delle funzioni immunitarie, come risultato di processi di adattamento che determinano un aumento delle funzioni dell'immunità innata (Shijin X., 2016) (Aiello A., 2019). L'inflammaging e l'immunosenescenza riflettono quindi lo stesso stato di disfunzione immunitaria caratteristica dell'invecchiamento: da una parte si ha una minor efficacia delle difese immunitarie a causa della ridotta funzione dell'immunità acquisita, come la diminuzione dei linfociti B e T naïve, che si traduce in ridotta risposta ai vaccini e alle nuove infezioni, mentre dall'altro lato si ha un aumento dell'infiammazione cronica sostenuta dall'attivazione dell'immunità innata, che finisce per aumentare il rischio di insorgenza delle ARDs. In questo quadro generale, va anche tenuto conto del fatto che anche le cellule del sistema immunitario diventano senescenti. Numerosi dati ottenuti sui macrofagi senescenti avvalorano l'ipotesi di un loro ruolo nell'inflammaging (Prattichizzo F., 2016).

Nelle cellule immunosenescenti, la membrana citoplasmatica risulta più rigida, alterando la struttura necessaria nello svolgimento della risposta immunitaria. Si può infatti avere la perdita di recettori fondamentali nel signaling cellulare come TCR e CD28. Quest'ultimo è correlato alla produzione di IL-2, importante per orchestrare la regolazione della risposta immunitaria, e al cambiamento metabolico che avviene dallo stato di naïve a quello attivo. Quando un linfocita T viene stimolato, cambia il metabolismo e si passa dalla fosforilazione ossidativa alla glicolisi aerobica che permette di ottenere energia in tempi più rapidi. Quando questi meccanismi vengono alterati si ha una risposta cellulare inefficiente (T Fulop., 2021).

Nelle cellule dell'immunità innata si è visto invece che il numero dei recettori per il riconoscimento degli antigeni, PRR (Pattern Recognition Receptor), come ad esempio i TLR (Toll Like Receptor), varia con l'età. Queste cellule acquisiscono uno stato di sovrattivazione producendo più mediatori pro-infiammatori come citochine e radicali liberi, ma se stimolati non rispondono adeguatamente al loro ruolo protettivo (T Fulop., 2021).

Recentemente è stata proposta la teoria che anche il sistema immunitario innato abbia una sorta di memoria; ciò potrebbe indicare che con la ripetizione dello stesso stimolo, anche le cellule dell'immunità innata diventino più efficienti nel contrastare l'agente causante. Tuttavia, questa eccessiva stimolazione potrebbe avere delle conseguenze dannose per l'organismo, in quanto le cellule dell'immunità innata stimolate intensamente a produrre molecole che modulano l'infiammazione rischierebbero la paralisi funzionale producendo oltre alle citochine pro-infiammatorie anche quelle anti-infiammatorie (T Fulop., 2021). Questo fenomeno unitamente all'azione pro-infiammatoria delle cellule somatiche senescenti, può spiegare sia l'insorgenza dell'inflammaging che il suo aumento di intensità durante l'invecchiamento.

1.4 Inflammaging e patologie età-associate

L'inflammaging viene considerato tra le principali cause di insorgenza delle patologie età associate, ovvero delle patologie più comuni nella popolazione anziana, quali le malattie cardiovascolari, l'ipertensione, il cancro, il diabete di tipo 2, l'osteoporosi e l'Alzheimer (Jaul E., 2017).

Oltre ai meccanismi genetici che potrebbero influenzare l'acquisizione del fenotipo senescente e la qualità della risposta infiammatoria, vanno considerati anche i fattori ambientali che possono contribuire ad alimentare il processo di infiammazione cronica, come l'obesità (Della

Corte K.W., 2018), l'inquinamento ambientale, la sedentarietà e lo stile di vita in senso lato (Duan Y., 2018) (Tibuakuu M., 2017). Si è infatti osservato un significativo aumento dell'insorgenza di malattie infiammatorie nel nostro secolo, suggerendo come l'infiammazione cronica possa essere un meccanismo di adattamento messo in atto dal nostro organismo nel tentativo di contrastare gli stimoli ambientali dannosi in cui siamo sempre più immersi (Bosma-den Boer M.M., 2012).

1.5 Disfunzione endoteliale nelle patologie età-associate

Le cellule endoteliali sono presenti in tutti i tessuti del nostro organismo in quanto compongono la parete dei vasi permettendo lo scambio di sostanze nutritive e di ossigeno. L'endotelio contribuisce a regolare il flusso sanguigno controllando sia la vasodilatazione che la vasocostrizione, nonché i processi di aggregazione piastrinica e coagulazione, attraverso la secrezione paracrina ed endocrina di sostanze che mediano tali effetti (Ossido Nitrico, prostaciline, trombossani, prostaglandine, endotelina, fattore tissutale, etc..). Le cellule endoteliali svolgono però anche un ruolo importante nella risposta infiammatoria perché interagiscono direttamente con le cellule dell'immunità. Durante una risposta infiammatoria, l'endotelio regola l'accesso delle cellule immunitarie al sito del danno (permeabilità vascolare) e l'emostasi (vasodilatazione/vasocostrizione, coagulazione/fibrinolisi). Questi meccanismi sono regolati dall'attività sia endocrina che paracrina delle cellule endoteliali.

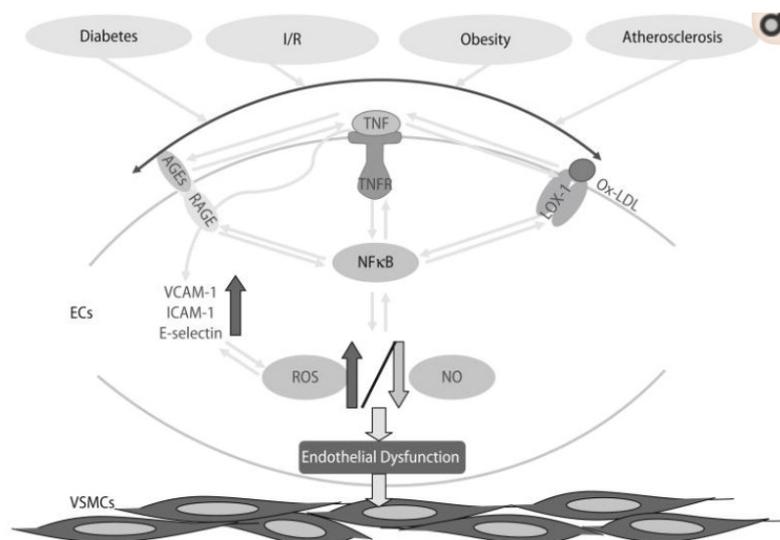


Figura 2 Fattori che contribuiscono alla disfunzione endoteliale. (Zhang C., *The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction.*, 2008)

Lo stato di disfunzione endoteliale si osserva quando si ha la compromissione dell'attività endocrino-paracrina dell'endotelio. Stimoli infiammatori cronici sistemici possono contribuire all'instaurarsi della disfunzione endoteliale. Le cellule endoteliali rispondono infatti all'aumento di proteina C reattiva attraverso l'esposizione di molecole di adesione che richiamano cellule immunitarie e modulando la produzione di NO (Sproston N.R., 2018). Anche la citochina TNF- α concorre all'aumento dell'espressione di molecole di adesione sull'endotelio e all'aumento di ROS, causando quindi un aumento dello stress ossidativo ed ulteriore infiammazione (Stenvinkel P., 2001).

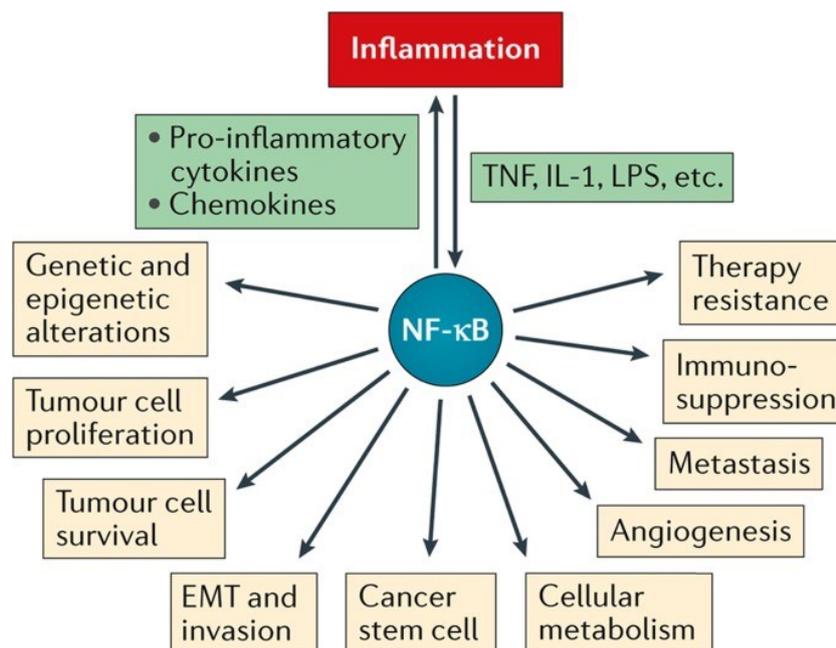
La disfunzione endoteliale è oggi riconosciuta come uno degli elementi chiave nell'insorgenza o nell'aggravamento di queste patologie. Esempio tipico è la disfunzione endoteliale nella patogenesi dell'aterosclerosi (Fan S., 2000) (Ehrenreich H., 1990), (Maguire J.J., 1998) a precocità del danno funzionale dell'endotelio è in questo contesto in rapporto al carico lipidico della parete arteriosa. La disfunzione endoteliale è stata descritta anche in associazione a livelli cronicamente elevati dei prodotti finali della glicazione non enzimatica delle proteine e dei lipidi (AGEs), fenomeno che avviene quando proteine e lipidi sono esposti a livelli aumentati di zuccheri (glucosio). Gli AGE possono legarsi al recettore RAGE, espresso anche sulle cellule endoteliali, un recettore che può attivare una risposta infiammatoria (Feng L., 2005), promuovendo il rilascio di citochine e di specie reattive dell'ossigeno (ROS), capaci di modulare i livelli di NO (Zhang C., 2008). Anche l'abitudine al fumo determina una stimolazione cronica sull'endotelio, determinando un aumento di biomarkers infiammatori nel plasma (Tibuakuu M., 2017).

1.6 Principali pathways e mediatori infiammatori

NF- κ B

Uno dei regolatori centrali dell'infiammazione è la famiglia dei fattori di trascrizione nucleari κ B, chiamati NF- κ B. I pathways che attivano questo mediatore possono essere attivati sia da una risposta infiammatoria che da alterazioni metaboliche, mettendo in correlazione il dismetabolismo (iperglicemia, ipercolesterolemia, ipertrigliceridemia e iperuricemia) con le patologie infiammatorie. L'attivazione di NF- κ B, si osserva nelle cellule immunitarie, nell'endotelio, negli epatociti, nelle cellule del tessuto adiposo e del sistema nervoso centrale (SNC).

Nelle cellule non stimolate, le subunità che compongono NF- κ B si trovano nel citosol associate al loro inibitore I κ B il quale ne evita la traslocazione nucleare. In seguito allo stimolo sui recettori di membrana da parte di PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) o DAMPS (Damages Associated Molecular Patterns) o citochine, la cascata di segnalazione converge sull'enzima IKK attivandolo e rendendolo quindi capace di liberare le subunità di NF κ B dall'inibitore I κ B. NF- κ B trasloca nel nucleo ed attiva la trascrizione dei geni bersaglio, e quindi la risposta infiammatoria. I monociti che arrivano nel sito di reclutamento, si differenziano in macrofagi pro (M1) o anti (M2) infiammatori, in base alle condizioni dinamiche del processo infiammatorio (Mantovani A., 2005). I macrofagi M1 sono efficienti nella produzione di citochine pro-infiammatorie (IL-1b, IL-6 e TNF), molecole effettrici come ROS e RNI (Reactive Nitrogen Intermediates) e bassi livelli di IL-10. I macrofagi M2 rilasciano invece alti livelli di IL-10, TGF-beta e recettori profagocitosi come gli scavenger, recettori di mannosio e lectina di tipo c, svolgendo quindi un ruolo anti-infiammatorio. NF- κ B gioca un ruolo cruciale nell'insorgenza dello stato infiammatorio cronico, modulando il fenotipo dei macrofagi (Baker R.G., 2011).



Nature Reviews | Immunology

Figura 3 Effetti dell'attivazione di NF κ B

Nell'endotelio, gli stimoli pro-infiammatori indotti da TNF- α , IL-1 o LPS aumentano la produzione di chemochine come MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein) e IL-8, molecole di adesione endoteliale (E-selectina, ICAM-1) e molecole di adesione vascolare (VCAM-1) per permettere l'extravasazione leucocitaria (Denk A., 2001). Altri geni bersaglio di NF- κ B includono quelli che codificano per gli immunorecettori, proteine della fase acuta, geni nella risposta allo stress, regolatori dell'apoptosi, fattori di crescita, e altri fattori di trascrizione ed enzimi (Gilmore T.D.).

p38 MAP-chinasi

Le proteine p38 sono una classe di enzimi MAPKs (Mitogen Activated Protein kinases) che hanno un ruolo fondamentale nella risposta infiammatoria. P38 fu isolato come proteina di 38kDa che viene fosforilata in risposta alla stimolazione da citochine come TNF- α , IL-1, e dai ligandi del TLR come LPS e peptidoglicano. La sua attivazione viene svolta da altri enzimi detti chinasi delle MAPK (MKKs) e porta all'attivazione di fattori di trascrizione che a loro volta aumentano la trascrizione di geni infiammatori (Yang Y., 2014).

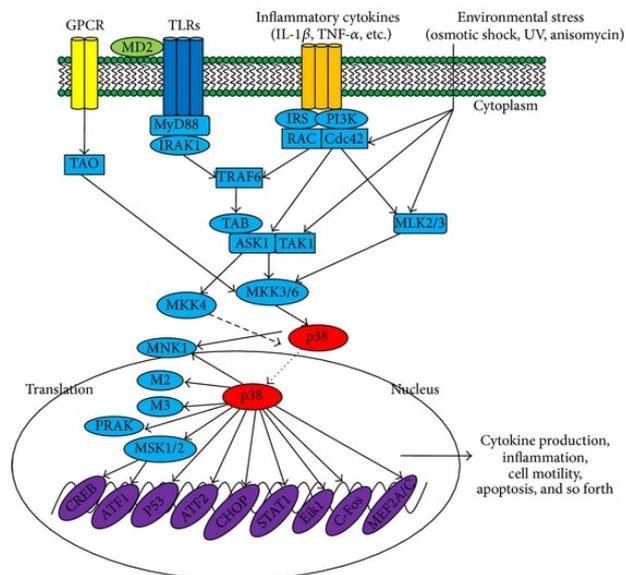


Figura 4 Attivazione di MAPK p38. (Tratto da *Functional Roles of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Macrophage-Mediated Inflammatory Responses*)

Nell'endotelio, p38 regola il rimodellamento dell'actina in risposta allo stress ossidativo, trasformando le fibre di actina danneggiate in fibre dello stress (contengono miosina,

tropomiosina, alfa-actinina). Le fibre dello stress hanno un ruolo cruciale nel mantenimento delle giunzioni cellulari, mantenendo l'integrità della barriera endoteliale e regolando la permeabilità vasale (Corre I., 2017). P38 è anche coinvolto nella senescenza indotta da stress ossidativo; utilizzando un inibitore di p38, SB 203580, si è osservata una riduzione della senescenza cellulare (Shen X.H., 2013).

2. Proprietà anti-infiammatorie delle sostanze naturali

Da tempo immemore esiste un profondo legame tra l'uomo e il regno vegetale. Grazie all'utilizzo delle piante a scopo alimentare, siamo stati in grado di scoprire anche le proprietà medicinali conferite dagli innumerevoli principi attivi presenti in grandi varietà di piante (Petrovska B.B., 2012). Molte piante sono state scelte e coltivate proprio per le loro proprietà benefiche e vantaggiose per la salute umana. La trasmissione delle conoscenze erboristiche si è tramandata da tempi immemori da una generazione all'altra. Un esempio riguarda le spezie che di per sé non hanno proprietà nutritive in termini energetici (Sherman P.W., 1999) (Pan S.Y., 2014). Il fenomeno dell'automedicazione fitoterapica in base alla tradizione popolare è tutt'ora esistente e l'interesse verso questi aspetti è in crescente aumento (Firenzuoli F., 2007) (Makukh K., 2015). Questo stimola la ricerca per la valutazione della sicurezza e della efficacia di sostanze di origine vegetale.

2.1 Lo zenzero

2.1.1 Origine e utilizzi

Lo zenzero è una pianta erbacea originaria dell'estremo oriente. Appartiene al genere *Zingiber* dell'ordine dei *Zingiberales*, al quale appartengono anche la curcuma, il cardamomo e la pianta di banana. L'utilizzo del rizoma di zenzero nell'alimentazione e nella medicina tradizionale (orale e topica) risale a più di 5000 anni fa. La sua importanza si rispecchia nel fatto che la varietà officinale non esiste in natura; dunque, venne appositamente selezionata, coltivata e trasportata dall'uomo nelle vie commerciali antiche passando per l'India, integrandosi nella cultura alimentare inglese, fino ad arrivare nelle Americhe. La sua diffusione ha agevolato il differenziamento dei suoi utilizzi; in alcuni paesi si ricorre allo zenzero per alleviare disturbi digestivi, o per contrastare sintomi simil influenzali (mal di gola, febbre, tosse) ed in altri come antidolorifico (rimedio naturale per dolori di varia origine, compresi i dolori articolari).



Figura 5 Rizomi di zenzero freschi. (Tratto da *Growing Ginger in the North*, seedtofork.com)

2.1.2 Composizione

I costituenti dello zenzero cambiano in base al paese di origine del campione e in base ai processi a cui è sottoposto. Lo zenzero può essere assunto fresco, disidratato, sott'aceto o condito. I composti bioattivi presenti nelle varie preparazioni sono i gingeroli, zingiberene e

shogaol. I primi sono fenoli volatili maggiormente presenti nello zenzero fresco che gli conferiscono il sapore pungente e le sue proprietà medicinali. I shogaol sono prodotti di trasformazione dei gingeroli dopo bollitura od essiccazione.

2.1.3 Proprietà farmacologiche

I primi studi scientifici sulle proprietà dello zenzero iniziarono negli anni '90 utilizzando modelli in vivo ed in vitro. Numerosi risultati sperimentali suggeriscono effetti significativi antinfiammatori, antidolorifici, antipiretici, antiallergici, e antidiarroici. Inoltre, contiene composti con potenti proprietà antiossidanti, capaci quindi di contrastare gli effetti dei radicali liberi.

Proprietà antinfiammatorie

Il composto maggiormente responsabile delle attività antinfiammatorie è il 6-gingerolo. Sui macrofagi attivati con LPS si osserva una diminuzione di secrezione delle citochine pro-infiammatorie e ridotta presentazione antigenica. Nelle cellule RAW 264.7 di derivazione murinica, il composto inibisce NOS e COX-2 indotto da LPS (Tripathi S., 2007).

Nello studio (Lee T.Y., 2009) si ipotizza che il 6-GN agisca sopprimendo la fosforilazione di I- κ B α , dunque l'inibizione della trascrizione di NF- κ B, riducendo i livelli di NO e l'espressione di TNF- α . Inoltre, è stato riportato (Lee S.W., 2011) che 10-GN, 6-SG e 8-SG esplicano attività anti-infiammatoria attraverso l'inibizione del legame tra ICAM1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) e LFA-1 (Lymphocyte Function Associated Antigen -1) nelle cellule murine (THP1). Nel modello cellulare HuH7 stimolato da IL-1 β (Li X.H., 2013) 6-GN riduce infiammazione e stress ossidativo attraverso la diminuzione dei livelli di mRNA di IL-6, IL-8 e SAA-1. Gli stessi effetti anti-infiammatori sono stati osservati anche nelle cellule microgliali BV2, indotti da LPS, suggerendo potenzialità terapeutiche nelle patologie neuro infiammatorie (Ho S.C., 2013). A livello topico, si è dimostrato che il pretrattamento con 6-GN ha un effetto anti-infiammatorio protettivo contro l'applicazione di TPA (Tetradecanoyl Phorbol Acetate) riducendo l'espressione iNOS e COX-2 (Pan M.H., 2008). Un'ulteriore attività correlata all'infiammazione da parte di 6-SG, 8-SG e 8-GN è l'inibizione del rilascio di istamina osservata in mastociti peritoneali di ratti (Yamahara J., 1995). Si è infatti visto che 6-GN sopprime l'espressione genica del gene MUC5AC indotto da IL-1 β correlato alla secrezione di muco che di conseguenza aumenta l'insorgenza di asma (Kim J.H., 2009).

Attività antidiabetiche, antilipidiche e antiossidanti

Studi scientifici riportano la correlazione tra obesità ed infiammazione, suggerendo come una dieta squilibrata, ricca di zuccheri, possa contribuire a mantenere uno stato infiammatorio. L'effetto antidiabetico dello zenzero, associato maggiormente a 8-GN, è stato osservato in cellule L6, myotubuli, dimostrando come lo zenzero induca un aumento dell'assorbimento del glucosio attraverso l'aumento della distribuzione del trasportatore GLUT4 di membrana (Li Y., 2012). L'assunzione di zenzero è stata anche correlata con i livelli plasmatici di insulina (Chakraborty D., 2012).

L'azione ipolipidica è stata invece osservata in cellule adipose di derivazione murinica 3T3-L1. La diminuzione della grandezza dei droplet lipidici in seguito a trattamento con zenzero indicherebbe un minor assorbimento ed accumulo di lipidi (Tzeng T.F., 2013).

6-GN è anche in grado di diminuire lo stress ossidativo stimolando gli enzimi che metabolizzano i ROS, quali superossido dismutase, catalase, glutatione perossidase e le attività di GSH (Chakraborty D., 2012).

Altri effetti correlati all'infiammazione

I composti secondari dello zenzero hanno dimostrato proprietà antimicrobiche verso i patogeni orali (Park M., 2008), contro *Helicobacter Pylori* (Mahady G.B., 2003) e (Zhang Y.L., 2013), *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium Tuberculosis*. Inoltre, i composti dello zenzero hanno dimostrato un aumento dell'efficacia dei farmaci antimicrobici (Nagoshi C., 2006).

6-GN è anche efficace nell'alleviare il dolore neuropatico (Gauthier M.L., 2013). Si ipotizza che il 6 gingerolo sia un agonista dei recettori vanilloidi responsabili della trasmissione del dolore o del prurito fino al sistema nervoso centrale (Someya A., 2003).

Considerato che il sistema immunitario gioca un ruolo fondamentale nella regolazione dell'umore, gli effetti antinfiammatori dello zenzero potrebbero apportare dei benefici e attenuare i sintomi depressivi. Lo zenzero è spesso presente nei mix di erbe della medicina tradizionale cinese utilizzati per contrastare i sintomi depressivi.

Obiettivo dello studio

Lo zenzero (*Zingiber Officinale*), appartenente alla famiglia delle Zingiberaceae, è da molto tempo utilizzato per contrastare sintomi associati a stati patologici soprattutto di natura infiammatoria, quali il dolore e la febbre. Ad oggi, anche nei paesi occidentali, l'interesse verso gli effetti benefici per la salute umana degli estratti vegetali è notevolmente aumentato, in particolare in relazione al loro potenziale ruolo nella prevenzione delle più note malattie correlate all'invecchiamento, quali malattie cardiovascolari, diabete, demenze e cancro.

Gli effetti benefici dello zenzero sono largamente supportati dalla letteratura scientifica, ma i meccanismi farmacodinamici delle sue componenti bioattive sono ancora oggetto di studio.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di determinare gli effetti antinfiammatori dell'estratto del rizoma della pianta erbacea di zenzero a livello cellulare, analizzando cellule endoteliali umane (HUVEC, Human Umbelical Vein Endothelial Cells) indotte con LPS. Poiché la senescenza replicativa si caratterizza per l'acquisizione del fenotipo infiammatorio definito SASP, gli effetti dello zenzero sono stati testati anche su cellule HUVEC in senescenza replicativa.

Materiali e metodi

1. Coltura cellulare

Le cellule HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell) sono cellule endoteliali derivate da cordone ombelicale umano ottenute da un pool di soggetti. Vengono messe in cultura all'interno di fiasche o pozzetti utilizzando il terreno EGM-2 e mantenute in incubatore a 37°C, 5% CO₂ e 90% di umidità. Le cellule endoteliali aderiscono e si replicano sul fondo del supporto posto in orizzontale e una volta raggiunta una buona distribuzione di crescita vengono staccate, contate e divise in base ai trattamenti da effettuare.



Figura 6 Vari supporti per la coltura cellulare. (Tratto da ddbiolab.com)

1.1 Tripsinizzazione delle cellule

È importante lavorare sotto cappa a flusso laminare, utilizzare strumenti appositi per la coltura cellulare come pipette sierologiche usa e getta, micropipette utilizzate esclusivamente per le colture cellulari ed evitare il più possibile la contaminazione della postazione di lavoro. Bisogna pulire qualsiasi oggetto che va posto all'interno della cappa come i contenitori di reagenti provenienti dall'esterno/frigo, evitare il sovraffollamento all'interno della cappa per non disturbarne il flusso e coprire il più possibile le colture cellulari e reagenti durante le manovre analitiche.

- Rimuovere il terreno di coltura

- Lavare con PBS per rimuovere i residui di terreno contenente FBS il quale blocca l'attività della tripsina.
- Aggiungere la tripsina per la degradazione delle proteine di adesione (1,5 mL per fiasca T25; 3 mL per fiasca T75). Incubazione per 5 minuti.
- Controllare l'avvenuto distacco al microscopio e procedere al blocco della tripsina con l'aggiunta di RMPI contenente FBS usandone una quantità doppia.
- Trasferire il contenuto della fiasca all'interno di una provetta falcon da 15 mL, lavare la fiasca con PBS per prendere eventuali cellule rimaste ed effettuare un controllo della fiasca al microscopio per accertarsi dello svuotamento completo delle cellule.
- Centrifugare la falcon a 1000 rpm per 5 minuti.
- Togliere il sorvanatante e risospendere il pellet in EGM-2 annotando la quantità utilizzata per il successivo calcolo del numero di cellule.
- Inserire 10 uL nella camera di Burker e contare le cellule al microscopio.

1.2 Congelamento delle cellule

Dopo la conta cellulare si possono prelevare delle aliquote da coltivare su piastra, da seminare su una nuova fiasca per il successivo passaggio oppure da conservare a -80°C per qualche mese o in azoto liquido per periodi più lunghi. La discesa a -80°C deve essere graduale e deve essere aggiunta una soluzione chiamata freezing mix (FBS con 10% di DMSO) per non rovinare le cellule. Si centrifuga a 1000 rpm per 5 minuti e si risospendono le cellule con la freezing mix. La provetta viene allocata all'interno di un contenitore particolare contenente isopropanolo e conservata in congelatore. Dopo 1 giorno, la provetta può essere trasferita in azoto liquido.

1.3 Semina su piastra multi-well

La piastra con pozzetti è un supporto utile per differenziare le cellule in base al trattamento. Una volta cresciute, le cellule possono essere utilizzate per le analisi (ad esempio: mRNA, microRNA, proteine e immunofluorescenza). Per ottenere una semina adeguata bisogna considerare la concentrazione delle cellule ottenute dalla coltura in fiasca e la densità cellulare per cm^2 che vogliamo ottenere per ogni singolo pozzetto. I calcoli vengono eseguiti seguendo la tabella di riferimento delle piastre fornite dal produttore attraverso la quale si ottiene il volume della soluzione contenente le cellule e il volume di terreno di coltura da aggiungere per ogni pozzetto.

Multi-well	Superficie (cm ²)	Volume (ml)
96	0,32	0,1-0,2
48	1,0	0,3-0,6
24	1,88	0,5-1,2
12	3,83	1,0-2,4
6	9,40	2,0-3,0

1.4 Determinazione del dosaggio dell'estratto di Zenzero

Per determinare la concentrazione non tossica dell'estratto di Zenzero sia su HUVEC giovani che su HUVEC senescenti, sono state preparate sette soluzioni dell'estratto e diluite da 100 ug/mL a 0,1 ug/mL). Le HUVEC sono state messe in coltura in una piastra da 96 pozzetti divisi in modo da avere 3 pozzetti per concentrazione. Sono stati allestiti ulteriori pozzetti con HUVEC di controllo. Le cellule sono state messe in incubatore e fatte crescere prima del trattamento. Dopo il trattamento le cellule sono state incubate per altre 24 ore ed infine è stata valutata la vitalità cellulare attraverso il saggio MTT.

Saggio MTT

E' un metodo che valuta l'attività degli enzimi mitocondriali attraverso l'aggiunta del substrato MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) di colore giallo e le sua successiva trasformazione in formazano, sostanza con proprietà cromogeniche (blu/viola). Tra gli enzimi mitocondriali vi è il succinato deidrogenasi che è attiva solo nelle cellule vive per cui tanto maggiore è l'intensità del colore blu e maggiore saranno le cellule vive in coltura. L'analisi quantitativa viene effettuata attraverso la lettura spettrofotometrica a 570 nm e l'analisi dei dati si effettua attraverso il confronto tra le cellule trattate e le cellule di controllo.



Figura 7 Riduzione del MTT a Formazano. (Tratto da MTT assay, wikipedia)

Materiali:

- 12 mM di MTT preparandolo dalla fiala di MTT 5mg (componente A) con l'aggiunta di 1 mL PBS sterile.
- Soluzione di SDS (component B) aggiungendo 10 mL di HCl 0,01 M da utilizzare subito

Procedimento:

- Togliere il terreno di coltura e cambiarla con 100 uL di terreno fresco.
- Aggiungere 10 uL della soluzione 12 mM di MTT in ogni pozzetto e includere dei pozzetti negativi contenenti solo 10 uL di MTT 12 mM e 100 uL di terreno.
- Incubare a 37°C per 4 ore.
- Aggiungere 100 uL della soluzione SDS-HCL e mischiare delicatamente (non fare troppe bolle) utilizzando la pipetta.
- Incubare per altre 4 ore a 37°C nell'incubatore umidificato e agitare con la pipetta prima della lettura a 570nm.

1.5 Induzione dell'inflammatione

Per osservare gli eventuali effetti antinfiammatori dell'estratto di zenzero, bisogna innanzitutto indurre le cellule ad uno stato infiammato. Il trattamento è stato effettuato solo sulle HUVEC giovani in quanto le HUVEC nei passaggi più tardivi diventano senescenti ed acquisiscono un profilo infiammatorio.

A questo scopo è stato utilizzato il LipoPoliSaccaride (LPS), costituente della parete cellulare dei batteri gram negativi in grado di indurre una risposta infiammatoria attraverso il pathway che coinvolge la p38 MAPK e NF- κ B e il conseguente aumento d'espressione delle citochine, chemochine e molecole di adesione pro-infiammatorie. La concentrazione utilizzata è stata di 250 ng/mL incubata per 24 ore.

1.6 Trattamento con estratto di zenzero

L'estratto di zenzero è stato ottenuto attraverso l'estrazione con CO₂ supercritico e standardizzato per ottenere il 24,73% di gingeroli totali e 3,03% di shogaol totali. I composti volatili sono stati analizzati attraverso gas cromatografia accoppiata ad un rivelatore a ionizzazione su fiamma (GC-FID) e un rivelatore di spettrometria di massa (GC-MS).

La concentrazione più adatta per i trattamenti ottenuta dal saggio di vitalità MTT è stata di 10

Peak number	Compound	LRI	% Area
1	Ethyl butanoate	805	1.7 ± 0.9
2	α-pinene	933	1.5 ± 0.2
3	Camphene	947	4.1 ± 0.8
4	β-pinene	976	0.2 ^a
5	β-myrcene	988	0.3 ^a
6	Octanal	992	0.8 ± 0.1
7	α-phellandrene	1005	0.7 ± 0.2
8	β-thujene	1029	4.6 ± 1.1
9	1,8-cineole	1031	2.3 ± 0.4
10	Terpinolene	1088	0.3 ^a
11	β-linalool	1101	0.9 ^a
12	Endobomeol	1166	1.4 ± 0.1
13	Terpinen-4-ol	1178	0.3 ^a
14	α-terpineol	1191	0.8 ± 0.3
15	Verbenone	1208	0.7 ± 0.5
16	Neral	1246	0.9 ^a
17	Geraniol	1260	0.4 ± 0.2
18	Geranial	1275	1.5 ^a
19	α-copaene	1380	0.6 ± 0.2
20	β-elemene	1386	0.6 ^a
21	α-cedrene	1395	0.8 ± 0.3
22	α-gurjunene	1409	0.6 ± 0.3
23	α-bergamotene	1439	0.7 ± 0.2
24	β-farnesene	1461	0.8 ± 0.1
25	Aromadendrene	1468	0.5 ± 0.2
26	Germacrene D	1484	0.6 ± 0.2
27	α-curcumene	1488	6.2 ± 0.1
28	Zingiberene	1502	28.2 ± 0.3
29	γ-murolene	1505	2.3 ± 0.2
30	(E,E)-α-farnesene	1513	6.9 ^a
31	β-bisabolene	1515	4.3 ^a
32	β-sesquiphellandrene	1531	11.0 ± 0.2
33	δ-cadinene	1538	0.5 ^a
34	(E)-nerolidol	1560	0.1 ^a
35	Germacrene B	1568	0.4 ± 0.1
	TOTAL		88.6 ± 0.8

^a SD < 0.05

Figura 8 Composizione chimica della componente volatile dell'estratto di Zingiber Officinale. (Tratto da Zingiber officinale Roscoe rhizome extract alleviates neuropathic pain, Borgonetti V., 2020)

ug/mL. L'estratto di zenzero è stato utilizzato come pre-trattamento (4 ore di incubazione) prima dell'induzione con LPS sulle HUVEC giovani e come trattamento per 24 ore sulle HUVEC senescenti.

1.7 Valutazione della senescenza

L' aumentata attività dell'enzima β -galattosidasi (SA- β -Gal) a pH 6, è associata alle cellule senescenti ed è uno dei marcatori più utilizzati per determinare lo stato di senescenza. Infatti, all'aumentare dei passaggi e della senescenza replicativa, aumenta anche la presenza dell'enzima all'interno dei lisosomi. La valutazione della senescenza è effettuata al microscopio, calcolando la % di cellule SA- β -Gal negative e positive su un totale di almeno 200 cellule.

Materiale:

- Preparare la soluzione X-gal: pesare 20 mg di X-gal e dissolverlo in 1 mL di DMSO
- PBS
- Soluzione fissativa, Staining solution e Staining supplement (x100)

Procedimento:

- Rimuovere il terreno di coltura e lavare le cellule con 500 uL di PBS.
- Aggiungere 0,5 mL di fissativo per 10-15 minuti a T° ambiente
- Mentre il fissativo agisce, preparare il mix di staining solution considerando che per ogni pozzetto vanno 470 uL di Staining solution, 5 uL di Staining Supplement e 25 uL di X-gal in DMSO.
- Togliere il fissativo e lavare le cellule due volte con 1 mL di PBS
- Aggiungere 0,5 della mix Staining Solution ad ogni pozzetto, coprire la piastra con fogli di alluminio ed incubare overnight a 37°C.
- Per osservare le cellule ad un momento successivo, togliere la staining solution e fissare le cellule aggiungendo 70% di glicerolo.

2. RNA messaggeri e microRNA

2.1 Estrazione RNA

Per l'estrazione dell'RNA è stato utilizzato il kit Total RNA purification, Norgen Biotek Corp, Thorold, ON, Canada. Si può lavorare su HUVEC pellettate e scongelate all'interno di provette oppure su HUVEC in coltura su piastre, preventivamente tripsinizzate e lavate.

Procedimento lisi su piastra:

- Preparare una quantità di provette eppendorf in base al numero di campioni e annotare il nome del campione per il riconoscimento. Assemblare una quantità di colonnine e provette di raccolta in base al numero di campioni.

- Aggiungere 350 uL di buffer RL nei pozzetti e agitare delicatamente la piastra per 5 minuti.

- Trasferire il contenuto dei pozzetti nelle provette eppendorf e aggiungere 200 uL di etanolo 96-100%.

- Agitare con il vortex per 10 secondi e porre i campioni in ghiaccio.

** Nel caso di cellule in pellet, utilizzare direttamente le provette che lo contengono e procedere come sopra.*

- Trasferire fino a 600 uL di cellule lisate al centro del filtro delle colonnine e centrifugare a 6000 rpm per 1 minuto. Continuare questo passaggio fino all'esaurimento del campione.

- Svuotare il contenuto della provetta di raccolta che contiene gli scarti e riassemblare la colonnina (l'RNA è trattenuto nel filtro).

- Aggiungere 400 uL di soluzione di lavaggio (wash solution A) facendo attenzione che contenga etanolo e centrifugare a 11.000 rpm per 1 minuto.

- Svuotare il contenuto della provetta di raccolta e ripetere il passaggio per altre 2 volte.

- Centrifugare ulteriormente il campione a 13.000 rpm per asciugare la colonnina e scartare la provetta di raccolta trasferendo le colonnine su delle provette eppendorf pulite.

- Aggiungere fino a 50 uL di elution solution A in base alla quantità iniziale di cellule e centrifugare a 2000 rpm per 2 minuti, seguito da 1 minuto di centrifuga a 13.000 rpm.

** l'RNA può essere conservato a -20°C per alcuni giorni o a -70°C per periodi più lunghi.*

2.2 Retrotrascrizione RNA messaggeri

La retrotrascrizione è un processo che serve ad ottenere dei filamenti di DNA a doppio filamento chiamati cDNA (complementary) da uno stampo di RNA a singolo filamento. L'enzima chiamato reverse transcriptase è un DNA polimerasi RNA dipendente. La trasformazione in cDNA è necessaria poiché la polimerasi per l'amplificazione è DNA dipendente.

cDNA from mRNA

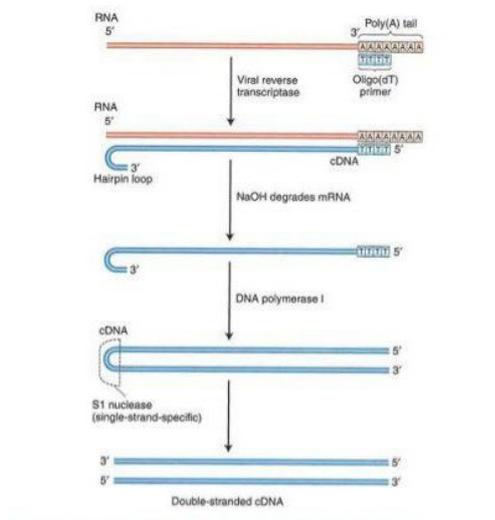


Figura 9 formazione del cDNA da un filamento di RNA. (Tratto da Histogenotech Company)

Nel nostro studio è stato utilizzato il kit PrimeScript RT reagent Kit con gDNA eraser (Perfect Real Time) di Takara che contiene due step di reazione. Nella prima fase avviene la degradazione del DNA in modo da togliere i contaminanti e nella seconda avviene la reazione di retrotrascrizione di tutte le regioni attraverso l'uso di primers random o primer oligodt (RT Primer Mix).

Procedimento:

- Prima di procedere con la reazione, bisogna standardizzare la quantità di RNA per ogni campione. Per scegliere la quantità di RNA adatta bisogna prendere in considerazione la concentrazione (ng o ug) più bassa di RNA risultata nella quantizzazione al nanodrop e moltiplicarla per 7. Dividere le concentrazioni di RNA per il numero ottenuto e come risultato si avrà il volume da prelevare per ogni campione. Riportare il volume di acqua da aggiungere per arrivare a 7 uL. Questo volume è specifico in quanto nella reazione di retrotrascrizione il volume totale è di 10 uL.

- Prendere il kit con i reagenti numerati da 1-6 e mantenerli in ghiaccio insieme ai campioni di RNA estratto.

- Utilizzare un rack metallico mantenuto a 4°C per evitare la degradazione degli acidi nucleici, sanificare la postazione di lavoro, le micropipette ed utilizzare puntali con filtro.
- Per ogni campione considerare 2 uL di 5X gDNA Eraser Buffer (2) e 1 uL di gDNA Eraser (1) e aggiungere tra i calcoli le quantità per 1 campione in eccesso. Una volta preparato il mix, aggiungere 3 uL al campione per ottenere i 10 uL totali.
- Incubare nel thermomixer a 42°C per 2 minuti.
- Nella seconda fase preparare il mix di reazione considerando che per ogni campione deve essere aggiunto 4 uL di 5x PrimeScript Buffer (4), 1 uL di PrimeScript RT Enzyme mix (3), 1 uL di RT Primer Mix (5) e 4 uL di RNase Free dH₂O. Per ottenere i volumi da prelevare, moltiplicare queste quantità per il numero di campioni e aggiungere 1 in eccesso.
- Aggiungere il mix ai campioni precedentemente trattati con gDNA eraser, centrifugare delicatamente e porre all'interno del termociclatore avviando il programma takara che dura 15 minuti.

2.3 Real Time PCR RNA messaggeri

Nella reazione di RT-PCR vengono utilizzati dei primer specifici che si legano alle sequenze complementari degli mRNA sul cDNA. Nel nostro caso abbiamo utilizzato i primer forward e reverse di IL-1 β , IL-8, IL-10, TNF- α , MCP-1, MMP-1, ICAM1 e p16. È stato utilizzato il kit TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) in grado di monitorare l'amplificazione Real Time attraverso l'intercalante TB Green. È incluso anche un RNase termoresistente in grado di minimizzare l'inibizione da parte di RNA residui. L'enzima Takara Ex Taq HS DNA polimerasi insieme al suo anticorpo inibente ottimizzano la reazione (Hot Start PCR) attivando l'amplificazione solo ad alte temperature. Questo per evitare l'amplificazione di appaiamenti errati che avvengono a temperature più basse.

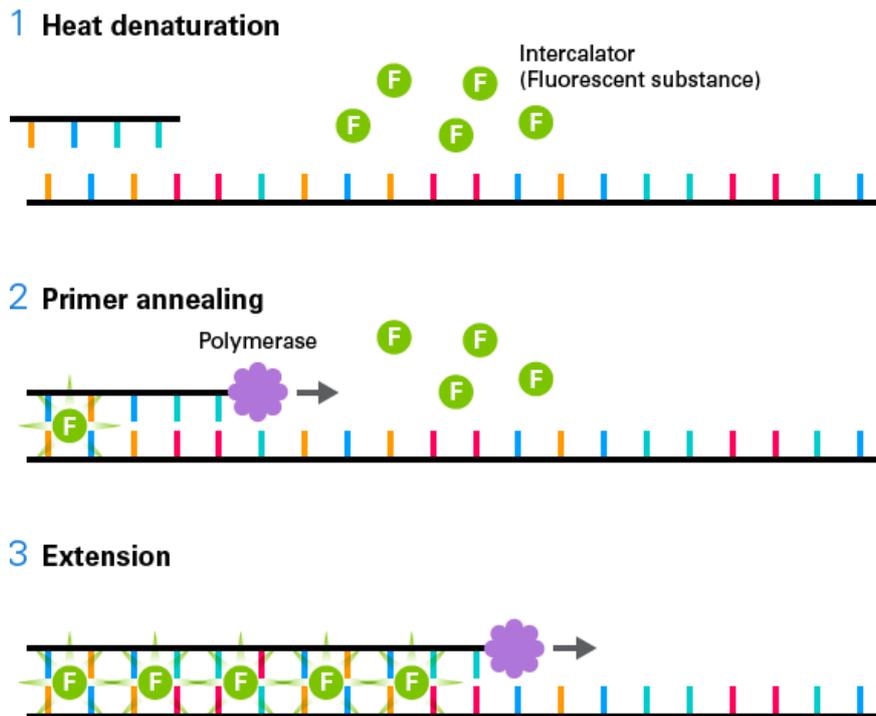


Figura 10 Attivazione della fluorescenza del TB Green. (Tratto da TakaraBio)

Procedimento:

- Preparare i reagenti TB Green Premix Ex Taq II (4°C), Forward e Reverse Primers (-20°C) e H₂O purificata sterile e porli in ghiaccio insieme alle provette contenenti cDNA.
- Sanificare il bancone con alcol e calcolare i volumi da prelevare dai reagenti per creare il master mix. Considerare i campioni in doppio e aggiungere 1 campione in eccesso. Per ogni campione considerare 5 uL di TB green, 0,2 uL di Forward Primer, 0,2 uL di Reverse Primer e 3,1 uL di H₂O purificata sterile. Preparare un numero di mix in base al numero di sequenze bersaglio.
- utilizzare un rack metallico mantenuto a freddo e preparare le provettine da PCR da 0,1 mL, ordinandole in colonna in base al primer.
- agitare i master mix al vortex e centrifugarli per avere una soluzione omogenea.
- Dispensare 8,5 uL di mix in ogni provetta e 1,5 di cDNA. È opportuno preparare una tabella con i primer in colonna e le coordinate dei campioni per evitare errori.
- Porre le provette nel RotorGene e avviare il programma Takara.

3. Proteine

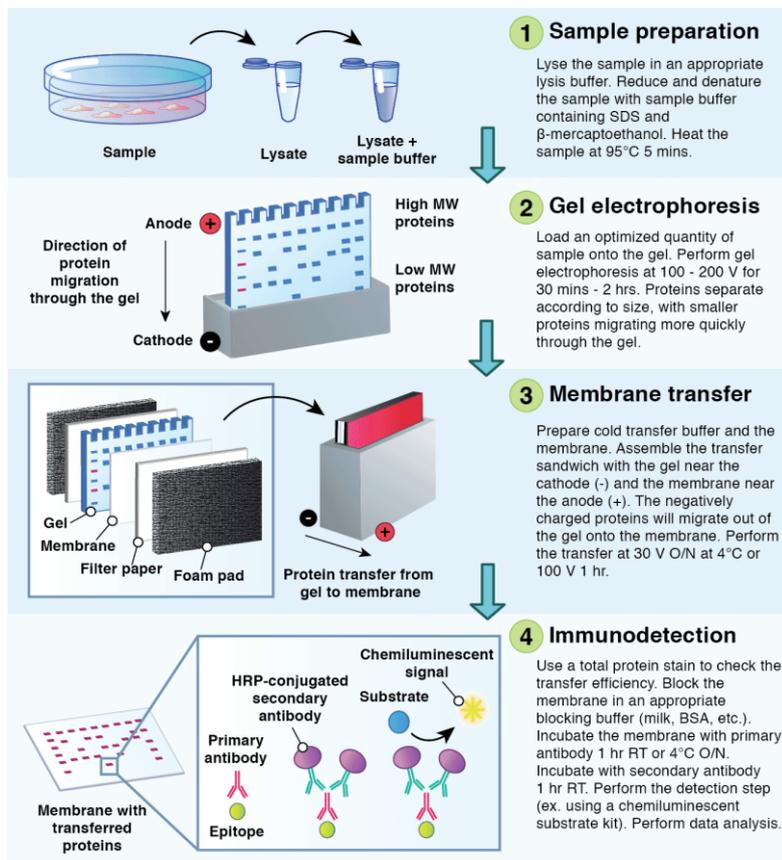


Figura 11 Processo analitico nello studio delle proteine. (Tratto da antibodies.com)

L'analisi delle proteine è costituita innanzitutto dalla liberazione delle proteine dalle cellule attraverso la lisi con il RIPA Buffer e la denaturazione termica e con β -mercaptoetanolo. Una volta denurate, le proteine migrano in elettroforesi attraverso il loro profilo elettrico correlato con il loro peso molecolare. Per poter visualizzare le proteine migrate, bisogna trasferirle su una membrana da trattare con anticorpi rilevabili in chemiluminescenza (Uvitec) e confrontare il profilo migratorio dei campioni con un marker di peso molecolare.

3.1 Estrazione proteine

Lisi delle cellule

- Accendere la centrifuga a 4°C

- preparare il RIPA buffer con detergente SDS e inibitori delle proteasi (14,3 uL ogni 100 uL di RIPA) considerando che per ogni campione vanno usati 15-20 uL.
- Aggiungere il RIPA Buffer nelle provette contenenti le cellule e lisare attraverso l'agitazione con la pipetta.
- Incubare in ghiaccio per 30 minuti vortexando le provette ogni 15 minuti.
- Centrifuga a 4°C per 20 minuti a 14.000 rpm.
- Trasferire il surnatante contenente le proteine in nuove provette eppendorf.

Quantizzazione proteine con il metodo Bradford

Coomassie Brilliant Blue si lega ai residui aminoacidici basici delle proteine. Si utilizza uno standard a concentrazione nota di BSA (Siero Albumina Bovina) 100mg/mL per costruire una curva di taratura.

- Diluire il Bradford 1:1 con H₂O autoclavata considerando 6 mL per la curva di taratura e 1 mL per ogni campione. Coprire la provetta con carta stagnola.
- preparare gli standard a concentrazione crescente seguendo la tabella.

BSA	Bradford + H ₂ O
0	1 mL
1 ug	999 uL
2 ug	998 uL
4 ug	996 uL
6 ug	994 uL
8 ug	992 uL

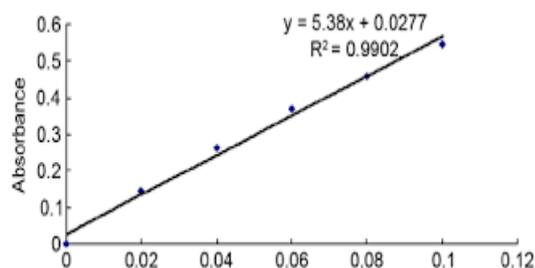


Figura 12 Esempio di curva standard

- in parallelo, preparare delle provette contenente 999 uL di Bradford + H₂O e 1 uL di campione.
- Preparare una piastra da 96 well e dispensare 200 uL in triplicato (600 uL tot) per ogni standard e campione.
- leggere le assorbanze allo spettrofotometro e analizzare i dati su Excel. Bisogna calcolare la media dei campioni in triplicato e costruire un grafico a dispersione dei risultati degli standard. Sull'asse delle ascisse la quantità di BSA e sull'asse delle ordinate le assorbanze. Creare una linea di tendenza e ricavare l'equazione R^2 . La Y rappresenta l'assorbanza mentre la x rappresenta la concentrazione. Una volta sostituita la Y con la media delle assorbanze per ogni campione, si troverà la quantità in mg delle proteine.

3.2 Corsa elettroforetica

Per la corsa elettroforetica solitamente si utilizzano 25 mg di proteine, quindi bisogna calcolare il volume da prelevare da ogni campione. Inoltre, bisogna considerare che il volume massimo del campione da caricare sul gel è di 20 uL di cui 5 uL di loading buffer. Solitamente il volume totale è meno di 20 uL e si aggiunge la differenza con acqua.

- Preparare il loading buffer considerando che servono 5 uL di Laemmli per campione, e 1:10 di β -mercaptoetanololo (4°C)
- Accendere il thermomixer a 95°C
- Preparare la soluzione con i campioni, il loading buffer e acqua e porre nel thermomixer per 5 minuti.
- Scongellare il marker (scala dei pesi molecolari), preparare il gel e l'apparecchio elettroforetico. Assemblare il gel adagiandolo all'interno della vaschetta verticale in plastica e togliere il pettine. Aggiungere il running buffer (tampone).
- Aggiungere il marker nel primo pozzetto e i campioni affianco (18 ul). Nei pozzetti vuoti aggiungere 5 uL di loading buffer per rendere la corsa lineare.
- Avviare la corsa a 100 V per circa 1 ora.

3.3 Western Blot

L'apparecchio di trasferimento è composto da una camera in cui porre la membrana, il gel e le spugnette assorbenti con il metodo sandwich. Il tutto avviene all'interno di un tampone che permette la creazione di una corrente elettrica. Il gel è posto dalla parte dell'anodo (-) mentre la membrana dalla parte del catodo (+). Le proteine cariche negativamente verranno attratte dal catodo e migreranno verso la membrana.

Procedimento:

- Aprire la vaschetta contenente il gel e trasferirlo sulla membrana già posizionata sul cassetto di trasferimento. Coprire con le spugnette imbevute di tampone e avviare l'apparecchio a 100 V per 1 ora.
- Raccogliere la membrana ed immergerla in una vaschetta contenente Rosso Ponceau, lasciare agire per un paio di minuti e sciacquare con abbondante H₂O distillata. Tagliare la membrana e scattare una foto.

3.4 Incubazione con anticorpi

Gli anticorpi primari sono conservati congelati e possono essere diluiti in TBS-T BSA (5%) o latte. Sono di derivazione murinica (rabbit/mouse).

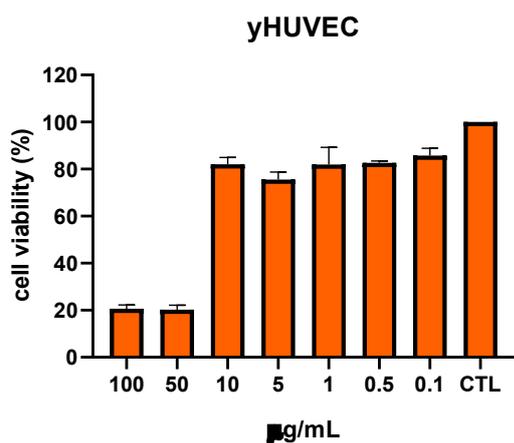
- Aggiungere l'anticorpo primario e incubare per 16 H a 4°C
- Rimuovere l'anticorpo primario ed effettuare 3 lavaggi, ognuna per 10 minuti in agitazione, con TBS-T.
- Aggiungere l'anticorpo secondario con HRP (enzima in grado di digerire un substrato per produrre chemiluminescenza).
- Incubare per 1 ora.
- Lavare 3 volte con TBS-T in agitazione per 10 minuti.
- Sviluppo all'Uvitec.

Risultati

1. Curva dose-risposta dell'estratto di zenzero nelle cellule endoteliali giovani e senescenti

Prima di valutare l'effetto anti-infiammatorio dell'estratto di zenzero sulle HUVEC, è stata effettuata una curva dose-risposta per valutarne eventuali effetti avversi sulla vitalità cellulare. Sono state testate le seguenti concentrazioni: 100-50-10-5-1-0.5-0.1 $\mu\text{g/ml}$ per 24h. Il saggio MTT per la vitalità cellulare ha permesso di ottenere delle curve di citotossicità e di individuare le concentrazioni ottimali per i successivi esperimenti. Come dose ideale, è stata presa in considerazione la più alta concentrazione che permette di mantenere una vitalità cellulare non inferiore all'80%, rispetto al controllo non trattato. In funzione di ciò, la concentrazione di 10 μM di estratto è stata individuata come ottimale sia per le cellule giovani (y HUVEC) (Fig 13A) che per le cellule in senescenza replicativa (sHUVEC) (Fig 13B).

A



B

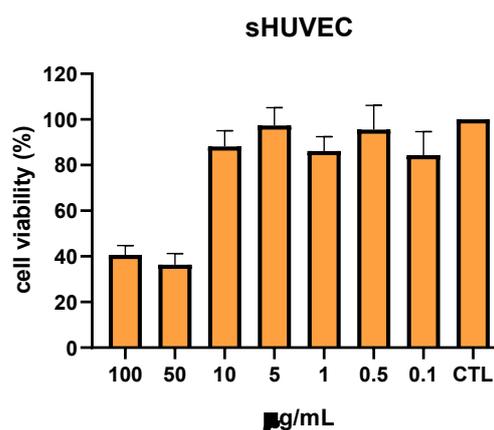


Figura 13 Saggio di vitalità cellulare dell'estratto di zenzero su cellule HUVEC giovani (A) e senescenti (B).

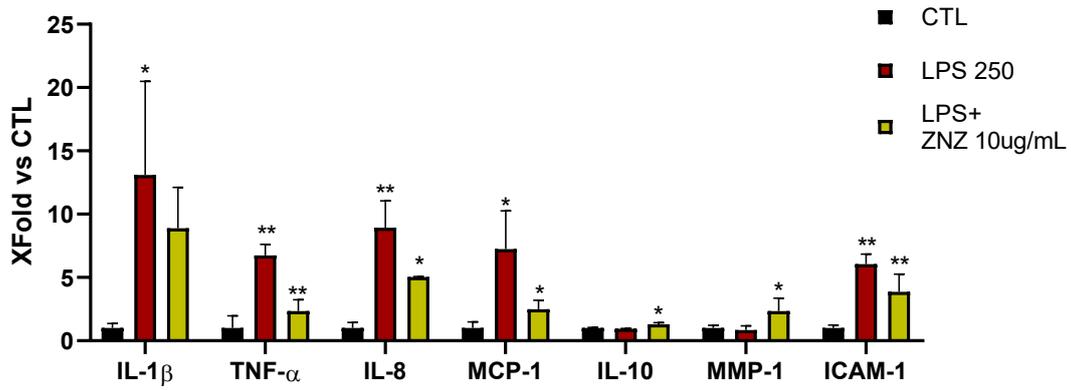
2. Effetto anti-infiammatorio dell'estratto di zenzero sulle HUVEC trattate con lipopolissaccaride (LPS)

Le HUVEC sono state pretrattate con l'estratto di zenzero (10 µg/ml); dopo quattro ore di pretrattamento, le cellule sono state esposte ad uno stimolo infiammatorio, quale l'LPS (250 ng/ml), mantenendo durante il trattamento con LPS le stesse concentrazioni dell'estratto. Dopo 24h, è stata valutata l'espressione delle molecole pro-infiammatorie quali IL-1 β e TNF- α , di chemochine (MCP-1 e IL-8), di molecole di adesione e metalloproteasi (ICAM-1 e MMP-1) e di molecole anti-infiammatorie (IL-10). Dopo il trattamento con LPS, le citochine IL-1 β , IL-8, TNF- α , così come MCP-1 e ICAM-1 risultano significativamente up-regolate rispetto alle HUVEC non trattate (CTL). Nelle cellule trattate con estratto di zenzero (10 µg/ml) si è osservata una significativa diminuzione dell'espressione delle molecole pro-infiammatorie e di adesione (MCP-1 e ICAM-1), ed un aumento significativo di IL-10 e MMP-1 rispetto alle HUVEC trattate con LPS (Fig. 14A).

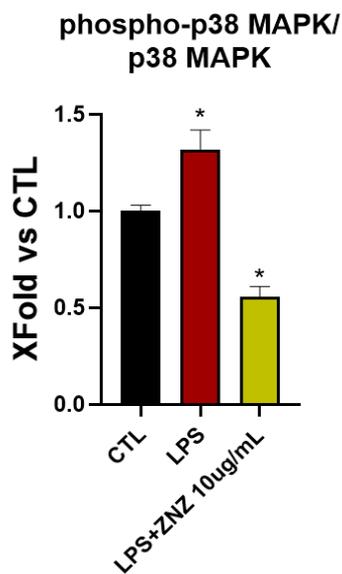
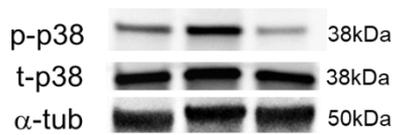
A livello di espressione proteica, le analisi di western blotting hanno rivelato un aumento di attività della MAP-chinasi p38 (indicato da un'umentata fosforilazione della proteina) nelle HUVEC trattate con LPS rispetto al CTL. L'estratto di zenzero è risultato in grado di ridurre significativamente l'attività di questo enzima (Fig. 14B).

A

young HUVEC



B



C

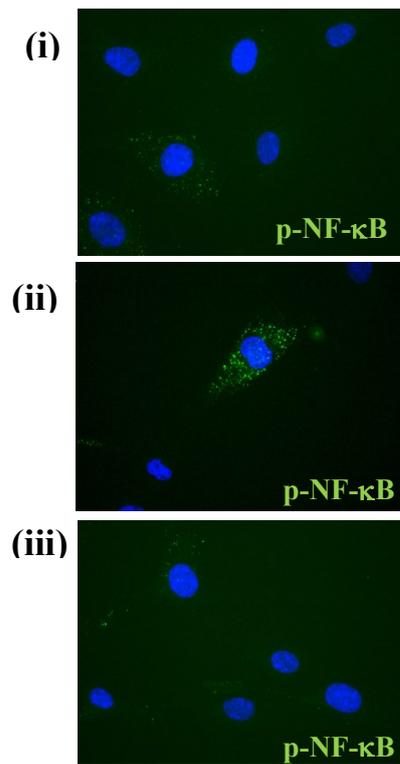


Figura 14 Valutazione dell'effetto anti-infiammatorio dell'estratto di zenzero nelle HUVEC trattate con lipopolissaccaride (LPS), mediante analisi dell'mRNA in RT-PCR (A), in western blot (B) e in immunofluorescenza (C). (i) HUVEC CTL; (ii) HUVEC LPS; (iii) HUVEC LPS+ZNZ

3. Effetto anti-infiammatorio dell'estratto di zenzero nelle HUVEC senescenti

Per valutare gli eventuali effetti anti-SASP dello zenzero, sono state analizzate cellule HUVEC in senescenza replicativa. In questo modello cellulare non è stata effettuata la stimolazione con LPS poiché le cellule senescenti acquisiscono il fenotipo secretorio di tipo pro-infiammatorio (SASP), molto simile alla risposta all'LPS. L'acquisizione del fenotipo senescente è stata verificata mediante valutazione della capacità replicativa (CPD) (Fig 15 (i)), e l'attività della β -galattosidasi a pH 6 (SA- β Gal) (Fig 15 (ii)). Le cellule senescenti al passaggio 19 (p19) sono risultate in arresto replicativo e hanno mostrato un'aumentata attività della SA- β Gal (Fig 15 (iii)).

A

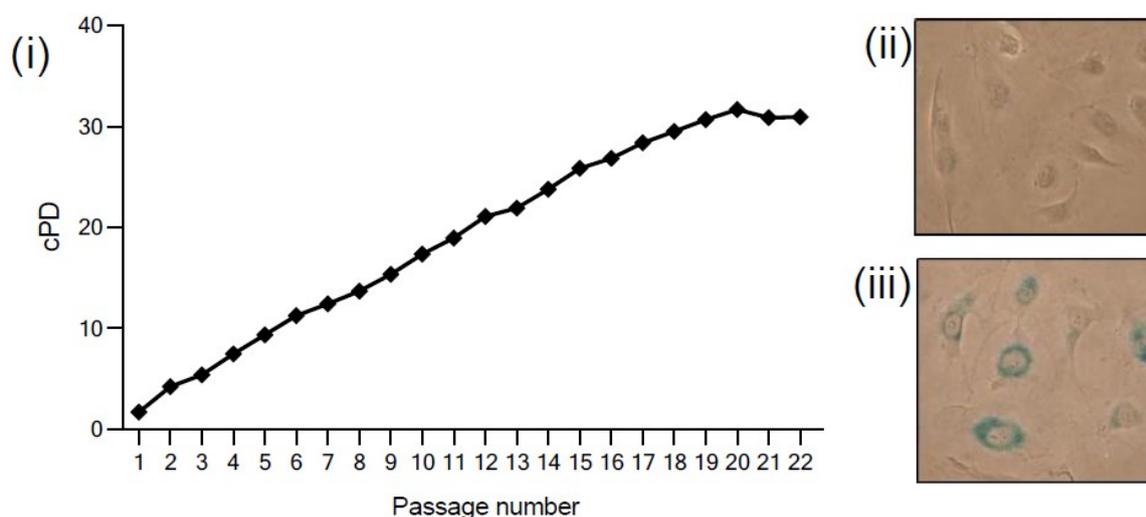


Figura 15 (A) Curva di population doubling cumulativa (CPD)(i) e immagine rappresentativa della SA- β -Gal in HUVEC giovani (ii) e senescenti (iii).

Come mostrato in figura 16, le HUVEC senescenti esprimono un profilo pro-infiammatorio notevolmente up-regolato rispetto alle HUVEC giovani.

Il trattamento delle HUVEC senescenti con l'estratto di zenzero (10 µg/ml) per 24 h, è risultato in grado di indurre una riduzione significativa di IL-1β, TNF-α, MCP-1, IL-8 e ICAM-1 rispetto alle HUVEC senescenti non trattate (Fig 15 B).

In linea con l'analisi di espressione genica delle molecole pro-infiammatorie, è stata effettuata l'analisi proteica con western blot del fattore di trascrizione (NF-κB). Le HUVEC senescenti mostrano un significativo aumento della fosforilazione della subunità p65 di NF-κB che viene significativamente ridotta dal trattamento con l'estratto di zenzero (Fig 15 C).

Infine, lo stesso risultato è stato confermato mediante immunofluorescenza (Fig 15 D).

B

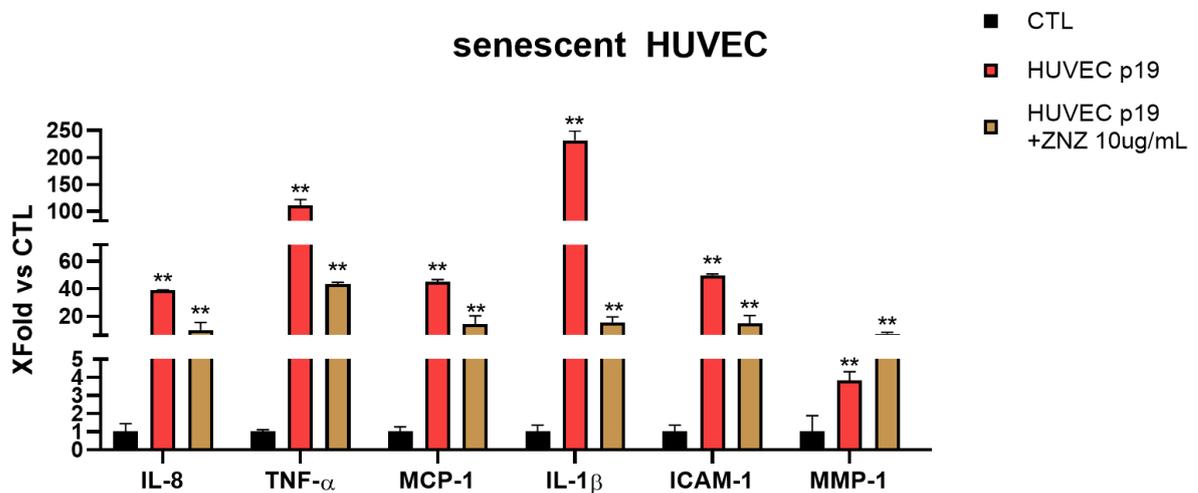


Figura 15 Valutazione dell'effetto anti-infiammatorio dell'estratto di zenzero nelle HUVEC senescenti. (B) Analisi dell'mRNA in RT-PCR.

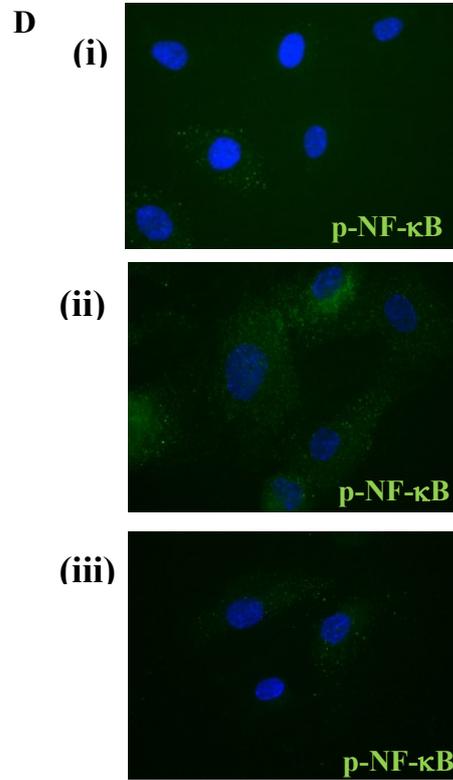
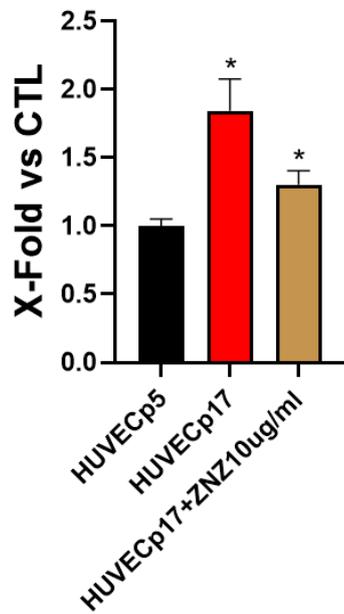
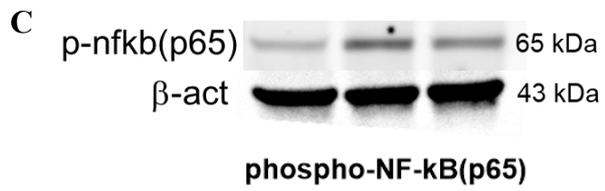


Figura 15 Valutazione dell'effetto anti-infiammatorio dell'estratto di zenzero nelle HUVEC senescenti. (C) analisi western blot e (D) immunofluorescenza. (i) HUVEC p5; (ii) HUVEC p19; (iii) HUVEC p19+ZNZ

4. La componente terpenica dell'estratto di zenzero come responsabile dell'effetto anti-infiammatorio nelle HUVEC trattate con LPS

L'estratto di radice di zenzero è costituito da una componente non-volatile costituita principalmente da gingeroli e shogaoli e una componente volatile, che costituisce circa il 30% dell'estratto, costituita da terpenoidi (zingiberene).

Mentre la componente non volatile è più nota e meglio caratterizzata, la componente terpenica (TPE) è stata meno caratterizzata.

Si è dunque voluto valutare l'effetto anti-infiammatorio della TPE nelle HUVEC giovani indotte ad uno stato infiammatorio mediante trattamento con LPS.

Le HUVEC sono state pretrattate con TPE (3 µg/ml); dopo quattro ore di pretrattamento, è stata indotta l'infiammazione con LPS (250 ng/ml), mantenendo le stesse concentrazioni di TPE.

Dopo 24h, è stata valutata l'espressione delle principali molecole pro-infiammatorie quali IL-1β e IL-8. Si è osservato che il TPE (3 µg/ml), ha indotto una significativa diminuzione dell'espressione delle molecole pro-infiammatorie IL-1β e IL-8 rispetto alle HUVEC trattate con solo LPS (Fig 16).

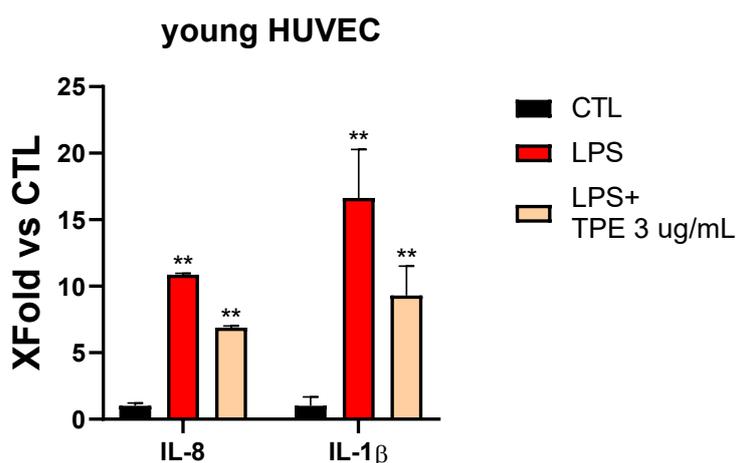


Figura 16 Valutazione dell'effetto anti-infiammatorio dell'estratto di zenzero nelle HUVEC trattate con lipopolissaccaride mediante analisi dell'mRNA in RT-PCR.

Discussione

L'aumento di uno stato infiammatorio cronico, definito *inflammaging*, è considerato tra i principali meccanismi promuoventi il processo d'invecchiamento e lo sviluppo di patologie età-associate, quali diabete di tipo 2, malattie cardiovascolari, disordini neurodegenerativi e cancro. Gli studi finora effettuati, sia *in vitro* che *in vivo*, hanno evidenziato che gli estratti naturali possiedono attività antinfiammatorie ed potrebbero quindi esercitare un'azione protettiva nei confronti dello sviluppo di queste patologie. I principi attivi contenuti negli estratti vegetali possono interagire con diversi pathways molecolari responsabili della trasduzione del segnale all'interno della cellula, modulando quindi l'espressione di geni pro-infiammatori, principalmente mediante l'interazione con il fattore di trascrizione NF- κ B (Santangelo C, 2007). L'interesse verso gli effetti benefici per la salute umana degli estratti vegetali è in crescente aumento, spingendo i ricercatori ad indagare i meccanismi molecolari attraverso i quali gli estratti vegetali possono modulare i pathways infiammatori.

Zingiber officinale Roscoe (Zingiberaceae), comunemente noto come zenzero, è una specie di origine asiatica appartenente alla stessa famiglia della curcuma ed è ampiamente usato come spezia. Diversi studi hanno dimostrato che il rizoma di *Z. officinale* possiede un'ampia gamma di azioni farmacologiche e può essere efficacemente utilizzato per il trattamento di una serie di sintomi del processo infiammatorio, quali dolore, gonfiore e sintomi gastrointestinali (Forouzanfar e Hosseinzadeh, 2018).

In questa tesi, è stata indagata l'attività anti-infiammatoria dell'estratto di zenzero sull'espressione di marker correlati all'infiammazione in cellule endoteliali umane quali le HUVEC, un modello cellulare utilizzato per gli studi sui determinanti molecolari della disfunzione endoteliale e sulle strategie per ridurla/prevenirla.

L'inflammation nelle cellule HUVEC è stata indotta mediante trattamento con lipopolisaccaride batterico (LPS), considerato tra i più potenti stimoli infiammatori.

Una delle principali novità di questo studio è la valutazione dell'effetto anti-SASP dello zenzero. Le HUVEC possono andare in senescenza replicativa, acquisendo il caratteristico fenotipo secretorio pro-infiammatorio (SASP).

Il risultato principale dello studio è che l'estratto di zenzero ha effetti anti-infiammatori sia nelle HUVEC trattate con LPS che nelle HUVEC in senescenza replicativa, dimostrati dalla significativa riduzione dell'espressione degli RNA messaggeri per numerose molecole infiammatorie (IL-1 β , TNF- α , MCP-1, IL-8 e ICAM-1). Questo dato è in linea con quelli della letteratura scientifica che mostrano l'attività antinfiammatoria dello zenzero.

Il dato sulla riduzione del fenotipo secretorio pro-infiammatorio delle cellule endoteliali senescenti indotto dal trattamento con lo zenzero è un dato innovativo e molto incoraggiante, nell'ottica di sviluppare strategie a lungo termine per ridurre gli effetti deleteri sulla salute umana dell'accumulo nel tempo di cellule senescenti con fenotipo SASP. Infatti sia l'eliminazione delle cellule senescenti che la riduzione del loro fenotipo secretorio SASP, possono essere a tutti gli effetti considerati non soltanto come strategie anti-invecchiamento ma anche quali strategie per ritardare lo sviluppo delle principali patologie età associate (ARDs).

Bibliografia

- Aiello A., et al (2019). Immunosenescence and Its Hallmarks: How to Oppose Aging Strategically? A Review of Potential Options for Therapeutic Intervention. *Frontiers in Immunology*.
- August H., et al (2006). The contribution of Rudolf Virchow to the concept of inflammation: what is still of importance? *Journal of Nephrology*.
- Baker R.G., et al (2011). NF- κ B, inflammation and metabolic disease. *Cell Metabolism*.
- Borgonetti V., et al (2020). Zingiber officinale Roscoe rhizome extract alleviates neuropathic pain. *Phytomedicine*.
- Bosma-den Boer M.M., et al (2012). Chronic inflammatory diseases are stimulated by current lifestyle: how diet, stress levels and medication prevent our body from recovering. *Nutrition and Metabolism*.
- Chakraborty D., et al (2012). [6]-Gingerol isolated from ginger attenuates sodium arsenite induced oxidative stress and plays a corrective role in improving insulin signaling in mice. *Toxicology letters*.
- Corre I., et al (2017). The p38 pathway, a major pleiotropic cascade that transduces stress and metastatic signals in endothelial cells. *Oncotarget*.
- Della Corte K.W., et al (2018). Effect of Dietary Sugar Intake on Biomarkers of Subclinical Inflammation: A Systematic Review and Meta-Analysis of Intervention Studies. *Nutrients*.
- Denk A., et al (2001). Activation of NF- κ B via the I κ B Kinase Complex Is Both Essential and Sufficient for Proinflammatory Gene Expression in Primary Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*.
- Duan Y., et al (2018). Inflammatory Links Between High Fat Diets and Diseases. *Frontiers in Immunology*.

- Ehrenreich H., et al (1990). Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *Journal of Experimental Medicine*.
- Fan S., et al (2000). Role of endothelin-1 in atherosclerosis. *Annals of The New York Academy of Sciences*.
- Feng L., et al. (2005). Chronic vascular inflammation in patients with type 2 diabetes: endothelial biopsy and RT-PCR analysis. *Diabetes care*.
- Firenzuoli F., et al (2007). Herbal Medicine Today: Clinical and Research Issues. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Franceschi C., et al (2000, June). Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*.
- Fulop T., et al (2018, dec). The integration of inflammaging in age-related diseases. *Seminars in Immunology*
- Fumagalli M., et al (2021). Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nature Cell Biology*.
- Gauthier M.L., et al (2013). Intrathecal [6]-gingerol administration alleviates peripherally induced neuropathic pain in male Sprague–Dawley rats. *Phytotherapy Research*.
- Gilmore T.D. (s.d.). NF-kB Target Genes. *Boston University Biology*.
- Hayflick L. (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell*
- Ho S.C., et al (2013). Anti-neuroinflammatory capacity of fresh ginger is attributed mainly to 10-gingerol. *Food Chemistry*.
- Jaul E., et al (2017). Age-Related Diseases and Clinical and Public Health Implications for the 85 Years Old and Over Population. *Frontiers in Public Health*.
- Kim J.H., et al (2009). [6]-Gingerol suppresses interleukin-1 β -induced MUC5AC gene expression in human airway epithelial cells. *American Journal of Rhinology and Allergy*.

- Lee S.W. et al (2011). Phenolic compounds isolated from *Zingiber officinale* roots inhibit cell adhesion. *Food Chemistry*.
- Lee T.Y., et al (2009). 6-Gingerol inhibits ROS and iNOS through the suppression of PKC- α and NF- κ B pathways in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Li X.H., et al (2013). Attenuation of proinflammatory responses by S-[6]-Gingerol via inhibition of ROS/NF-Kappa B/COX2 activation in HuH7 cells. *Hindawi Evidenced Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Li Y., et al (2012). Gingerols of *Zingiber officinale* enhance glucose uptake by increasing cell surface GLUT4 in cultured L6 myotubes. *Planta Medica*.
- Maguire J.J., et al (1998). Increased response to big endothelin-1 in atherosclerotic human coronary artery: functional evidence for up-regulation of endothelin-converting enzyme activity in disease. *British Journal of Pharmacology*.
- Mahady G.B., et al (2003). Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and the gingerols inhibit the growth of Cag A+ strains of *Helicobacter pylori*. *Anticancer Research*.
- Makukh K., et al (2015). Patients' compliance to phytotherapy prescribed and self-medicated with herbal medicines in Ukraine. *Farmatsiia*.
- Mantovani A., et al (2005). Macrophage polarization comes of age. *Immunity*.
- McHugh D, et al (2018). Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biology*.
- Medzhitov R. (2010). Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*.
- Muñoz-Espín D., et al (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature*.
- Nagoshi C., et al (2006). Synergistic effect of [10]-gingerol and aminoglycosides against vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*.
- Pahwa R., et al (2021). Chronic Inflammation. *StatPearls*.

- Pan M.H., et al (2008). 6-Shogaol suppressed lipopolysaccharide-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages. *Molecular Nutrition and Food Research*.
- Pan S.Y., et al (2014). Historical Perspective of Traditional Indigenous Medical Practices: The Current Renaissance and Conservation of Herbal Resources. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)*.
- Park M., et al (2008). Antibacterial activity of [10]-gingerol and [12]-gingerol isolated from ginger rhizome against periodontal bacteria. *Phytotherapy Research*.
- Petrovska B.B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Review*.
- Prattichizzo F., et al (2016, December 7). Senescence associated macrophages and "macrophaging": are they pieces of the same puzzle? *Aging*, 8(12):3159-3160. doi:10.18632/aging.101133)
- Rubanyi G.M. (1993). The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*.
- Santoro A., et al (2021, Nov). Immunosenescence and inflammaging in the aging process: age-related diseases or longevity? *Ageing Res Rev*. doi:10.1016/j.arr.2021.101422
- Shen X.H., et al (2013). Interleukin-8 prevents oxidative stress-induced human endothelial cell senescence via telomerase activation. *International Immunopharmacology*.
- Sherman P.W., et al (1999, June). Darwinian Gastronomy: Why We Use Spices: Spices taste good because they are good for us. *BioScience*.
- Shijin X., et al (2016). An Update on Inflamm-Aging: Mechanisms, Prevention, and Treatment. *Journal of Immunology Research*.
- Someya A., et al (2003). Modification of capsaicin-sensitive neurons in isolated guinea pig ileum by [6]-gingerol and lafutidine. *Journal of Pharmacological Science*.
- Sproston N.R., et al (2018). Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Frontiers in Immunology*.

- Stenvinkel P. (2001, Ottobre). Endothelial dysfunction and inflammation—is there a link? *Nephrology Dialysis Transplantation*, p. pagine 1968–1971.
- T Fulop., et al (2021). Immunology of Aging: the Birth of Inflammaging. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*.
- Tibuakuu M., et al (2017). The association between cigarette smoking and inflammation: The Genetic Epidemiology Network of Arteriopathy (GENOA) study. *PLOS ONE*.
- Tripathi S., et al (2007). Effect of 6-gingerol on pro-inflammatory cytokine production and costimulatory molecule expression in murine peritoneal macrophages. *Journal of Surgical Research*.
- Tzeng T.F., et al (2013). 6-Gingerol prevents adipogenesis and the accumulation of cytoplasmic lipid droplets in 3T3-L1 cells. *Phytomedicine*.
- Yamahara J., et al (1995). Pharmacological study on ginger processing. I. Antiallergic activity and cardiogenic action of gingerols and shogaols. *Natural Medicines*.
- Yang Y., et al (2014). Functional Roles of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in. *Hindawi*.
- Zhang Y.L., et al (2013). Anti-Helicobacter pylori effect of 6-gingerol in vitro. *Modern Food Science and Technology*.
- Zhang, C. (2008). The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Research in Cardiology*.