



**Università
degli Studi
di Palermo**

AREA RICERCA E TRASFERIMENTO TECNOLOGICO
SETTORE DOTTORATI E CONTRATTI PER LA RICERCA
U. O. DOTTORATI DI RICERCA

Dottorato in Scienze Molecolari e Biomolecolari
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche
Settore Scientifico Disciplinare BIOS-07/A

**VALORIZZAZIONE DI MATRICI VEGETALI E
SOTTOPRODOTTI AGROALIMENTARI: INDAGINE
FITOCHIMICA E STUDIO DELLE ATTIVITÀ BIOLOGICHE DI
BOSWELLIA SACRA FLUECK., FRUTTI DI SOMMACCO
(*RHUS CORIARIA* L.) E SEMI DI LAMPONE ROSSO (*RUBUS
IDAEUS* L.) PER APPLICAZIONI ORIENTATE ALLO
SVILUPPO DI INGREDIENTI NUTRACEUTICI INNOVATIVI
E SOSTENIBILI**

IL DOTTORE
LORENZA LA ROSA

IL COORDINATORE
PROF.SSA GIOVANNA PITARRESI

IL TUTOR
PROF.SSA CARLA GENTILE

IL CO-TUTOR
DOTT. ANDREA OCCHIPINTI



CICLO XXXVIII
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2025

INDICE

ABBREVIAZIONI	6
CAPITOLO 1.....	10
Introduzione generale.....	10
1.1 Alimentazione e salute: dalle esigenze nutrizionali alla prospettiva nutraceutica.....	11
1.2 Fitocomponenti biologicamente attivi: molecole vegetali a supporto del benessere umano.....	11
1.3 Stress ossidativo: definizione, cause e meccanismi cellulari	13
1.3.1 Ruolo e meccanismi d'azione degli antiossidanti cellulari e dietetici	14
1.3.2 Cross-talk tra stress ossidativo e infiammazione e contributo protettivo dei composti fitochimici.....	15
1.4 Scarti agroalimentari come fonte sostenibile di composti fitochimici.....	18
1.5 <i>Rubus idaeus</i> L.	19
1.6 <i>Rhus coriaria</i> L.	21
1.7 <i>Boswellia</i> spp.....	23
1.8.1 Potenziale farmacologico dei composti bioattivi di <i>Boswellia</i> spp.....	26
1.8.1.1 Attività antinfiammatoria	26
1.8.1.2 Attività antiossidante	27
1.8.1.3 Attività neuroprotettive	27
1.8.1.4 Attività cardioprotettive endotelio-mediate.....	28
1.8.1.5 Attività nelle malattie osteoarticolari	28
1.9 OBIETTIVO DELLA RICERCA	29
CAPITOLO 2.....	31
Valorizzazione di matrici vegetali autoctone e scarti agroindustriali: profilo fitochimico e attività biologiche del sommacco siciliano (<i>Rhus coriaria</i> L.) e della polvere di semi di lampone rosso (<i>Rubus idaeus</i> L.)	31
2.1 STATO DELL'ARTE E RAZIONALE DELLA RICERCA.....	32
2.2 MATERIALI E METODI.....	32
2.2.1 Matrici vegetali e preparazione degli estratti	32
2.2.2 Caratterizzazione fitochimica.....	33
2.2.2.1 Contenuto totale di polifenoli.....	33
2.2.2.2 Contenuto totale di proantocianidine	33
2.2.2.3 Contenuto totale di antocianine.....	34
2.2.2.4 Contenuto totale di carotenoidi	34
2.2.3 Profilo polifenolico.....	35
2.2.4 Proprietà redox-attive.....	35
2.2.4.1 Saggio ABTS.....	35

2.2.4.2 Saggio DPPH	36
2.2.4.3 Saggio FRAP.....	36
2.2.5 Colture cellulari.....	37
2.2.6 Cellular Antioxidant Activity assay (CAA).....	37
2.2.7 Attività antiproliferativa.....	38
2.2.8 Caratterizzazione microbiologica e determinazione dell'attività antibatterica	39
2.2.9 Analisi statistiche	40
2.3 RISULTATI E DISCUSSIONE	41
2.3.1 WRSP	41
2.3.1.1 Caratterizzazione fitochimica.....	41
2.3.1.2 Proprietà antiossidanti	45
2.3.1.3 Attività antiproliferativa	46
2.3.1.4 Valutazione microbiologica e attività antibatterica	47
2.3.2 SFE	49
2.3.2.1 Caratterizzazione fitochimica.....	49
2.3.2.2 Proprietà antiossidanti	50
2.3.2.3 Attività antiproliferativa	51
2.3.2.4 Valutazione microbiologica e attività antibatterica	52
2.4 CONCLUSIONI.....	54
CAPITOLO 3.....	56
Valutazione degli effetti dell'estratto della resina di <i>Boswellia sacra</i> sulle funzioni rigenerative delle cellule progenitrici endoteliali in un modello di endotelio vascolare...	56
3.1 CONTESTO FISIOPATOLOGICO	57
3.1.1 Il sistema vascolare e la sua capacità rigenerativa	57
3.1.2 Le cellule progenitrici endoteliali circolanti	58
3.1.3 Le cellule formanti colonie endoteliali come modello sperimentale per lo studio della funzione vascolare	59
3.2 STATO DELL'ARTE E RAZIONALE DELLA RICERCA	60
3.3 MATERIALI E METODI.....	60
3.3.1 Campione vegetale	60
3.3.2 Preparazione del campione per le analisi cromatografiche	61
3.3.3 Analisi quali-quantitativa degli acidi boswellici mediante HPCL-MS/PDA.....	61
3.3.4 Analisi quali-quantitativa dei terpeni volatili e semivolatili mediante GC-MS/FID	61
3.3.5 Isolamento e condizioni di coltura delle cellule endoteliali.....	62
3.3.6 Caratterizzazione delle CB-ECFC.....	62
3.3.7 Saggio di vitalità cellulare	62

3.3.8 Analisi citofluorimetrica dei marker di attivazione endoteliale.....	63
3.3.9 Saggio <i>Wound Healing</i>	63
3.3.10 Saggio di migrazione Transwell	64
3.3.11 Produzione di ossido nitrico (NO).....	64
3.3.12 Saggio di angiogenesi <i>in vitro</i>	64
3.3.13 Analisi statistiche	65
3.4 RISULTATI	66
3.4.1 Caratterizzazione chimica di BFE	66
3.4.2 Caratterizzazione delle CB-ECFC.....	68
3.4.4 Effetti del trattamento con BFE sulla proliferazione delle CB-ECFC.....	68
3.4.5 Espressione di VCAM-1 e ICAM-1 nelle CB-ECFC trattate con BFE.....	69
3.4.6 Effetti del trattamento con BFE sulla migrazione e la mobilità delle CB-ECFC.....	70
3.4.7 Effetti del trattamento con BFE sulla produzione di NO delle CB-ECFC.....	72
3.4.8 Analisi della capacità tubulogenica delle CB-ECFC in presenza di BFE	73
3.5 DISCUSSIONE	74
3.6 CONCLUSIONI	78
CAPITOLO 4.....	80
Potenziale neuroprotettivo dell'estratto di <i>Boswellia sacra</i> in un modello di astrociti primari murini sottoposti a stress ossidativo, osmotico e nutrizionale: studio dei pathways molecolari coinvolti	80
4.1 CONTESTO FISIOPATOLOGICO	81
4.1.1 Le malattie neurodegenerative: meccanismi patogenetici e rilevanza clinica	81
4.1.2 Il ruolo degli astrociti nella fisiopatologia del SNC.....	82
4.2 STATO DELL'ARTE E RAZIONALE DELLA RICERCA	83
4.3 MATERIALI E METODI.....	83
4.3.1 Preparazione dell'estratto etanologico di <i>Boswellia sacra</i>	83
4.3.2 Caratterizzazione chimica del semilavorato di <i>Boswellia sacra</i>	84
4.3.3 Coltura cellulare.....	84
4.3.4 Modelli <i>in vitro</i> di stress cellulare	84
4.3.5 Design sperimentale dei modelli di stress cellulare e protocolli di trattamento	85
4.3.6 Saggio di vitalità cellulare	87
4.3.7 Saggio di immunofluorescenza.....	87
4.3.8 Analisi Western blot.....	88
4.3.9 TUNEL test.....	89
4.3.10 Analisi statistica	89
4.4 RISULTATI	90

4.4.1 Caratterizzazione chimica del semilavorato di <i>Boswellia sacra</i>	90
4.4.2 Effetti di BSE sulla proliferazione e sulla vitalità cellulare degli astrociti in condizioni standard	90
4.4.3 Effetti di BSE sulla morfologia e sull'organizzazione del citoscheletro degli astrociti in condizioni standard	91
4.4.4 Proprietà antiossidanti di BSE	92
4.4.5 Effetti di BSE sulla vitalità cellulare degli astrociti in condizioni di stress singolo e stress multifattoriale	93
4.4.6 Attività anti-apoptotica di BSE in condizioni di stress ossidativo associato a stress nutrizionale (test TUNEL e cleaved caspase-7)	96
4.4.7 Valutazione dei pathway molecolari in cellule sottoposte a stress ossidativo (indotto da EtOH) associato a stress nutrizionale	100
4.4.7.1 Effetti di BSE sull'espressione di marker infiammatori (iNOS, COX-2, p-IkB α /IkB α)	100
4.4.7.2 Effetti di BSE sull'espressione di marker antiossidanti (Nrf2)	103
4.4.7.3 Effetti di BSE sull'espressione di marker autofagici (p62, LC3-II/LC3-I)	104
4.5 DISCUSSIONE	106
4.6 LIMITI DELLO STUDIO	115
4.7 CONCLUSIONI	116
CAPITOLO 5	119
Potenziale condroprotettivo dell'estratto e delle frazioni purificate di <i>Boswellia sacra</i> su condrociti primari umani in un modello <i>in vitro</i> di osteoartrite	119
5.1 CONTESTO FISIOPATOLOGICO	120
5.1.1 Meccanismi patogenetici e rilevanza clinica dell'osteoartrite	120
5.2 STATO DELL'ARTE E RAZIONALE DELLO STUDIO	121
5.3 MATERIALI E METODI	121
5.3.1 Preparazione degli estratti di <i>Boswellia sacra</i>	121
5.3.1.1 Estratto della resina di <i>Boswellia sacra</i>	121
5.3.1.2 Estratto arricchito in cembreni	122
5.3.2 Caratterizzazione chimica di CE	122
5.3.3 Coltura cellulare e trattamento delle cellule HCH	122
5.3.4 Saggio di vitalità cellulare	123
5.3.5 Rilevamento di IL-6, ROS, TNF- α	123
5.3.6 Saggi ELISA	124
5.3.7 Analisi statistiche	124
5.4 RISULTATI	125
5.4.1 Caratterizzazione chimica della frazione arricchita in cembreni	125

5.4.2 Effetti di BSE sulla vitalità delle cellule HCH in condizioni standard e nel modello di OA ..	125
5.4.3 Effetti di BSE sulla risposta infiammatoria e sullo stress ossidativo nel modello di OA	126
5.4.3.1 Effetto delle singole frazioni purificate dall'estratto di <i>B. sacra</i> sulla produzione di IL-6 nel modello di OA.....	128
5.4.4 Effetti di BSE sull'espressione delle metalloproteinasi nel modello di OA	129
5.5 DISCUSSIONE	130
5.6 CONCLUSIONI	135
6. CONCLUSIONI GENERALI	137
BIGLIOGRAFIA.....	139

ABBREVIAZIONI

ABA	Acido α -boswellico
ABAP	2,2'-Azobis(2-metilpropionamidina) dicloridrato
ABTS	Acido 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-solfonico)
A-ABA	Acido 3-O-acetil- α -boswellico
A-BBA	Acido 3-O-acetil- β -boswellico
AKBA	Acido 3-O-acetil-11-cheto- β -boswellico
APB	Sangue periferico adulto
BA	Acidi boswellici
BAE	Estratto di acidi boswellici
BBA	Acido β -boswellico
BCE	Equivalenti di β -carotene
BFE	Estratto fluido di BosLiq
BM	Midollo osseo
BSA	Albumina sierica bovina
BSE	Estratto di Boswellia sacra
CAA	Attività antiossidante cellulare
CAT	Catalasi
CB	Sangue cordonale
CB-EPC	Cellule progenitrici endoteliali da sangue cordonale
cGMP	Guanosina monofosfato ciclica
CE	Equivalenti di glucoside di cianidina
CE	Estratto di cembreni
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)dimetilammonio]-1-propansulfonato
COX	Ciclossigenasi
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]ottano
DAF	4,5-diaminofluoresceina

DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindolo
DCFH-DA	Diacetato di diclorodidrofluoresceina
DMAC	N,N-Dimetilacetamide
DMEM	Mezzo di coltura Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilidrazile
DW	Peso secco
DTT	Ditiotreitolo
EBM2	Mezzo basale endoteliale 2
EC	Cellule endoteliali
ECFC	Cellule formanti colonie endoteliali
ECM	Matrice extracellulare
EGM2	Mezzo di crescita endoteliale 2
eNOS	Ossido nitrico sintasi endoteliale
EPC	Cellule progenitrici endoteliali
FRAP	Capacità ferrica antiossidante
GC-MS/FID	Gas cromatografia gas-spettrometria di massa/ionizzazione di fiamma
GA	Acido gallico
GAE	Equivalenti di acido gallico
GFAP	Proteina acida fibrillare gliale
GPx	Glutazione perossidasi
GSH	Glutazione ridotto
HBSS	Soluzione salina equilibrata di Hanks
HCH	Condrociti umani
HPLC-MS/PDA	Cromatografia liquida ad alte prestazioni/spettrometria di massa/rivelatore a diodo
HUVEC	Cellule endoteliali della vena ombelicale umana
ICAM	Molecola di adesione cellulare intercellulare
IL	Interleuchina
iNOS	Ossido nitrico sintasi inducibile

KBA	Acido 11-cheto- β -boswellico
Keap1	Proteina 1 associata al dominio Kelch
LC3	Proteina 1A/1B associata ai microtubuli – catena leggera 3
LPS	Lipopolisaccaride
MFI	Intensità fluorescente media
mL	Millilitro
MMP	Metalloproteinasasi della matrice
MSC	Cellule staminali mesenchimali
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
MTT	Bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NF- κ B	Fattore nucleare kappa B
ng	nanogrammo
NO	Ossido nitrico
NOS	Ossido nitrico sintasi
Nrf2	Fattore nucleare eritroide 2 correlato 2
OD	Densità ottica
PACE	Equivalenti di proantocianidine di tipo A
PBS	Tampone salino fosfato
PFA	Paraformaldeide
RO	Olio di riso
RNS	Specie reattive dell'azoto
ROS	Specie reattive dell'ossigeno
SCR	Specie reattive chimiche
SDS-PAGE	Elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecil solfato
SFE	Estratto di frutti di sommacco
SNC	Sistema nervoso centrale
SOD	Superossido dismutasi

TAC	Contenuto totale di antocianine
TCC	Contenuto totale di carotenoidi
TE	Equivalenti di Trolox
TLC	Cromatografia su strato sottile
TNF- α	Fattore di necrosi tumorale alfa
TNFR-1	Recettore 1 del fattore di necrosi tumorale
TPAC	Contenuto totale di proantocianidine
TPC	Contenuto totale di polifenoli
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
VCAM	Molecola di adesione cellulare vascolare
VEGF	Fattore di crescita endoteliale vascolare
WRSP	Polvere di semi di lampone di scarto
μg	Microgrammo
μl	Microlitro

CAPITOLO 1

Introduzione generale

1.1 Alimentazione e salute: dalle esigenze nutrizionali alla prospettiva nutraceutica

Nel corso del XX secolo, il concetto della relazione tra alimentazione e salute è stato progressivamente ridefinito. In questo periodo, sono stati identificati i nutrienti essenziali e definite raccomandazioni nutrizionali precise che hanno permesso di stabilire i parametri di riferimento per una dieta equilibrata. Si è compreso che non solo le carenze, ma anche l'eccessivo apporto di determinati nutrienti può esercitare un impatto negativo sulla salute, contribuendo all'insorgenza di malattie cronico-degenerative. Da queste osservazioni è emersa l'idea di un'alimentazione bilanciata, intesa come una combinazione appropriata di alimenti in grado di soddisfare i bisogni metabolici e di supportare le funzioni fisiologiche dell'organismo [1].

Con l'ingresso nel XXI secolo, le esigenze nutrizionali si sono ulteriormente ampliate. L'invecchiamento demografico, insieme ai cambiamenti ambientali e l'adozione di stili di vita tipici delle società industrializzate, hanno contribuito all'aumento dell'incidenza di patologie croniche, tra cui quelle cardiovascolari e metaboliche, determinando un notevole impatto sui sistemi sanitari e una maggiore richiesta di interventi preventivi efficaci. Parallelamente, è maturata una crescente consapevolezza del ruolo del cibo come determinante di salute pubblica. In questa visione, la nutrizione non è più considerata unicamente come mezzo di sostentamento energetico dell'organismo, ma come strumento attivo per la promozione del benessere complessivo e la prevenzione primaria delle patologie. Ne deriva il concetto di alimentazione "attiva" e "funzionale", che attribuisce agli alimenti e ai loro costituenti un ruolo diretto nel mantenimento della salute [2].

Il ruolo attivo e funzionale dell'alimentazione è attribuito ai cosiddetti composti bioattivi, sostanze non nutrienti in senso classico, ma dotate di specifiche attività biologiche in grado di modulare varie funzioni dell'organismo [3]. Il termine "nutraceutica", coniato dal Dott. De Felice nel 1989, dall'unione delle parole "nutrizione" e "farmaceutica", riflette questa nuova prospettiva, sottolineando il ruolo preventivo e, in alcuni casi, terapeutico di alimenti specifici (alimenti funzionali) o dei loro componenti (nutraceutici).

1.2 Fitocomponenti biologicamente attivi: molecole vegetali a supporto del benessere umano

All'interno dei composti bioattivi, una posizione di rilievo spetta a quelli contenuti negli alimenti di origine vegetale, noti come composti fitochimici. Si tratta di metaboliti secondari prodotti dalle piante, la cui funzione primaria consiste nella protezione e nell'adattamento della

pianta a stress ambientali e agenti patogeni. Assunti attraverso la dieta, questi composti possono contribuire a effetti benefici sulla salute umana, modulando diverse funzioni fisiologiche [4]. Attualmente, sono circa 10.000 le sostanze fitochimiche individuate nelle piante, ma è plausibile che molte ancora restino da caratterizzare, data la complessità dei metaboliti secondari [5]. Nonostante l'ampia variabilità nella struttura chimica e nella distribuzione, tutte queste sostanze sono molecole organiche, generalmente a basso peso molecolare. Pur non essendo nutrienti essenziali secondo la definizione classica, questi composti possono apportare benefici sulla salute, modulando diverse vie metaboliche, segnali cellulari e sistemi antiossidanti [6].

Per facilitare la comprensione e lo studio di queste sostanze, i composti fitochimici vengono generalmente raggruppati nelle seguenti categorie principali: alcaloidi, caratterizzati dalla presenza di azoto; fitosteroli, coinvolti nella modulazione del metabolismo lipidico; carotenoidi, responsabili della pigmentazione e dotati di attività antiossidante; composti organosolforati, presenti in crucifere e noti per le loro proprietà antitumorali; terpeni, una vasta e strutturalmente eterogenea classe di molecole derivate dall'isoprene, dotate di proprietà antinfiammatorie e antiossidanti. Infine, i polifenoli, nonché la classe più diffusa e maggiormente assunta tramite l'alimentazione [7]. Tra i polifenoli, le principali sottoclassi comprendono i flavonoidi, gli acidi fenolici, gli stilbeni e i lignani (Figura 1). Dal punto di vista strutturale, i polifenoli sono derivati dall'anello benzenico e presentano uno o più gruppi ossidrilici legati all'anello aromatico, caratteristiche che conferiscono loro elevate proprietà redox e la capacità di neutralizzare specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto [8].

Nel loro insieme, la molteplicità di attività biologiche attribuite ai composti fitochimici fornisce una solida base scientifica alla correlazione inversa tra il consumo regolare di frutta e verdura e una minore incidenza di malattie cronico-degenerative associate a condizioni di stress ossidativo protratto nel tempo [9].

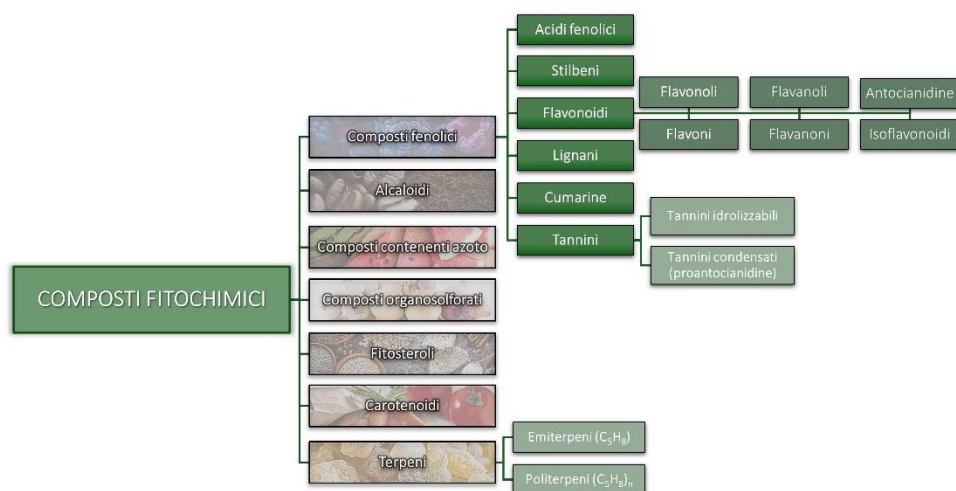


Figura 1. Classificazione dei composti fitochimici (elaborazione grafica di propria realizzazione).

1.3 Stress ossidativo: definizione, cause e meccanismi cellulari

Il termine stress ossidativo descrive l'insieme di alterazioni cellulari, tissutali e molecolari che si manifestano quando l'equilibrio redox viene compromesso a favore degli agenti ossidanti. Negli organismi aerobi, esiste un delicato equilibrio ossido-riduttivo, tra la produzione di sostanze ossidanti e il sistema di difesa antiossidante. I processi metabolici, in particolare quelli legati alla respirazione mitocondriale e al catabolismo dei nutrienti, generano fisiologicamente specie ossidanti. La produzione di queste specie può inoltre essere significativamente amplificata in risposta a diversi fattori esogeni. Questi includono agenti fisici (radiazioni UV e ionizzanti) e chimici (fumo, alcol, farmaci, pesticidi e altri inquinanti di varia natura), ma anche regimi dietetici sbilanciati, così come l'attività fisica di grande intensità [10].

Le specie reattive chimiche (SCR) comprendono molecole e ioni altamente instabili, caratterizzati da una spiccata reattività che li porta a interagire con facilità con altri composti. In base all'elemento chimico responsabile della loro attività, le SCR vengono distinte principalmente in specie reattive dell'ossigeno (ROS) e specie reattive dell'azoto (RNS). Entrambe le classi comprendono sia forme radicaliche, aventi uno o più elettroni spaiati, sia forme non radicaliche, in cui tutti gli elettroni risultano appaiati e impegnati in legami covalenti [11], [12]. Tra le forme radicaliche, i radicali liberi sono un sottogruppo delle SCR e si distinguono per la presenza di un elettrone singolo nell'orbitale più esterno, che li rende particolarmente instabili e reattivi. Questa instabilità li induce a sottrarre elettroni da altre

molecole – come proteine, lipidi, zuccheri o acidi nucleici – ossidandole, nel tentativo di acquisire stabilità. In tal modo vengono prodotti altri radicali liberi attraverso reazioni che si propagano a catena. Le SRC di natura non radicalica, invece, possiedono una configurazione elettronica stabile e, pur essendo reattive, non presentano elettroni spaiati.

Le ROS sono i radicali liberi a maggior diffusione. Tra le ROS figurano l'anione superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H_2O_2) e il radicale ossidrilico ($-OH$); mentre tra le RNS, l'ossido nitrico (NO) e il perossinitrito ($ONOO^-$), entrambi coinvolti in numerosi processi fisiologici e patologici.

Prove crescenti indicano che elevati livelli di SRC sono generalmente accettati per causare danni cellulari e promuovere l'invecchiamento, mentre concentrazioni moderate di queste possono piuttosto migliorare i meccanismi di difesa inducendo una risposta adattativa, partecipando a processi fisiologici essenziali quali la trasduzione del segnale, la regolazione genica, la proliferazione e differenziamento cellulare e il mantenimento dell'omeostasi mitocondriale. Questo fenomeno è stato definito ormesi mitocondriale o mitoormesi [13].

1.3.1 Ruolo e meccanismi d'azione degli antiossidanti cellulari e dietetici

Il termine antiossidante indica molecole capaci di stabilizzare o disattivare i radicali liberi prima che essi danneggino le cellule. Le cellule dispongono di meccanismi antiossidanti enzimatici e non enzimatici. Tra quelli enzimatici figurano la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT) e la glutazione perossidasi (GPx), che neutralizzano specifiche SRC attraverso reazioni chimiche precise. Gli antiossidanti non enzimatici, invece, comprendono molecole a basso peso molecolare come l'acido ascorbico, la vitamina E e l'acido lipoico, in grado di agire come donatori di elettroni e stabilizzare i radicali liberi.

Gli antiossidanti si distinguono ulteriormente in base alla loro origine in sistemi endogeni (difese antiossidanti solubili) prodotti dalla cellula (ad esempio glutazione e melatonina), ed esogeni assunti in parte dalla dieta o tramite integratori alimentari. Le difese antiossidanti cellulari possono quindi essere incrementate assumendo, attraverso l'alimentazione, molecole antiossidanti come lo sono molti composti fitochimici [14].

Le proprietà redox-attive dei composti fitochimici sono dettate dalla loro struttura chimica, grazie alla quale queste molecole possono cedere elettroni a specie ossidanti con conseguente stabilizzazione dell'agente ossidante e contestuale formazione di un prodotto ossidato stabile. Ad esempio, i composti fenolici possiedono anelli aromatici che facilitano la stabilizzazione per risonanza del radicale fenossilico formatosi dopo il trasferimento di un elettrone alla specie reattiva [15]. Polifenoli come l'acido gallico, le catechine e le proantocianidine, grazie alla

presenza di gruppi ossidrilici in posizione orto o para, generano strutture chinoidi particolarmente stabili in seguito al trasferimento elettronico.

Numerosi dati sperimentali dimostrano che la capacità dei composti antiossidanti della dieta di influenzare positivamente il bilancio redox-cellulare, non dipende soltanto dalla capacità di neutralizzare le specie reattive attraverso un'azione scavenger diretta, ma anche dalla loro capacità di modulare l'espressione e l'attività delle difese antiossidanti enzimatiche [16]. Questa modulazione può derivare sia dall'interazione diretta con l'enzima antiossidante, che ne influenza l'attività, sia dall'induzione genica di enzimi antiossidanti, un processo che potrebbe coinvolgere il riconoscimento di specifiche sequenze regolatorie ARE (Antioxidant Response Elements) localizzate nelle regioni promotrici di geni che guidano la risposta intracellulare contro lo stress ossidativo [17].

Va inoltre sottolineato che, poiché anche minime alterazioni del bilancio redox cellulare influenzano la struttura e quindi la funzione di vari target redox-sensibili, i composti fitochimici non solo proteggono dai fenomeni di stress ossidativo, ma sono in grado di influenzare numerose vie segnalazione chiave, comprese quelle coinvolte nella regolazione dei processi infiammatori [9], [18].

1.3.2 Cross-talk tra stress ossidativo e infiammazione e contributo protettivo dei composti fitochimici

L'intima interdipendenza tra stress ossidativo e infiammazione rappresenta un meccanismo cruciale nella genesi e nell'evoluzione di molte malattie cronico-degenerative, comprese quelle cardiovascolari, neurodegenerative, osteoarticolari e metaboliche [19].

A livello molecolare, l'aumentata produzione di ROS interviene non solo come agente dannoso per macromolecole cellulari, ma anche come segnale intracellulare in grado di attivare specifiche vie trascrizionali pro-infiammatorie, come quella mediata dal fattore nucleare κ B (NF- κ B). L'attivazione di NF- κ B promuove la trascrizione dei geni codificanti per citochine pro-infiammatorie, tra cui il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α), l'interleuchina-1 beta (IL-1 β) e l'interleuchina-6 (IL-6), chemochine ed enzimi pro-infiammatori quali la cicloossigenasi-2 (COX-2) e la ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS), contribuendo all'amplificazione della risposta infiammatoria. Le modalità attraverso cui le ROS modulano questa via includono modificazioni ossidative dirette dei componenti del segnale, la fosforilazione dell'inibitore I κ B α e l'attivazione di chinasi redox-sensibili [20].

La cellula dispone di meccanismi antiossidanti adattativi, tra cui il sistema Keap1/Nrf2, che rappresenta un asse chiave della risposta redox. In condizioni fisiologiche, Nrf2 (nuclear factor

erythroid 2-related factor 2) è legato al repressore Keap1 nel citoplasma, che ne favorisce la degradazione proteasomiale. In presenza di stress ossidativo, Nrf2 si dissocia da Keap1, trasloca nel nucleo e si lega alle sequenze regolatorie ARE del DNA, inducendo la trascrizione di un ampio set di geni coinvolti nella detossificazione cellulare e nella risposta antiossidante – tra cui l'eme ossigenasi-1 (HO-1) – contribuendo così al ripristino dell'equilibrio redox [21].

Il dialogo molecolare tra NF- κ B e Nrf2 è bidirezionale e complesso. Un'eccessiva attivazione di NF- κ B, indotta da ROS, può sostenere l'infiammazione cronica, mentre l'attivazione di Nrf2 contrasta indirettamente l'infiammazione attraverso il potenziamento delle difese antiossidanti e la soppressione di segnali pro-infiammatori. Esistono inoltre meccanismi diretti di regolazione incrociata: NF- κ B può reprimere l'attività trascrizionale di Nrf2, mentre Nrf2, controllando la bio-disponibilità di ROS, attenua l'attivazione di NF- κ B. La perdita di funzionalità o l'attivazione inadeguata di Nrf2 tende quindi a favorire la persistenza di uno stato infiammatorio e ossidativo cronico [22].

Oltre ai principali fattori trascrizionali, altri complessi molecolari concorrono a rafforzare il circuito ossidativo-infiammatorio. Tra questi, l'inflammasoma NLRP3 è in grado di attivare la caspasi-1, promuovendo la secrezione delle citochine IL-1 β e IL-18, e amplificando così l'infiammazione cronica. Inoltre, le vie metaboliche della COX e della lipossigenasi (LOX) partecipano alla sintesi di eicosanoidi pro-infiammatori che, a loro volta, stimolano la produzione di ulteriori specie reattive, instaurando un loop patogenetico che perpetua lo stato infiammatorio [23].

Nel contesto patologico, l'interazione tra stress ossidativo e infiammazione si traduce in danni funzionali specifici a seconda del tessuto coinvolto: a livello cardiovascolare, contribuisce alla disfunzione endoteliale e all'aterogenesi; nel sistema nervoso centrale, sostiene la neuroinfiammazione e favorisce l'accumulo patologico di proteine; a livello articolare, promuove la degradazione della matrice extracellulare e l'attivazione di metalloproteinasi della matrice, accelerando la progressione dell'osteoartrite. Queste evidenze spiegano perché molte malattie croniche, pur colpendo distretti differenti, condividano una comune base fisiopatologica caratterizzata da uno squilibrio redox e da uno stato infiammatorio persistente [24].

In questo contesto, numerosi studi presenti in letteratura supportano l'efficacia di specifici composti fitochimici, ad esempio polifenoli, isotiocianati, carotenoidi, flavonoidi e alcaloidi, nel ridurre la produzione di ROS, ma anche nel modulare direttamente le vie trascrizionali coinvolte nell'infiammazione e nella difesa redox. Per esempio, l'isotiocianato derivato dai semi

di *Moringa oleifera*, attiva la via Nrf2 e, contemporaneamente, impedisce l'accumulo nucleare di NF- κ B in macrofagi stimolati con LPS, determinando una riduzione dell'espressione di citochine pro-infiammatorie come IL-6 e TNF- α [25]. In modo analogo, estratti vegetali contenenti quercetina, cianidine e i loro glicosidi, promuovono l'attivazione della via Nrf2/ARE, mentre sopprimono l'attività di NF- κ B, in modelli cellulari di astrociti [26]. Il resveratrolo costituisce un ulteriore esempio di molecola bioattiva capace di esercitare un effetto regolatore integrato: in modelli di artrite reumatoide, esso attiva la via Nrf2/HO-1, riduce i livelli di Keap1, sopprime NF- κ B, e diminuisce ROS, malondialdeide e altri marker di stress ossidativo, contribuendo così a limitare il danno cellulare e a mitigare la risposta infiammatoria [27].

Nel complesso, tali evidenze confermano l'intervento dei composti fitochimici su più livelli, combinando un'azione diretta di scavenging dei radicali liberi con la modulazione di vie di segnalazione chiave coinvolte nella risposta infiammatoria e ossidativa. Questo duplice meccanismo ne rafforza il potenziale come strumenti efficaci nella prevenzione e nel trattamento delle patologie cronico-degenerative, ponendo le basi per futuri sviluppi in ambito nutraceutico e farmacologico (Figura 2) [28]–[31].

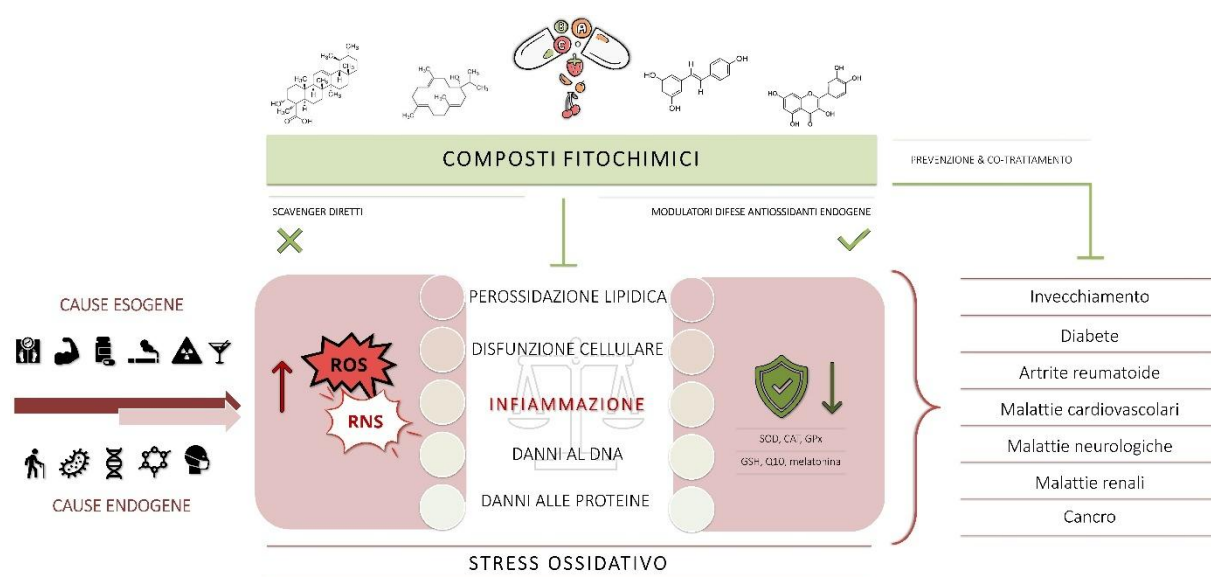


Figura 2. Stress ossidativo e infiammazione come drivers patologici: effetto protettivo dei composti fitochimici su pathways chiave (elaborazione grafica di propria realizzazione).

1.4 Scarti agroalimentari come fonte sostenibile di composti fitochimici

Negli ultimi decenni, l'interesse scientifico verso i composti fitochimici è aumentato in concomitanza con la crescente domanda da parte dei consumatori di alimenti funzionali e prodotti nutraceutici orientati alla promozione della salute. In particolare, l'identificazione e la valorizzazione di nuove fonti vegetali ricche in fitocomponenti biologicamente attivi, comprese matrici vegetali non convenzionali e sottoprodotti agroalimentari, rappresenta oggi una delle frontiere più promettenti per lo sviluppo di strategie sostenibili che coniughino salute, innovazione e rispetto dell'ambiente.

La consapevolezza dei benefici associati al consumo di alimenti di origine vegetale ha determinato un importante aumento della domanda globale di frutta e verdura. Tale tendenza, combinata con la crescita demografica, ha comportato un parallelo incremento nella produzione di scarti agroalimentari, generati dalla sovrapproduzione industriale oltre che da inefficienze nei processi di conservazione e distribuzione. Secondo le stime elaborate dall'Associazione Nazionale Produttori Agricoli (ANPA) e dall'Osservatorio Nazionale sui Rifiuti (ONR), il settore agroalimentare rappresenta uno dei comparti produttivi con la più elevata produzione di rifiuti [32]. Tali rifiuti rappresentano non solo un problema economico e ambientale, ma anche una sfida sociale. In questo contesto, l'adozione di strategie di valorizzazione, si inserisce nell'ottica dell'economia circolare, in cui i rifiuti diventano risorse preziose, nonché nuove materie prime per nuovi processi produttivi [33].

Una ampia letteratura ha evidenziato che i sottoprodotti derivanti dalla lavorazione agroalimentare, come bucce, semi, polpe e altri residui, siano ancora ricchi di composti bioattivi di elevato interesse, quali polifenoli, pigmenti, fibre e acidi organici [34]. Grazie a questo patrimonio residuo, tali scarti possono essere trasformati e destinati a diversi settori: dalla produzione di biomateriali e bioplastiche ottenute da residui ricchi in polisaccaridi e proteine [35], alla generazione di biocarburanti come bioetanolo e biogas, fino all'impiego come fonti di molecole ad alto valore aggiunto con applicazioni nell'industria alimentare, nutraceutica, cosmetica e farmaceutica. Un esempio è dato dalle ricerche sul riutilizzo dei residui dell'industria vitivinicola, che hanno messo in luce il potenziale delle vinacce come fonte di polifenoli ad attività antiossidante, antimicrobica e antifungina, aprendo nuove strade per lo sviluppo di formulazioni per la cura della pelle [36], [37].

Tali evidenze dimostrano come gli scarti agroalimentari possano diventare vere e proprie miniere di biomolecole, purché opportunamente trattati e caratterizzati. In questo contesto, il ricorso a tecniche di estrazione green (come processi assistiti da ultrasuoni, microonde o enzimi), ha reso possibile valorizzare frazioni vegetali precedentemente considerate di scarso

interesse, preservando l'integrità delle molecole bioattive, migliorandone la resa e favorendone l'applicabilità industriale [38], [39].

1.5 *Rubus idaeus* L.

Il lampone rosso (*Rubus idaeus* L.), appartenente alla famiglia delle Rosaceae, rappresenta una delle specie di maggiore interesse per le sue proprietà fitochimiche e nutrizionali. Originario dell'Europa continentale e dell'Asia Minore, il lampone è oggi diffuso in tutte le zone temperate del Continente. La pianta, che può raggiungere 180 cm, si presenta caratterizzata da caduche foglie di forma ovale con il margine seghettato. Sulle cime dei rami appaiono tanti piccoli fiori bianchi, a cinque petali, riuniti in infiorescenze piramidali.

Il frutto del lampone è caratterizzato dall'unione di piccole drupeole, ciascuna contenente un minuscolo seme, aggregate attorno al ricettacolo. Il colore dei frutti vira dal colore rosso pallido al rubino, fino al violaceo, secondo le varietà (Figura 3). Il sapore è acidulo con note dolci.



Figura 3. *Rubus idaeus* L. – A sinistra, la pianta di lampone con frutti in diversi stadi di maturazione, costituiti da numerosi drupeole aggregate (fonte: ResearchGate, foto di Zaqy, licenza CC BY 2.0). A destra, dettagli dei frutti rossi maturi (fonti: Microsoft PowerPoint, immagini di archivio; Wikimedia Commons, licenza CC BY-SA 4.0).

Le cultivar di *Rubus idaeus*, distinte in “unifere” e “bifere”, garantiscono raccolti diversificati nel corso dell'anno. Sebbene la resa produttiva per pianta non sia elevata (1,0 – 1,2 kg), l'elevata richiesta commerciale rende questo frutto economicamente rilevante: nel 2019 la produzione

mondiale ha superato le 800.000 tonnellate, con la Russia quale principale Paese produttore, seguita da Messico, Serbia, Stati Uniti e Polonia [40].

I benefici per la salute derivanti dal consumo di lamponi sono da attribuire alla presenza di elevate quantità di Vitamina C (5–40 mg/100 g di frutto fresco) e polifenoli, tra cui antociani, ellagitannini, flavanoli e flavonoli. Il profilo fitochimico, sia in termini qualitativi che quantitativi, dipende dal genotipo e dalle condizioni post-raccolta [41].

Il successo del frutto è però limitato dalla sua rapida deperibilità, che ne rende necessaria la trasformazione industriale in succhi, sciroppi, gelatine, liquori e coloranti. Questi processi generano sottoprodotti, specialmente in termini di semi. I semi del lampone e i loro derivati, come oli e residui post-estrazione, hanno dimostrato un ampio spettro di attività biologiche. L'olio di semi, ottenuto attraverso il processo di spremitura a freddo, è caratterizzato da un profilo peculiare di acidi grassi insaturi e dalla presenza di differenti composti bioattivi. Tali caratteristiche hanno favorito il suo impiego sia in ambito nutraceutico e farmaceutico, sia in cosmetica, dove è apprezzato per le proprietà idratanti, emollienti e protettive [42].

Diversi lavori scientifici evidenziano i potenziali effetti protettivi sulla salute umana dei semi di specie diverse di *Rubus*, così come anche degli olii e del residuo derivanti dal loro processamento industriale [43]. L'olio ottenuto dai semi di *R. coreanus* ha mostrato proprietà epatoprotettive [44], mentre i residui post-estrazione si sono rivelati ricchi di composti polifenolici (soprattutto acidi fenolici e flavonoidi), con attività antiossidante riscontrata in diversi modelli sperimentali [45], [46], oltre a un potenziale effetto antivirale [47]. Anche l'attività antitumorale è stata approfondita: il residuo dei semi di *R. occidentalis* è in grado di arrestare il ciclo cellulare e indurre apoptosi in cellule di adenocarcinoma colon-rettale umano [48]. Uno studio di Mihailovic *et al.*, ha inoltre dimostrato che i polifenoli del lampone risultano stabili e bioaccessibilità dopo la digestione gastrointestinale, il che ne suggerisce una buona biodisponibilità *in vivo* [49].

Per quanto riguarda *R. idaeus*, l'olio di semi ha promosso effetti epatoprotettivi, testimoniati dalla riduzione delle transaminasi plasmatiche [50] e dal miglioramento del metabolismo lipidico [51]. I residui post-estrazione si distinguono per l'elevato contenuto di acido ellagico (un acido fenolico noto per le sue proprietà antiossidanti), a cui si associano attività antinfiammatorie, antiipertensive, oltre che effetti benefici sui parametri lipidici plasmatici [50], [52], [53].

Il residuo solido derivante dalla spremitura a freddo dei semi del lampone rosso, costituito prevalentemente dai tegumenti dei semi, rappresenta un sottoprodotto di secondo livello, ovvero uno scarto industriale ottenuto dal processamento di una matrice già residuale. A seguito

della macinazione di questo scarto organico, si ottiene una polvere defattizzata, il cui potenziale applicativo rimane, ad oggi, inesplorato (Figura 4).



Figura 4. Polvere di semi di lampone (Waste Raspberry Seed Powder, WRSP) (foto da archivio personale).

1.6 *Rhus coriaria* L.

Il genere *Rhus*, conosciuto come sommacco, appartiene alla famiglia delle Anacardiaceae e comprende oltre 250 specie distribuite nelle regioni temperate e tropicali del globo [54]. Si tratta di arbusti alti mediamente 3-4 metri, caratterizzati da infiorescenze terminali formate da piccoli fiori biancastri. I frutti, sferici e raggruppati in grappoli densi, maturano trasformandosi in drupe coriacee di colore rosso scuro, tipicamente ricoperte da una fine peluria che conferisce al grappolo un aspetto vellutato (Figura 5). Tradizionalmente i frutti essiccati e polverizzati sono utilizzati come spezia, principalmente nelle cucine del Mediterraneo e del Medio Oriente, dove il sommacco è apprezzato non solo come aromatizzante ma anche per le sue proprietà conservanti naturali [55]. Parallelamente al suo impiego gastronomico, il sommacco vanta una lunga tradizione nella medicina popolare, in particolare per il trattamento di patologie epatiche, disturbi dell'apparato urinario, ulcere e infezioni cutanee [56]. Diverse parti della pianta sono state oggetto di indagini fitochimiche e farmacologiche: il legno del *Rhus typhina* ha mostrato potenziali effetti antitumorali e antiossidanti, mentre per le foglie di varie specie del genere sono state descritte marcate proprietà antiossidanti [56], [57].

Tra le specie maggiormente studiate spicca *Rhus coriaria* L., comunemente denominato sommacco mediterraneo. Gli estratti ottenuti dai suoi frutti hanno mostrato attività antimicrobiche, antiossidanti e antinfiammatorie, oltre a un effetto ipoglicemizzante e ipolipemizzante in diversi modelli sperimentali, suggerendo un potenziale ruolo nella prevenzione di malattie metaboliche [58]. Diversi studi hanno evidenziato una variabilità significativa nella composizione fitochimica e nelle proprietà biologiche delle differenti specie di *Rhus*, determinata da fattori genetici e ambientali, nonché dall'area geografica di crescita della pianta [59].

In Sicilia, il sommacco mediterraneo ha rivestito per secoli un ruolo economico e culturale di rilievo: i frutti, essiccati e polverizzati, venivano impiegati come agente conciario per le pelli, grazie all'elevato contenuto di tannini. Attualmente, cresce spontaneamente in terreni incolti e marginali dell'isola ed è utilizzato come aromatizzante in diverse pietanze.

Negli ultimi anni, l'interesse della comunità scientifica nei confronti delle attività biologiche delle specie appartenenti al genere *Rhus* è progressivamente aumentato. Tuttavia, risultano ancora limitati gli studi specifici condotti sui frutti di *Rhus coriaria* provenienti dal paesaggio rurale siciliano. Questa carenza di evidenze sperimentali rende il sommacco una risorsa di particolare interesse per la ricerca, soprattutto in un'ottica di valorizzazione sostenibile delle specie vegetali locali e spontanee.



Figura 5. *Rhus coriaria* L. – Da sinistra a destra: fiori bianco-verdastro raccolti in piccole spighe (foto di Kenraiz, Wikimedia Commons, licenza CC BY-SA 4.0); arbusto deciduo con foglie composte e frutti rossi (foto di Zeljko Vranjkovic, Dreamstime.com); close-up del frutto, costituito da drupe riunite in densi grappoli ([58]).

1.7 *Boswellia* spp.

Il genere *Boswellia*, appartenente alla famiglia delle Burseraceae, comprende circa 20–25 specie di alberi di medie dimensioni distribuiti principalmente nella penisola arabica, nel Corno d’Africa e in alcune aree dell’India. Queste piante sono note per la produzione dell’incenso (olibano), una gommo-resina ottenuta mediante incisione della corteccia. L’essudato che fuoriesce, una volta esposto all’aria, forma delle “lacrime” irregolari e globose di colore dorato che vengono raccolte dopo circa due settimane (Figura 6). L’incenso vanta un uso molto antico come essenza, balsamo e cosmetico. Utilizzato come fumigante in riti religiosi e culturali, mentre nella medicinale tradizionale è stato impiegato in particolare per il trattamento di disturbi infiammatori, respiratori e gastrointestinali [60].

In Europa, il suo impiego come rimedio fitoterapico è stato riconosciuto ufficialmente nelle farmacopee fino al primo quarto del Novecento; tuttavia, con l’avanzare della farmacologia moderna e dei farmaci di sintesi, è caduto in gran parte in disuso. Successivamente, studi condotti su modelli animali hanno evidenziato effetti antinfiammatori e antiartritici dell’estratto, ristabilendo l’interesse verso la resina per possibili applicazioni terapeutiche [61]. Le analisi fitochimiche hanno dimostrato che la gommo-resina di *Boswellia* contiene una miscela chimicamente complessa che consta di oltre 200 metaboliti diversi, tra cui triterpenoidi penta- e tetraciclici, diterpenoidi, polifenoli, alcaloidi e oli essenziali. I terpeni sono considerati uno dei gruppi strutturalmente più diversificati nello spettro dei composti bioattivi naturali. I diterpeni, in particolare, formano uno dei gruppi più ampi di metaboliti secondari presenti. Allo stato attuale, sono stati segnalati più di 126 scheletri carboniosi differenti. Una recente review di Al-Harrasi *et al.*, ha posto particolare attenzione sui diterpenoidi cembrenici presenti nelle specie di *Boswellia*, concentrandosi in misura prevalente sulla descrizione chimica rispetto all’analisi delle attività biologiche [62].

La composizione chimica della resina, in termini quali-quantitativi, è influenzata da fattori ecologici quali clima, area di distribuzione, stagione di raccolta, nonché dalle modalità di essudazione e conservazione, determinando conseguenti differenze tra le diverse specie di *Boswellia* [63].

Tra le specie di maggiore rilevanza farmacologica si distinguono *Boswellia serrata* Roxb., diffusa principalmente in India, e *Boswellia sacra* Flueck., endemica della penisola arabica, in particolare nelle regioni del Dhofar (Oman) e nei distretti di Hadramawt e Mahra dello Yemen.



Figura 6. Incenso (o olibanum) – Da sinistra a destra: dettaglio della corteccia incisa da cui fuoriesce l’essudato gommo-resinoso; cristallo di resina essiccato. (foto di Mauro Raffaelli, Wikimedia Commons, licenza CC BY-SA 3.0).

Boswellia sacra Flueck., è un albero di dimensioni variabili, che può raggiungere altezze tra 1,5 e 8 metri, con rami che si dipartono sin dalla base. La corteccia è di tonalità bruno-giallastra, le foglie densamente affollate e i fiori presentano un colore giallo-arancio. La resina, inizialmente lattiginosa, diventa giallo pallido una volta essiccata (Figura 7).



Figura 7. *Boswellia sacra* Flueck. – Da sinistra a destra: esemplare adulto dell’albero (foto di Mauro Raffaelli, Wikimedia Commons, licenza CC BY-SA 3.0); infiorescenza composta da piccoli fiori bianco-giallastri con cinque petali (foto di Scott Zona, Wikimedia Commons, licenza CC BY 2.0).

Studi fisico-chimici dimostrano che circa il 60-80% della resina è solubile in alcol, il 15-20% è gomma solubile in acqua, mentre il 5-7% comprende olii essenziali. Dal punto di vista chimico, la frazione volatile è ricca di monoterpeni e sesquiterpeni, tra questi l' α -pinene (che in molti chemotipi rappresenta la componente principale), limonene e mircene; questi composti sono responsabili non solo dell'aroma caratteristico dell'incenso, ma anche di alcune proprietà biologiche quali attività antimicrobica, antinfiammatoria e neuroprotettiva [64]. La frazione resinoide lipofila concentra i principali composti bioattivi della resina, rappresentati dagli acidi boswellici (triterpeni pentaciclici) e da diversi diterpeni, prevalentemente di tipo cembranico, tra cui l'incensolo e la sua forma acetilata [65].

Originariamente isolati da organismi marini e di cui le attività biologiche sono ben documentate [66], i cembrenoidi sono stati poi identificati anche in piante terrestri e in resine vegetali come quelle di *Boswellia*. Lo studio dei cembrenoidi isolati dalla resina di *Boswellia* spp. rimane ancora limitato a causa delle difficoltà di isolamento e caratterizzazione. Le conoscenze su farmacocinetica, biodisponibilità, metabolismo e sicurezza sono frammentarie, così come gli studi comparativi con gli acidi boswellici e le valutazioni in modelli *in vitro* e *in vivo*.

Come illustrato in Figura 8, gli acidi boswellici (BA) costituiscono una classe di triterpenoidi pentaciclici suddivisi in due principali serie strutturali: quella ursanica (β -BA) e quella oleananica (α -BA). Entrambe caratterizzate dalla presenza di un gruppo carbossilico in posizione C-4, mentre differiscono nella posizione e nell'orientazione di un gruppo metilico dell'anello terminale (anello E). Tra i derivati farmacologicamente più attivi figurano l'acido 11-cheto- β -boswellico (KBA), il 3-O-acetil-11-cheto- β -boswellico (AKBA), gli acidi α - e β -boswellico (α -BA, β -BA) e le corrispondenti forme acetilate, nonché 3-O-acetil- α -boswellico (A α BA) e 3-O-acetil- β -boswellico (A β BA). Queste molecole sono considerate i principali mediatori delle attività antinfiammatorie e immunomodulatorie della resina [67]. Infine, la frazione idrofila della resina, costituita prevalentemente da polisaccaridi idrosolubili come galattosio, arabinosio e glucosio, riveste un ruolo minore dal punto di vista farmacologico.

Le diverse specie di *Boswellia* sono state oggetto di approfondite indagini farmacologiche, condotte sia sugli estratti grezzi della resina e sugli oli essenziali, sia sui singoli composti bioattivi isolati. La resina rappresenta un fitocomplesso di grande interesse farmacologico, il cui spettro di attività si estende dall'ambito antinfiammatorio e oncologico a quello antimicrobico e antidiabetico. Alcune evidenze sperimentali hanno anche documentato un'azione antipruriginosa e protettiva nei confronti di malattie dermatologiche infiammatorie, che suggeriscono l'impiego della resina anche in ambito dermocosmetico [68], [69]. Nel

complesso, la letteratura fornisce evidenze scientifiche a supporto dell'impiego della resina di *Boswellia* sia in contesti farmacologici terapeutici che preventivi.

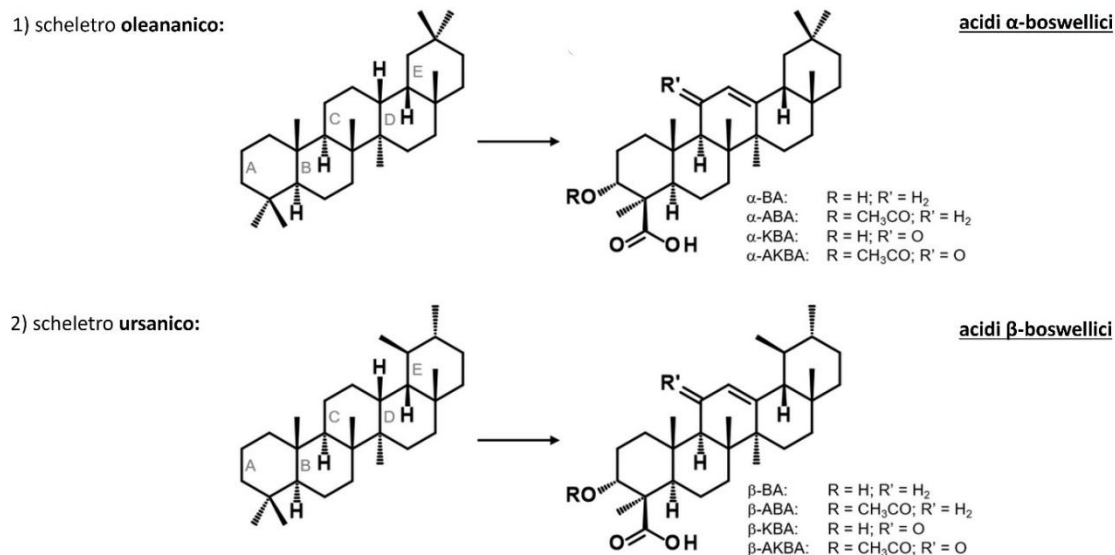


Figura 8. Struttura chimica degli acidi boswellici (BA) – Classe di triterpenoidi pentaciclici appartenenti alle serie oleananica (α -BA) (1) e ursanica (β -BA) (2) [70].

1.8.1 Potenziale farmacologico dei composti bioattivi di *Boswellia* spp.

1.8.1.1 Attività antinfiammatoria

L'attività antinfiammatoria costituisce senza dubbio l'attività biologica più documentata e farmacologicamente rilevante dell'incenso. Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che gli acidi boswellici, e in particolare l'AKBA, esercitano una potente azione modulante attraverso l'inibizione selettiva di vie di segnalazione chiave dell'infiammazione, tra cui NF- κ B, la COX-2 e la 5-lipossigenasi (5-LOX) [67]. Una parte di questa attività è stata attribuita alla somiglianza strutturale di questi acidi con i glucocorticoidi, che conferisce loro la capacità di modulare la risposta immunitaria in maniera simile ai farmaci steroidei, ma con un profilo di sicurezza potenzialmente più favorevole [71], [72]. Negli anni, tali proprietà hanno suscitato ampio interesse clinico, trovando applicazione nello studio di diverse condizioni infiammatorie croniche, tra cui le malattie infiammatorie intestinali, l'asma e l'artrite reumatoide [73].

Oltre agli acidi boswellici, anche i cembrenoidi sembrano contribuire al profilo antinfiammatorio della *Boswellia*. Tra questi, l'incensolo acetato e i suoi derivati sono stati identificati come potenziali inibitori della via NF- κ B [74].

1.8.1.2 Attività antiossidante

Le proprietà antiossidanti della resina di *Boswellia* sono state ampiamente documentate in diversi modelli sperimentali, sia *in vitro* che *in vivo*. L'olio essenziale ottenuto dalla gommoresina di *B. sacra* ha mostrato una significativa capacità di scavenging dei radicali liberi [75]. Anche *B. serrata* ha dimostrato un marcato potenziale antiossidante. In modelli sperimentali di malattia di Huntington, l'estratto ha ridotto significativamente la perossidazione lipidica, i livelli di nitriti e la produzione di citochine pro-infiammatorie. L'attività antiossidante, misurata mediante saggi DPPH e ABTS, nonché tramite test di eliminazione del perossido di idrogeno, ha confermato l'efficacia dell'estratto nel neutralizzare i ROS, contribuendo così alla protezione neuronale e alla riduzione del danno ossidativo [76]. Ulteriori evidenze provengono da modelli cellulari di infiammazione intestinale cronica. In cellule epiteliali intestinali (Caco-2) esposte a H₂O₂ o a stimolazione combinata con INF- γ e TNF- α , l'estratto di *B. serrata* è stato capace di ridurre significativamente la produzione intracellulare di ROS, prevenendo il danno ossidativo e migliorando la funzionalità della barriera epiteliale [77].

1.8.1.3 Attività neuroprotettive

Un corpus crescente di risultati scientifici suggerisce che i composti bioattivi derivati da *Boswellia* spp. possano esercitare un ruolo terapeutico o preventivo nei disturbi neurodegenerativi, grazie a un insieme di azioni sinergiche che comprendono effetti antinfiammatori, antiossidanti, anti-amiloidogenici e anti-apoptotici. Una recente revisione sistematica ha messo in luce come gli acidi boswellici siano in grado di modulare diversi pathway chiave implicati nella patogenesi di Alzheimer, Parkinson e sclerosi multipla, interferendo con i processi infiammatori, lo stress ossidativo, la deposizione di proteina β -amiloide e l'attivazione delle caspasi [78]. In un modello murino di Alzheimer indotto da cloruro di alluminio, la somministrazione di acidi boswellici ha favorito miglioramenti nella memoria, abbassato l'espressione di citochine pro-infiammatorie (TNF- α , IL-1 β), contrastato la perossidazione lipidica e aumentato l'attività degli enzimi antiossidanti endogeni, quali glutathione (GSH) e SOD [79]. Un'ulteriore conferma del potenziale neuroprotettivo della *Boswellia* proviene da modelli di ischemia cerebrale, nei quali estratti acquosi ed etanoliche di *B. serrata* hanno ridotto significativamente l'estensione del danno ischemico, limitato la perdita neuronale e l'apoptosi, attenuato la perossidazione lipidica e incrementato i livelli corticali di GSH e l'attività della SOD [80], [81].

Anche evidenze cliniche, seppur preliminari, sembrano confermare quanto osservato nei modelli preclinici. In uno studio controllato, pazienti con lieve compromissione cognitiva o Alzheimer in stadio iniziale, hanno ricevuto una formulazione a base di *B. sacra* in associazione ad altre piante medicinali per tre mesi: i risultati hanno rilevato miglioramenti significativi in vari domini cognitivi (orientamento, memoria di lavoro, richiamo ritardato e linguaggio) e comportamentali rispetto al placebo [82].

1.8.1.4 Attività cardioprotettive endotelio-mediate

Alcuni studi hanno evidenziato che estratti di *Boswellia* spp. sono in grado di modulare i pathway infiammatori coinvolti nella disfunzione endoteliale, favorendo il mantenimento dell'omeostasi cardiovascolare [83]. In modelli di cellule endoteliali aortiche porcine, alcuni estratti di *B. serrata* hanno incrementato la vitalità cellulare in modo dose-dipendente dopo stimolazione con LPS, senza manifestare effetti citotossici, e hanno inoltre mostrato attività proangiogenica a basse concentrazioni [84]. L'acido β -boswellico si è rivelato efficace nel contrastare i danni provocati dalla stasi sanguigna, aumentando i livelli di NO e di guanosina 3',5'-monofosfato ciclico (cGMP) nelle carotidi di ratti, attraverso l'attivazione della via eNOS/NO/cGMP. In un altro studio, Wang et al. hanno mostrato che, in cellule endoteliali umane derivate da vena ombelicale (HUVEC) sottoposte a deprivazione temporanea di ossigeno e glucosio, il trattamento con β -BA ha significativamente elevato i livelli intracellulari di NO, indicando un effetto protettivo contro il danno ossidativo e ischemico [85]

Nel complesso, questi risultati sostengono il potenziale terapeutico dei composti bioattivi di *Boswellia* nel preservare la salute vascolare, grazie alla loro capacità di modulare l'infiammazione, proteggere l'endotelio e regolare la funzione vascolare, rafforzando così l'interesse per l'uso di questi estratti sia nella prevenzione sia nel supporto delle patologie cardiovascolari.

1.8.1.5 Attività nelle malattie osteoarticolari

Diversi studi *in vitro* confermano l'efficacia degli estratti di *Boswellia serrata* nel modulare la risposta infiammatoria anche nelle cellule condrocitiche derivate da pazienti con osteoartrite, attraverso riduzione di marcatori pro-infiammatori quali nitriti (NO₂) e IL-6 [86], [87]. L'acido β -boswellico è emerso come un potente regolatore della risposta immunitaria innata, capace di

inibire l'attivazione di vie chiave come TLR4/IL1R, ROS, MAPK p38/NF- κ B, NLRP3 e TNF- α , limitando al contempo la degradazione della matrice extracellulare [88].

Nell'ambito di delivery ingegneristico, estratti di *B. serrata* sono stati incorporati in idrogel compositi per la modulazione *in situ* dell'infiammazione articolare. Tali sistemi hanno evidenziato un duplice effetto antinfiammatorio e rigenerativo: la riduzione di COX-2, prostaglandina E2 (PGE₂) e IL-1 β è stata accompagnata dall'aumento di marker condrogenici come collagene di tipo II e aggrecano, suggerendo la capacità dell'estratto di preservare la differenziazione delle cellule staminali verso un fenotipo cartilagineo anche in condizioni di stress ossidativo [89]. In modelli animali di osteoartrite, è stato dimostrato che gli estratti di *Boswellia* modulano l'espressione delle metalloproteinasi della matrice (MMP), fondamentali nella degradazione cartilaginea [90]. Studi multicentrici, randomizzati e in doppio cieco hanno altresì dimostrato che l'assunzione di estratti standardizzati di *B. serrata* migliora rapidamente i sintomi dell'osteoartrite del ginocchio, con riduzione di dolore e rigidità già entro cinque giorni di trattamento [91].

Nonostante questi risultati promettenti, la scarsa solubilità e biodisponibilità degli acidi boswellici, rappresenta un limite significativo per il loro impiego terapeutico. In risposta, numerosi studi stanno sviluppando nuove formulazioni e strategie di delivery per migliorarne l'efficacia clinica e l'indice terapeutico per il trattamento non solo patologie infiammatorie articolari [92].

1.9 OBIETTIVO DELLA RICERCA

Il presente lavoro si è posto l'obiettivo di valorizzare diverse matrici vegetali, compreso un sottoprodotto di scarto agroindustriale, al fine di individuarne il potenziale applicativo nel settore alimentare, nutraceutico, cosmetico e farmaceutico. A tal fine, è stato adottato un approccio integrato che ha combinato la caratterizzazione fitochimica con l'analisi delle loro attività funzionali in differenti modelli cellulari *in vitro*.

Le matrici oggetto di studio comprendono i frutti di sommacco siciliano (*Rhus coriaria* L.) raccolti da piante spontanee, lo scarto derivante dalla spremitura a freddo dei semi di lampone rosso (Waste Raspberry Seed Powder, WRSP) e la gommoresina di *Boswellia sacra*. Queste ultime due matrici sono state fornite dall'azienda Abel Nutraceuticals S.r.l.

Nella prima fase, lo studio si è concentrato sulla caratterizzazione fitochimica degli estratti di WRSP e dei frutti di sommacco, mediante l'impiego di metodi colorimetrici e cromatografia

liquida ad alte prestazioni (HPLC). A tali analisi chimiche è stata affiancata una valutazione funzionale mediante saggi biologici, finalizzati a indagare attività di interesse, quali attività antiossidante, antiproliferativa e antimicrobica.

Successivamente, l'indagine è stata focalizzata sugli estratti standardizzati della resina di *Boswellia sacra*, con l'intento di valutarne l'attività biologica in tre distinti contesti fisiopatologici: rigenerazione endoteliale, disturbi neurodegenerativi del sistema nervoso centrale e processi catabolici e infiammatori articolari. Le prove sperimentali sono state condotte su modelli cellulari *in vitro* specifici per ciascuna condizione: cellule progenitrici endoteliali umane espanse *ex vivo*, utilizzate come modello vascolare; astrociti primari murini sottoposti a differenti condizioni di stress, per indagare il potenziale neuroprotettivo dell'estratto di *Boswellia*; in ultimo, il potenziale antiartritico dell'estratto, è stato valutato su condrociti primari umani in un modello *in vitro* di osteoartrite.

CAPITOLO 2

Valorizzazione di matrici vegetali autoctone e scarti agroindustriali: profilo fitochimico e attività biologiche del sommacco siciliano (*Rhus coriaria* L.) e della polvere di semi di lampone rosso (*Rubus idaeus* L.)

2.1 STATO DELL'ARTE E RAZIONALE DELLA RICERCA

Negli ultimi anni, un numero crescente di studi ha messo in evidenza come i sottoprodotti derivanti dalla lavorazione agroalimentare – quali bucce, semi, polpe e altri residui – destinati allo smaltimento, possano invece rappresentare risorse di elevato valore biologico. In particolare, le polveri di semi di diverse bacche, nonché scarti derivanti dal riutilizzo di un altro scarto industriale, mantengono un contenuto rilevante di composti bioattivi, tra cui polifenoli. Nel caso specifico dei sottoprodotti derivati dal processing industriale del lampone rosso, la letteratura è limitata. Questi scarti organici costituiscono una matrice poco esplorata ma dal notevole potenziale, il cui recupero e studio potrebbero offrire nuove opportunità per lo sviluppo di ingredienti funzionali ad alto valore aggiunto, contribuendo al contempo alla riduzione degli sprechi nella filiera agroalimentare.

Parallelamente, si inserisce un rinnovato interesse verso la riscoperta di specie vegetali spontanee ed endemiche del bacino del Mediterraneo, in un'ottica non solo di tutela della biodiversità. In questo contesto, il sommacco siciliano (*Rhus coriaria* L.), tradizionalmente impiegato come spezia nel Medio Oriente e colorante naturale, si configura come una risorsa locale scarsamente valorizzata. Sebbene i frutti presentino profili fitochimici di interesse già documentati, il valore complessivo di questa pianta resta ancora poco approfondito e poco riconosciuto, sia a livello nazionale che all'interno dello stesso territorio siciliano.

Alla luce di queste considerazioni, il presente studio si propone di colmare le lacune esistenti, attraverso un approccio integrato che combina la caratterizzazione fitochimica dettagliata con la valutazione funzionale in diversi modelli cellulari, al fine di sostenere una valorizzazione sostenibile e innovativa di queste matrici vegetali.

2.2 MATERIALI E METODI

2.2.1 Matrici vegetali e preparazione degli estratti

La materia prima impiegata per lo studio, ovvero la polvere di semi di lampone (WRSP) è stata fornita da Abel Nutraceuticals S.r.l. (Torino, Italia).

Per la preparazione dell'estratto, tre aliquote indipendenti di WRSP sono state trattate con una miscela etanolo:acqua (70:30, v/v) in rapporto 1:20 (p/v). I campioni sono stati sottoposti ad agitazione su vortex per 5 minuti, seguita da sonicazione a temperatura ambiente per 20 minuti e successiva agitazione continua per 24 ore a 4 °C al buio. Al termine, le sospensioni sono state

centrifugate (2000 rpm, 10 min, 4 °C) e i surnatanti ottenuti sono stati raccolti, filtrati con filtri Millex HV da 0,45 µm (Millipore, Billerica, MA, USA) e conservati. Il residuo solido è stato ulteriormente estratto con 10 ml dello stesso solvente e la frazione ottenuta mantenuta separatamente come estratto esausto. Tutti gli estratti idroalcolici di WRSP sono stati conservati a -20 °C fino all'impiego nelle analisi chimiche e biologiche.

Per quanto riguarda il sommacco, i frutti sono stati raccolti durante il periodo di piena maturazione in due siti distinti all'interno del Parco Regionale delle Madonie, nei pressi dei comuni di Gratteri e Collesano (Palermo, Sicilia).

La procedura estrattiva che ha portato all'ottenimento del Sumac Fruit Extract (SFE), ha previsto l'impiego di tre porzioni di frutti, trattate con etanolo:acqua (70:30, v/v) in rapporto 1:10. Ogni campione è stato sottoposto ad agitazione su vortex per 5 minuti, successiva sonicazione a 40 kHz (Giorgio-Bormac, Modena, Italia) per 20 minuti a temperatura ambiente e infine agitazione continua per 24 ore a 4 °C al buio. In seguito, le sospensioni sono state centrifugate (2000 rpm, 10 min, 4 °C) e i surnatanti raccolti. L'intero processo è stato ripetuto quattro volte per massimizzare il recupero dei fitocomposti. I surnatanti combinati sono stati filtrati con membrane Millex HV (0,45 µm), mentre il residuo è stato sottoposto a un'ulteriore estrazione con lo stesso solvente; la frazione risultante è stata conservata separatamente come esausta. Anche gli estratti di sommacco sono stati conservati a -20 °C fino all'impiego nelle analisi chimiche e biologiche.

2.2.2 Caratterizzazione fitochimica

2.2.2.1 Contenuto totale di polifenoli

Il contenuto fenolico dell'estratto idroalcolico di WRSP e di SFE è stato determinato tramite il metodo Folin-Ciocalteu, come precedentemente riportato [93]. L'acido gallico (GA) è stato utilizzato come standard di riferimento e i risultati sono stati espressi come mg di GA equivalenti (GAE) per 100 g di peso secco (DW). Gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte.

2.2.2.2 Contenuto totale di proantocianidine

Il contenuto totale di proantocianidine (TPAC) dell'estratto idroalcolico di WRSP e di SFE stato valutato utilizzando un protocollo modificato del test BL-DMAC come precedentemente riportato [94]. Il valore di TPAC è stato espresso come mg di proantocianidina di tipo A (PAC-A) equivalente per 100 g di peso secco (DW). Gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte.

2.2.2.3 Contenuto totale di antocianine

Il contenuto totale di antocianine (TAC) dell'estratto idroalcolico di WRSP e di SFE è stato misurato attraverso il metodo del pH differenziale [95], escludendo potenziali interferenze di altri pigmenti colorati. In breve, una diluizione appropriata dei due estratti è stata aggiunta al tampone KCl 0,025 M (pH 1,0) o acetato di sodio 0,4 M (pH 4,5). L'assorbanza di entrambe le miscele di reazione è stata letta a 510 nm e 700 nm contro i rispettivi bianchi. Il valore TAC è stato determinato utilizzando la seguente equazione (1):

$$(1) \text{ TAC (mg/ml)} = \frac{(Abs_{510} - Abs_{700})pH_{1.0} - (Abs_{510} - Abs_{700})pH_{4.5} \times MW \times 1000}{\epsilon \times l}$$

Dove: MW è il peso molecolare della cianidina-3-glucoside (449,2 g/mol); ϵ è il coefficiente di estinzione molare ($26.900 \text{ mM}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) della cianidina-3-glucoside; l è la lunghezza del percorso (1 cm). I dati sono stati espressi come mg di cianidina-3-glucoside equivalente (CE) per 100 g di peso secco. Gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte.

2.2.2.4 Contenuto totale di carotenoidi

Per la determinazione del contenuto totale di carotenoidi (TCC), tre aliquote separate da 3 g ciascuna di polvere di frutti di sommacco (precedentemente ottenuta essiccando i frutti a 54 °C per 48 ore), sono state estratte per 20 minuti con 50 ml di esano. Dopo una fase di purificazione mediante centrifugazione a 2000 rpm per 10 minuti a 4 °C, il protocollo di estrazione è stato ripetuto una seconda volta. I surnatanti di entrambi i cicli sono stati raccolti e utilizzati per l'analisi dopo opportuna diluizione con esano. Per la determinazione del valore TCC, su una aliquota dell'estratto di esano, è stata misurata l'assorbanza a 460 nm e 480 nm [96]. Il valore TCC è stato calcolato utilizzando il β -carotene come standard di riferimento ed espresso come mg di β -carotene per 100 g di peso secco (DW). Tutte le misurazioni sono state eseguite in triplicato.

2.2.3 Profilo polifenolico

Il profilo polifenolico dell'estratto di WRSP e di SFE è stato determinato in collaborazione con il gruppo del Prof. Mannino, come riportato nei relativi articoli di cui la sottoscritta è coautrice [97], [98].

Per la determinazione quali-quantitativa dei composti polifenolici dell'estratto di WRSP è stato impiegato un sistema di cromatografia liquida (LC) Agilent 1200, equipaggiato con rivelatore a diodi (DAD) e spettrometro di massa a trappola ionica serie 6330 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). La separazione cromatografica è stata condotta seguendo un gradiente e condizioni operative descritte in precedenza in letteratura [99].

Per l'analisi del profilo polifenolico di SFE, è stato utilizzato uno strumento per cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) interfacciato con un rivelatore a serie di diodi (DAD) e un sistema di spettrometria di massa tandem (MS/MS) dotato di una trappola ionica LC-MS.

Tutte le analisi sono state effettuate in triplicato.

2.2.4 Proprietà redox-attive

Le proprietà redox attive sia dell'estratto idroalcolico di WRSP che di SFE sono stata determinate impiegando tre saggi colorimetrici in soluzione. In particolare, l'attività radical-scavenging è stata valutata usando il saggio di decolorazione del radicale cationico 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico) (ABTS) e il saggio di decolorazione del radicale 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH). Invece, l'attività metallo-riducente tramite il metodo FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*).

Tutte le misurazioni sono state eseguite in triplicato.

2.2.4.1 Saggio ABTS

Il test di decolorazione del radicale cationico, ABTS ^{•+} è stato eseguito come precedentemente descritto [100]. In breve, il radicale cationico ABTS ^{•+} è stato precedentemente preparato incubando 7 mM del sale ABTS con 2,45 mM K₂S₂O₈ a temperatura ambiente per una notte. La soluzione risultante contenente il radicale è stata diluita in etanolo fino a raggiungere un'assorbanza finale pari a 0,700 a 734 nm. Successivamente, diverse concentrazioni dell'estratto sono state aggiunte al radicale diluito. Dopo 3 minuti di incubazione a temperatura

ambiente, è stata registrata l'assorbanza della miscela di reazione a 734 nm. La percentuale di decolorazione (D) della soluzione radicalica è stata valutata utilizzando l'equazione (2):

$$(2) D = 100 \times \left[\frac{(A_{t0} - A_{t180})}{A_{t0}} \right]$$

dove A_{t0} è l'assorbanza della soluzione radicalica prima dell'aggiunta dell'estratto e A_{t180} è l'assorbanza dopo 180" dall'aggiunta dell'estratto.

La quantificazione dell'attività antiossidante è stata misurata utilizzando una curva standard di calibrazione di Trolox (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carbossilico), un analogo sintetico della Vitamina E. L'attività antiossidante è stata espressa come mmol di Trolox Equivalente (TE) per 100 g di peso secco (DW). Tutte le misurazioni sono state eseguite in triplicato. I risultati rappresentano la media di tre esperimenti separati.

2.2.4.2 Saggio DPPH

Il saggio valuta la capacità antiossidante dei campioni dalla misura della decolorazione della soluzione del radicale 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH), in accordo al metodo precedentemente descritto [101]. In breve, alla soluzione 10 mM di DPPH è stato aggiunto l'estratto o lo standard opportunamente diluiti. Dopo un periodo di incubazione di 20 minuti al buio a temperatura ambiente, la riduzione del radicale DPPH è stata monitorata a 517 nm (picco caratteristico del radicale DPPH), utilizzando un lettore di piastre. La percentuale di decolorazione (D) della soluzione radicalica è stata valutata applicando l'equazione (2), misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda specifica del test dopo il tempo di incubazione previsto dal protocollo.

La quantificazione dell'attività antiossidante è stata misurata utilizzando una curva standard di calibrazione di Trolox. I risultati sono stati espressi come mmoli di equivalenti di Trolox (TE) per 100 g di peso secco (DW) per WRSP e SFE.

Tutte le misurazioni sono state eseguite in triplicato.

2.2.4.3 Saggio FRAP

L'attività metallo-riducente è stata valutata per via colorimetrica tramite il saggio FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) [102]. Il metodo misura la riduzione del complesso Fe^{3+} -TPTZ

(2,4,6-Tris (2-piridil) -s-triazina) alla forma ferrosa Fe^{2+} -TPTZ, di colore blu, in presenza di agenti riducenti. In breve, il reattivo FRAP è stato preparato estemporaneamente miscelando 300 mM di acetato di sodio (pH = 3,6 HCl) con 20 mM di FeCl_3 e 10 mM di TPTZ in un rapporto 8:1:1 (v/v/v). Successivamente, il tampone di reazione è stato incubato a 37 °C per 1 ora con l'estratto o lo standard opportunamente diluiti. Dopo il periodo di incubazione, l'assorbanza di ciascun pozzetto è stata misurata a 595 nm, utilizzando un lettore di piastre. La quantificazione dell'attività riducente è stata misurata utilizzando una curva standard di calibrazione di Trolox. I risultati sono stati espressi come mmoli di equivalenti di Trolox (TE) per 100 g di peso secco (DW) per WRSP e SFE. Tutte le misurazioni sono state eseguite in triplicato.

2.2.5 Colture cellulari

Le linee cellulari epiteliali umane HeLa (cancro cervicale umano), Caco-2 (cancro del colon umano), HepG2 (epatocarcinoma umano) e cellule MCF-7 sono state ottenute dall'American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Le cellule Caco-2 e MCF-7 sono state coltivate in DMEM GlutaMax, mentre le cellule HeLa e HepG2 in RPMI. Entrambi i terreni di coltura sono stati supplementati con il 10% (p/v) di FBS (VWR International, Radnor, PA, USA), 2 mM di L-glutammina (VWR International, Radnor, PA, USA), 50 UI/ml di penicillina e 50 µg/ml di streptomycin (VWR International, Radnor, PA, USA) e mantenuti in atmosfera umidificata con il 5% (v/v) di CO_2 a 37 °C. Le cellule sono state coltivate principalmente in fiasche di coltura da 75 cm² e tripsinizzate con tripsina-EDTA (VWR International, Radnor, PA, USA) prima del raggiungimento della confluenza.

2.2.6 Cellular Antioxidant Activity assay (CAA)

Il test dell'attività antiossidante cellulare (CAA) è stato eseguito come precedentemente descritto [103]. In breve, le cellule HepG2 sono state seminate in un terreno di coltura completo ad alta densità. Dopo 24 ore di incubazione, le cellule sono state esposte per 2 ore con 25 µM di sale DCFH-DA (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e con appropriate diluizioni dei due estratti. La concentrazione di etanolo non ha mai superato lo 0,25% (v/v) e il terreno di coltura contenente etanolo allo 0,25% (v/v) è stato utilizzato come controllo.

Successivamente, le cellule sono state lavate con PBS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e lo stress ossidativo è stato indotto esponendo i pozzetti trattati e di controllo a 600 μ M di 2,2'-Azobis(2-metilpropionamidina) dicloridrato (ABAP) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), in soluzione salina bilanciata di Hanks (HBSS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Nei pozzetti di controllo (bianco) è stato aggiunto soltanto HBSS. La fluorescenza è stata valutata ogni 5 minuti per 1 ora utilizzando un lettore di piastre a 37 °C.

Il valore CAA è stato calcolato utilizzando l'equazione (3):

$$(3) CAA = 100 - \left[100 \times \left(\frac{\int SA}{\int CA} \right) \right]$$

dove $\int SA$ è l'area integrata dei pozzetti campione e $\int CA$ è l'area integrata dei pozzetti controllo. L'attività antiossidante è stata espressa come CAA₅₀, ovvero la concentrazione di estratto necessaria per inibire al 50% la formazione di DCF; CAA₅₀ è stata calcolata da una curva concentrazione-risposta (CAA) utilizzando l'analisi di regressione lineare ed è stata espressa come mg di peso secco per ml di terreno di coltura.

I risultati sono il valore medio di tre esperimenti separati.

2.2.7 Attività antiproliferativa

Le cellule in crescita esponenziale sono state utilizzate per il test del 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro (MTT), come riportato [104]. Brevemente, le cellule sono state seminate in piastre standard da 96 pozzetti a una densità dipendente dai tempi di raddoppio di ciascuna linea cellulare. Dopo 24 ore di incubazione, sono stati aggiunti i due estratti a concentrazioni appropriate (500-50 μ g DW/ml di terreno di coltura cellulare per quanto riguarda WRSP; mentre 100-10 μ g DW/ml di terreno di coltura cellulare per SFE) e le cellule sono state incubate per altre 48 ore. La concentrazione di etanolo non ha mai superato lo 0,25% (v/v) e cellule di controllo sono state incubate con terreno di coltura contenente lo 0,25% di etanolo (v/v). Dopo il tempo di incubazione, è stato aggiunto 0,5 mg/ml di reagente MTT (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e scartato dopo un'incubazione di 3 ore a 37 °C. Il formazano blu prodotto nelle cellule viventi è stato disciolto dal dimetilsolfossido (DMSO). L'assorbanza è stata misurata in un lettore di micropiastre (UV-1900i, Shimadzu® Milano, Italia) a 570 nm e la percentuale di crescita (PG) delle cellule esposte agli estratti rispetto alle cellule di controllo (cellule non trattate) è stata calcolata secondo l'equazione (4):

$$(4) PG = 100 \times \frac{(OD_{test} - OD_{tzero})}{(OD_{ctr} - OD_{tzero})}$$

Dove: OD_{test} è la media della densità ottica dopo l'esposizione delle cellule all'estratto per il periodo di tempo stabilito; OD_{tzero} è la media della densità ottica prima dell'aggiunta dell'estratto; OD_{ctr} è la media della densità ottica dopo il periodo di tempo scelto senza esposizione delle cellule al trattamento.

La concentrazione necessaria per indurre un'inibizione della crescita del 50% (GI₅₀) per ciascuna linea cellulare è stata determinata dalle curve concentrazione-risposta utilizzando l'analisi di regressione lineare. I risultati, espressi come µg di peso secco (DW) per ml di terreno di coltura cellulare, rappresentano il valore medio di tre esperimenti separati.

2.2.8 Caratterizzazione microbiologica e determinazione dell'attività antibatterica

Le analisi sono state condotte in collaborazione con il gruppo di ricerca coordinato dal Prof. Settanni, presso il Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali dell'Università degli studi di Palermo, come riportato nei relativi articoli di cui la sottoscritta è coautrice [97], [105]. La valutazione microbiologica di WRSP è stata condotta secondo quanto descritto da Messina *et al.* [106] per l'enumerazione dei principali gruppi microbici appartenenti alle popolazioni pro-tecnologiche, di deterioramento e patogene. L'estratto idroalcolico di WRSP è stato testato contro batteri di origine alimentare. In particolare, sono stati selezionati *Enterococcus mundtii*, *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, *Lactilactobacillus sakei*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis* e *Leuconostoc mesenteroides* tra le specie pro-tecnologiche; *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas lactis* e *Pseudomonas poae* tra i batteri responsabili dell'alterazione degli alimenti; mentre *Acinetobacter guillouiae*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* sono stati inclusi tra i batteri responsabili di patologie umane. L'attività inibitoria dell'estratto di WRSP è stata valutata mediante saggio di diffusione in pozzetto (Well Diffusion Assay, WDA) [106]. I ceppi sensibili all'estratto sono stati sottoposti alla determinazione della concentrazione minima inibente (MIC) mediante il metodo della microdiluizione in brodo in micropiastre da 96 pozzetti, secondo il metodo descritto nel relativo articolo [105].

La valutazione microbiologica della polvere di frutti di sommacco è stata eseguita per rilevare la presenza dei principali microrganismi patogeni e deterioranti, secondo il metodo riportato da *Viola et al.* (2023) [107].

Le proprietà antibatteriche di SFE sono state testate contro i principali batteri patogeni di origine alimentare. In particolare, tra i batteri responsabili di patologie umane: *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus*. L'attività antibatterica è stata determinata mediante test WDA, secondo le metodiche riportate nel relativo articolo [97]. La MIC contro i batteri sensibili è stata quantificata in micropiastre a 96 pozzetti, seguendo l'approccio precedentemente descritto da *Barbaccia et al.* La capacità dei batteri patogeni di crescere nell'estratto diluito a concentrazioni comprese tra 100 e 6,25 mg/ml è stata misurata a 0 e 24 ore dopo l'inoculazione utilizzando uno spettrofotometro P-800 ScanReady (Life Real Biotechnology Co., Ltd, Hangzhou, Cina).

2.2.9 Analisi statistiche

Tutti i risultati sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard (DS). Sono stati eseguiti il test t di Student o l'ANOVA a una via seguita dal test post hoc di Tukey per valutare la significatività tra le diverse condizioni sperimentali. Tutte le analisi statistiche sono state condotte utilizzando SPSS Statistics 24 (SSPSS, Chicago, IL, USA).

I dati sperimentali presentati in questo capitolo derivano dalle attività di ricerca condotta durante il primo anno di dottorato. Salvo diversa indicazione, tutte le attività descritte nella sezione Materiali e Metodi sono state svolte presso il Dipartimento STEBICEF dell'Università degli studi di Palermo.

2.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

2.3.1 WRSP

2.3.1.1 Caratterizzazione fitochimica

Il profilo polifenolico dell'estratto idroalcolico di WRSP è stato valutato mediante analisi HPLC-DAD-MS/MS e saggi colorimetrici. Il contenuto polifenolico totale (TPC) è stato determinato utilizzando il reagente di Folin-Ciocalteu, mentre il contenuto totale di proantocianidine (TPAC) è stato quantificato tramite metodo colorimetrico DMAC. Il contenuto totale di antociani (TAC) è stato infine valutato secondo il metodo del pH differenziale. Il valore TPC stimato è cinque volte più alto del valore riportato da Mihailovic *et al.* per estratti idroalcolici del frutto intero di lampone rosso [49] ed è paragonabile agli elevati contenuti polifenolici rilevati in altri scarti agroindustriali [108], [109]. Relativamente al contenuto totale di proantocianidine (TPAC), il dato ottenuto dimostra che WRSP è una ricca fonte di proantocianidine, come altri scarti agroindustriali derivanti dal processing di cacao, frutti rossi, tè, uva [110], [111]. Il valore TAC, pari a $11,02 \pm 0,94$ mg CE per 100 g DW, dimostra che questi polifenoli, molto concentrati nella polpa, sono presenti in significativa concentrazione anche nei semi di questo frutto (Tabella 1).

L'analisi del profilo polifenolico, condotta in collaborazione con il gruppo del Prof. Mannino (Università di Torino), ha consentito di identificare un totale di 37 composti polifenolici differenti (Tabella 2). Tra questi, circa la metà apparteneva alla classe dei flavonoidi, comprendendo flavonoli, flavanoni, flavanonoli e un flavonolo O-metilato, mentre sono stati rilevati anche flavan-3-oli e numerose proantocianidine (PAC) (Figura 9). La concentrazione totale dei polifenoli è risultata pari a $1605,54 \pm 44,98$ mg/100 g di peso secco, con i flavan-3-oli come gruppo predominante (48%). Le PAC, quantificate in 641,23 mg/100 g di peso secco, erano principalmente di tipo B e in forma dimerica, caratteristiche tipiche dei semi e note per il loro ruolo fisiologico durante la germinazione. Tra i flavonoidi, la quercetina è emersa come il composto maggiormente rappresentato, confermando la sua diffusione nel regno vegetale e il ruolo centrale nella biosintesi dei polifenoli vegetali [112]. Per quanto riguarda lo stato di coniugazione dei polifenoli con le frazioni zuccherine, la grande maggioranza dei composti (circa il 97%) è stata rilevata in forma agliconica, mentre una quota minore risultava glicosilata con diversi zuccheri, tra cui glucosio, galattosio, arabinosio e rutinosio. Considerato che gli agliconi presentano una limitata permeabilità attraverso le membrane biologiche, è plausibile

che l'attività biologica di questi composti si manifesti principalmente a livello locale dopo il consumo di alimenti arricchiti con questi composti fitochimici [113].

Tabella 1. Composti bioattivi dell'estratto idroalcolico di WRSP. I valori sono espressi come media $\pm$ SD di tre esperimenti.

TPC	TPAC	TAC
1914,57 $\pm$ 12,19 mg GAE /100 g DW	530,67 $\pm$ 6,00 mg PAC-B eq/100 g DW	11,02 $\pm$ 0,94 mg CE /100 gr DW

Abbreviazioni: contenuto totale di polifenoli (TPC), contenuto totale di proantocianidine (TPAC), contenuto totale di antocianine (TAC), DW: peso secco, GAE: Equivalenti di acido gallico.

Tabella 2. Caratterizzazione quali-quantitativo dei polifenoli dell'estratto idroalcolico di WRSP. I valori sono espressi come media $\pm$ SD di tre esperimenti.

RT (min)	(m/z)		MS/MS		Composto	mg/100 g	
FLAVANONOLI							
10,7	287				Diidrocampferolo	12,74 ± 0,73	
13,6	481	319			Diidromiricetina-3-O-glucoside	4,38 ± 0,11	
28,2	319				Diidromiricetina	64,15 ± 3,96	
FLAVONOLI							
15,7	625	479	463	317	Miricetina-rutinoside	0,95 ± 0,06	
22,2	433	301			Quercetina-3-O-arabinoside	5,25 ± 0,07	
23,3	433				Quercetina-3-O-xiloside	3,83 ± 0,23	
24,2	625	463	301			Quercetina-3,7-O-diglucoside	3,11 ± 0,09
24,4	463	301			Quercetina-3-O-galattoside	0,44 ± 0,01	
24,8	301				Quercetina	687,84 ± 16,81	
25	447	285			Campferolo-3-O-glucoside	0,46 ± 0,02	
25	463	301			Quercetina-3-O-glucoside	0,71 ± 0,02	
26,4	477	176			Quercetina-3-O-glucuronide	2,44 ± 0,13	
31,1	317				Miricetina	18,23 ± 0,75	
32,7	285				Campferolo	5,05 ± 0,27	
33,9	609	463	447	301	Quercetina-3-O-rutinoside	0,48 ± 0,03	
45,6	593	447	431	285	Campferolo-O-rutinoside	4,82 ± 0,28	
45,6	595	294			Quercetina-3-O-sambubioside	2,42 ± 0,05	
FLAVONONI							
27,7	447	285			Luteolina-3-O-glucoside	6,32 ± 0,31	
35,2	285				Luteolina	2,32 ± 0,14	
FLAVANONI							
29,4	451	289			Naringenina-3-O-galattoside	2,17 ± 0,11	
36,4	287				Eriodictiolo	5,14 ± 0,26	
57,8	595	433	271			Naringenina-3,7-O-diglucoside	5,66 ± 0,12

FLAVONOLO O-METILATO						
44,6	639	477	315		Isoramnetina-3,7-O-diglucoside	1,33 ± 0,07
FLAVAN-3-OLI						
14,2	451	289			Catechina-3-O-galattoside	0,75 ± 0,03
14,9	451	289			Catechina-3-O-glucoside	1,32 ± 0,03
15,6	597	451	435	289	Catechina-3-O-rutinoside	7,34 ± 0,18
29,7	289				Catechina	122 ± 3,48
51,2	613	451	289		Catechina-3,7-O-diglucoside	2,46 ± 0,14
PROANTOCIANIDINE						
22,8	577	289			Dimeri PAC di Tipo B	399,61 ± 5,95
24,9	865	575	289		Trimeri PAC di Tipo A	14,26 ± 0,17
27,5	1153	867	577		Tetrameri PAC di Tipo B	12,63 ± 0,41
31,8	1439	1437	1151	575	Pentameri PAC di Tipo A	56,16 ± 3,83
37,2	2012	1151	863	289	Esameri PAC di Tipo A	12,05 ± 0,5
37,2	2014	1153	861	577	Esameri PAC di Tipo B	5,16 ± 0,17
37,5	1437	1151	836	575	Pentameri PAC di tipo A	30,88 ± 1,58
38,8	1151	863	575	289	Tetrameri PAC di Tipo A	13,35 ± 0,64
42,5	1441	1155	865	289	Pentameri PAC di Tipo B	77,33 ± 3,16

Abbreviazioni: DW: peso secco; RT: tempo di ritenzione; m/z: rapporto massa/carica; MS/MS: frammentazioni rilevate.

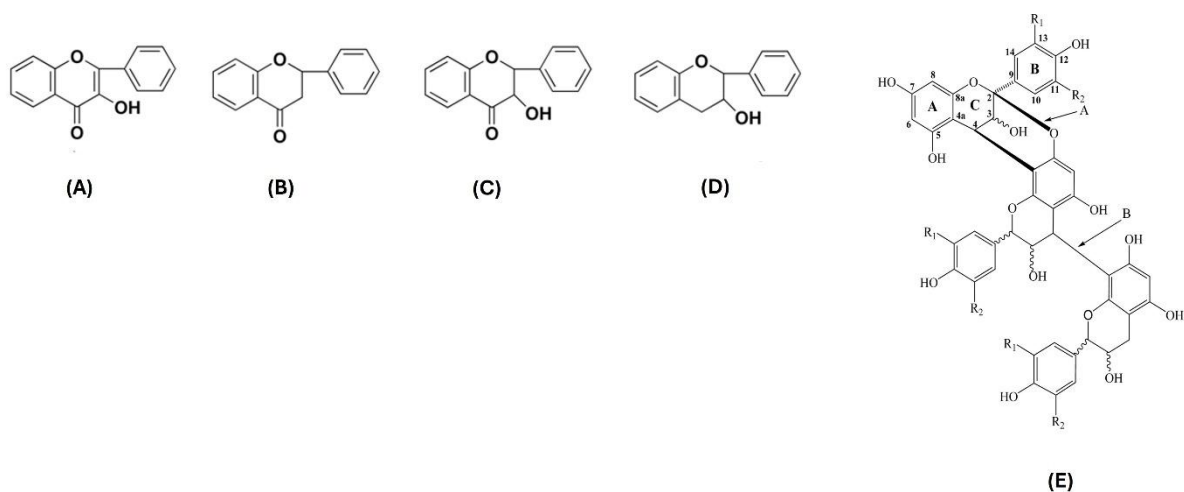


Figura 9. Strutture chimiche dei composti flavonoidi. (A) Flavanonoli, (B) flavonoli, (C) flavanoni. (D) flavan-3-oli e (E) struttura generale delle proantocianidine con legame di tipo A e B [114].

2.3.1.2 Proprietà antiossidanti

Un eccesso di SCR rispetto alle difese antiossidanti può determinare danni ossidativi ai componenti cellulari, compromettendo così le normali funzioni della cellula. Numerosi composti fitochimici, in particolare polifenoli e carotenoidi, sono noti per modulare l'equilibrio redox cellulare, contribuendo sia alla protezione dai radicali liberi sia alla regolazione di specifici target redox-sensibili. Per questo motivo, la valutazione del potenziale antiossidante e radical-scavenging rappresenta un passaggio essenziale nello studio del valore funzionale di una matrice vegetale. Inoltre, poiché nessun test singolo può fornire una stima esaustiva, l'impiego combinato di diversi saggi è raccomandato al fine di ottenere risultati più affidabili e per comprendere meglio i meccanismi coinvolti.

L'attività radical-scavenging e metallo-riducente dell'estratto idroalcolico di WRSP sono state stimate utilizzando i saggi colorimetrici ABTS, DPPH e FRAP. I nostri risultati mostrano che l'estratto idroalcolico di WRSP possiede un'elevata attività riducente (Tabella 3). Nello specifico, per quanto riguarda l'attività di rimozione dei radicali redox, il valore ABTS misurato è paragonabile a quello stimato per il ribes nero e il mirtillo rosso, mentre è 2,5 e 50 volte superiore a quello del sambuco e della rosa canina, rispettivamente [115], [116]. Confrontando i dati ottenuti per l'estratto di WRSP con quelli riportati in letteratura per altri scarti agro-alimentari, risulta evidente che l'estratto di semi di lampone possiede un'attività antiossidante competitiva. Ad esempio, la farina di semi di guava (un frutto tropicale) ha mostrato un valore di DPPH pari a 0,71 mmol TE/100 g DW [117], mentre la pasta di avocado (sottoprodotto della lavorazione del frutto), ha presentato valori di FRAP e DPPH pari rispettivamente a 1,41 e 0,63 mmol TE/100 g DW [118]. Dunque, i risultati per l'estratto di WRSP, con un valore di DPPH di 0,73 mmol TE/100 g DW e FRAP di 2,48 mmol TE/100 g DW, risultano comparabili o superiori a quelli di questi altri sottoprodotti vegetali citati.

Inoltre, abbiamo stimato l'attività antiossidante in un sistema biologicamente rappresentativo. Il saggio CAA (Cellular Antioxidant Activity assay) utilizza un modello di perossidazione lipidica cell-based, che valuta la capacità del campione di prevenire il danno ossidativo generato in cellule di epitelio epatico esposte ad un agente pro-ossidante. Il test CAA non solo ha permesso di valutare il potenziale antiossidante contro i radicali perossilici, ma anche la capacità delle sostanze antiossidanti di interagire o attraversare le membrane e la loro stabilità al metabolismo cellulare. Il valore CAA₅₀ stimato era 178 ± 32 µg DW/ml di mezzo di coltura cellulare (Tabella 3), nonché due ordini di grandezza inferiore a quella determinata da Wolfe *et al.* per un estratto idrofilo di frutti di lampone [119].

Tabella 3. Attività radical-scavenging, metallo-riducente e antiossidante dell'estratto idroalcolico di WRSP.
I risultati sono valori medi $\pm$ SD di tre esperimenti.

ABTS	DPPH	FRAP	CAA ₅₀
4,86 $\pm$ 0,06 mmol TE/100 g DW	0,73 $\pm$ 0,03 mmol TE/100 g DW	2,48 $\pm$ 0,02 mmol TE/100 g DW	178 $\pm$ 32 μ g DW/ml medium di coltura

Abbreviazioni: TE: equivalenti Trolox; DW: peso secco; CAA₅₀: concentrazione dell'estratto WRSP necessaria per il 50% inibizione della perossidazione lipidica.

2.3.1.3 Attività antiproliferativa

Il consumo regolare di frutta e verdura è correlato a un ridotto rischio di cancro, principalmente grazie ai composti fitochimici presenti. Studi recenti evidenziano l'attività antiossidante e antiproliferativa di estratti ottenuti da sottoprodotti agro-alimentari, come bucce, semi e vinacce. Ad esempio, estratti di bucce, polpe e semi di 61 frutti (tra questi prugna, arancia, pompelmo e kiwi) hanno mostrato una forte inibizione sulla proliferazione di quattro linee cellulari tumorali, quali A549 (cellule di cancro al polmone umano), HT-29 (cellule di cancro al colon umano), MCF-7 e HepG2, in modo dose-dipendente [120].

Nel nostro studio, il potenziale antiproliferativo dell'estratto idroalcolico di WRSP è stato valutato tramite il saggio MTT su tre linee cellulari epiteliali tumorali umane (HeLa, HepG2 e MCF-7) in fase di crescita esponenziale. Questo test colorimetrico si basa sulla capacità delle cellule metabolicamente attive di ridurre un sale di tetrazolio a cristalli viola di formazano. La concentrazione dell'estratto necessaria per ridurre del 50% la proliferazione cellulare (GI₅₀, Growth Inhibitory 50%) è stata determinata dalle curve concentrazione-risposta mediante regressione lineare ed espressa in mg di peso secco per ml di mezzo di coltura cellulare. I risultati hanno mostrato un effetto antiproliferativo dose-dipendente, con maggiore efficacia sulle cellule HepG2, seguite da MCF-7 e HeLa (Tabella 4). Questa variabilità potrebbe riflettere differenze nei profili di espressione proteica tra le linee cellulari, con i composti fitochimici presenti nell'estratto che interagiscono su differenti bersagli molecolari, potenzialmente in modo sinergico. Combinazioni di polifenoli hanno dimostrato un'efficacia antiproliferativa superiore rispetto ai singoli composti. Ciò potrebbe essere dovuto sia alla capacità delle miscele fitochimiche di modulare simultaneamente più percorsi coinvolti nella proliferazione tumorale, sia alla possibilità che diversi composti aumentino reciprocamente la loro biodisponibilità, amplificando così l'attività biologica complessiva [121].

Tra i principali composti responsabili dell'attività biologica dell'estratto di WRSP si evidenziano la quercetina e le PAC a basso peso molecolare. Studi precedenti hanno confermato

la biodisponibilità di questi polifenoli e le loro proprietà antiproliferative in diversi modelli cellulari [122]–[124].

Nonostante la limitata biodisponibilità delle PAC ad alto peso molecolare, le forme dimeriche e trimeriche mostrano una maggiore stabilità in condizioni gastrointestinali e risultano potenzialmente assorbibili a livello intestinale. L'estratto idroalcolico di WRSP è particolarmente ricco in PAC a basso peso molecolare, in particolare il dimero di tipo B (60%), che potrebbero quindi contribuire significativamente all'effetto osservato [125].

Tabella 4. Attività antiproliferativa dell'estratto di WRSP su cellule HepG2, MCF-7 e HeLa. I risultati sono valori medi $\pm$ SD di tre esperimenti indipendenti.

GI ₅₀		
HepG2	MCF-7	HeLa
299,866 $\pm$ 11,617 μ g/ml	469,739 $\pm$ 35,646 μ g/ml	702,760 $\pm$ 55,986 μ g/ml

Abbreviazioni: GI₅₀ (Growth Inhibitory 50%): concentrazione richiesta per l'inibizione del 50% della crescita cellulare

2.3.1.4 Valutazione microbiologica e attività antibatterica

Per valutare la sicurezza microbiologica del WRSP e il suo possibile impiego come ingrediente funzionale o come additivo antimicrobico di origine naturale, è stata condotta un'analisi microbiologica del materiale, insieme alla valutazione delle proprietà inibitorie dell'estratto di WRSP contro la crescita batterica.

Le conte microbiologiche del WRPS non hanno rivelato la presenza di batteri, né lieviti e muffe (dati non riportati), evidenziando l'idoneità igienica di questo sottoprodotto per applicazioni alimentari. D'altra parte, la presenza di microrganismi deterioranti o patogeni in una matrice naturale destinata all'uso alimentare, oltre a compromettere la stabilità dell'alimento in cui viene incorporato, rappresenta un rischio per la sicurezza del consumatore [126].

L'attività antibatterica dell'estratto WRSP contro i batteri deterioranti e patogeni è riportata nella tabella 5. L'estratto ha mostrato una marcata capacità inibente contro *Br. thermosphacta*, tipicamente coinvolto nel deterioramento delle carni, e contro tutti i ceppi di *Pseudomonas* [127], [128]. Per quanto riguarda i batteri patogeni, l'estratto ha esercitato un'elevata efficacia su quattro dei nove ceppi analizzati. In particolare, per *B. cereus* la MIC è pari a 100 mg/ml, mentre per gli altri ceppi considerati, inclusi quelli deterioranti, è stata riscontrata una MIC di 25 mg/ml.

Inoltre, è interessante notare che lo sviluppo dei batteri pro-tecnologici non è stato inibito dall'estratto, suggerendo che l'impiego di WRSP non interferirebbe con i batteri dell'acido lattico (LAB) impiegati nei processi di fermentazione alimentare [129]. Il meccanismo alla base dell'attività osservata necessita di ulteriori indagini, considerato che solitamente gli agenti antibatterici mostrano una maggiore attività contro i batteri Gram-positivi rispetto a quelli Gram-negativi. Nel complesso, questi risultati indicano che WRSP possiede un rilevante potenziale applicativo come ingrediente antimicrobico funzionale o naturale anche negli alimenti fermentati.

Tabella 5. Attività antibatterica dell'estratto idroalcolico di WRSP. I risultati indicano il valore medio di tre esperimenti indipendenti.

Specie	Ceppi	Fonte di isolamento	Inibizione	MIC (mg/ml)
Pro-tecnologico				
<i>En. mundtii</i>	WFE3	Farina di frumento	—	n.d.
<i>F. sanfranciscensis</i>	SD22	Lievito madre	—	n.d.
<i>Lt. sakei</i>	SP255	Salame	—	n.d.
<i>Lv. brevis</i>	SD70	Lievito madre	—	n.d.
<i>Lc. lactis</i>	CAG4	Cagliata	—	n.d.
<i>Ln. mesenteroides</i>	MISE643	Latte crudo di pecora	—	n.d.
Deteriorante				
<i>Br. thermosphacta</i>	SP10	Carne di maiale	23,0 ± 0,4	25
<i>P. fluorescens</i>	4G628	Insalata pronta da consumare	19,3 ± 0,2	25
<i>P. lactis</i>	SP198	Salame	17,8 ± 0,2	25
<i>P. poae</i>	4G558	Insalata pronta da consumare	19,0 ± 0,4	25
Patogeno				
<i>A. guillouiae</i>	ICE24	Cubetti di ghiaccio per alimenti	18,2 ± 0,3	25
<i>B. cereus</i>	ICE70	Cubetti di ghiaccio per alimenti	13,5 ± 0,2	100
<i>E. coli</i>	PSL52	PDO Pecorino siciliano	—	n.d.
<i>L. monocytogenes</i>	13BO	Formaggio Gorgonzola	—	n.d.
<i>P. aeruginosa</i>	PSA68	Tessuto animale	—	n.d.
<i>S. Enteritidis</i>	ATCC13076	Sconosciuto	—	n.d.
<i>S. Typhimurium</i>	50432	Molluschi	—	n.d.
<i>St. aureus</i>	ATCC33862	Sconosciuto	17,8 ± 0,2	25
<i>St. epidermidis</i>	ICE244	Cubetti di ghiaccio per alimenti	18,6 ± 0,1	25

Abbreviazioni: MIC, concentrazione minima inibente. *Enterococcus mundtii*, *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, *Latilactobacillus sakei*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*; *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas lactis*, *Pseudomonas poae*; *Acinetobacter guillouiae*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*; nd: non determinato. Simboli: — nessuna inibizione trovata.

2.3.2 SFE

2.3.2.1 Caratterizzazione fitochimica

Il profilo fitochimico di SFE è stato analizzato attraverso tecniche HPLC e saggi colorimetrici. Il valore TPC, determinato con il metodo Folin Ciocalteu, supera i valori riportati per frutti notoriamente molto ricchi di polifenoli, come il lampone nero (980 mg acido gallico equivalenti/100 g di peso secco) e il ribes nero (821 mg/100g) [130]. Anche il contenuto totale di proantocianidine (TPAC), determinato tramite saggio BL-DMAC, si dimostra superiore a quello riportato in letteratura per frutti notoriamente ricchi di tannini come le prugne (62,50 mg PAC A equivalenti/100 g) e le fragole (65,85 mg PAC A equivalenti/100 g) [125]. Inoltre, SFE presenta un elevato contenuto di antocianine (TAC), misurato tramite il metodo del salto del pH con un valore pari a $79,52 \pm 4,12$ mg Cianidina glicoside equivalenti/100 g DW, paragonabile a quello determinato per frutti come il mirtillo rosso (48,88 mg/100g) (Tabella 6). Questo significativo contenuto di antociani riflette l'intensa colorazione dei frutti [112]. Inoltre, abbiamo anche valutato la presenza di carotenoidi. I carotenoidi sono un gruppo di pigmenti responsabili dei colori rosso, arancione e giallo in molti frutti e verdure. I risultati mostrano che il TCC dei frutti di sommacco, espresso come β -carotene equivalente (BCE), risulta relativamente basso (1,5 mg/100 g DW) quando confrontato con il contenuto di carotenoidi caratteristico di altre spezie comuni come lo zafferano o il curry [131].

L'analisi del profilo polifenolico, realizzata in collaborazione con il gruppo del Prof. Mannino, ha dimostrato la presenza di 82 composti bioattivi. In particolare, sono stati rilevati sei antociani, responsabili della tipica pigmentazione rossa del sommacco, tra cui cianidina, idaidina, crisantemina, petunidina e relativi derivati glicosidati. Pur rappresentando solo il 7% del totale dei polifenoli, questi composti contribuiscono significativamente sia all'aspetto visivo del frutto sia al potenziale antiossidante dell'estratto. Una quota consistente (oltre il 15% p/p) dei flavonoidi identificati è costituita dai flavan-3-oli, presenti sia in forma monomerica sia in forma polimerica di flavan-3-oli, in particolare proantocianidine. Queste ultime sono presenti solo in specifiche famiglie di piante e sono note per le loro proprietà antiossidanti e protettive [132].

I flavonoidi rappresentano la classe predominante, con 34 composti identificati (circa il 41% del totale). Tra questi spiccano miricitroside, quercetina e isoquercitrina e, in particolare, la afzelina, la forma glicosidata della fisetina. La presenza di quest'ultima nella pianta del

sommacco è particolarmente interessante, in quanto si tratta di un flavonolo oggetto di crescente interesse per i suoi potenziali effetti neuroprotettivi [133].

I flavoni e flavononi contribuiscono complessivamente per circa il 30% del contenuto fenolico. Tra i flavoni più rilevanti figurano la cosmetina e la skolimosite (anche conosciuta come luteolina 7-O-glucoside e luteolina-7-O-rutinoside) noti per le proprietà antiossidanti e antinfiammatorie [134]; mentre l'apigenina, ben distribuita nel regno vegetale, è studiata per il trattamento delle malattie infiammatorie della pelle e del cancro [135]. I flavononi, rappresentati principalmente da forme glicosidate di eridictiolo e naringenina, costituiscono il 16% del totale dei flavonoidi, confermando il contributo significativo di questa classe alla composizione dell'estratto.

I risultati completi e dettagliati sono disponibili nella pubblicazione di riferimento [97].

Nel complesso, il sommacco si conferma una matrice vegetale con un elevato contenuto di molecole bioattive di potenziale interesse nutraceutico e terapeutico.

Tabella 6. Contenuto composti bioattivi e proprietà antiossidanti di SFE. I valori sono espressi come media $\pm$ DS di tre esperimenti.

TPC	TAC	TPAC	TCC	ABTS	DPPH	FRAP	CAA ₅₀
10,99 $\pm$ 0,06 g GAE/ 100 g di DW	79,52 $\pm$ 4,12 mg CE/100 g di DW	61,58 $\pm$ 5,73 mg PACE/ 100 g di DW	1,74 $\pm$ 1,10 mg BCE/100 g di DW	106,91 $\pm$ 6,11 mmolTE/100g di DW	124,49 $\pm$ 0,98 mmolTE/100g di DW	91,81 $\pm$ 15,30 mmol TE/100g di DW	1,12 $\pm$ 0,09 ug di DW/ml di medium di coltura

Abbreviazioni: contenuto totale di polifenoli (TPC), contenuto totale di antocianine (TAC), proantocianidine totali (TPAC), contenuto totale di carotenoidi (TCC), potere antiossidante riducente ferrico (FRAP), attività antiossidante cellulare (CAA), equivalenti di acido gallico (GAE), equivalenti di proantocianidine di tipo A (PACE), equivalenti di glucoside di cianidina (CE), equivalenti di β -carotene (BCE).

2.3.2.2 Proprietà antiossidanti

Per valutare la capacità antiossidante di SFE, sono stati utilizzati tre saggi colorimetrici in soluzione e il saggio CAA (Tabella 6). In particolare, l'attività radical-scavenging è stata misurata tramite saggi ABTS e DPPH, mentre la capacità di riduzione dei metalli è stata valutata tramite saggio FRAP. Complessivamente, i risultati hanno evidenziato un'elevata attività riducente, significativamente superiore a quella di spezie comunemente utilizzate, come lo zafferano, con valori ABTS e FRAP rispettivamente 5 e 2 volte maggiori [131].

L'attività antiossidante, misurata nel modello cell-based, è particolarmente elevata: il valore stimato CAA₅₀ è di due ordini di grandezza inferiore ai valori determinati, nelle stesse condizioni sperimentali, per estratti vegetali ricchi di polifenoli ottenuti da varie matrici vegetali [119].

In sintesi, i risultati ottenuti hanno evidenziato che l'elevata capacità riducente mostrata dai test in soluzione, si traduce in una vera e propria attività antiossidante in un contesto biologico. Anche se è necessario esaminare la stabilità durante la digestione e la biodisponibilità dei componenti antiossidanti presenti nell'estratto, è interessante notare che, considerando un volume di fluidi gastrointestinali di 600 ml, l'attività antiossidante dimostrata viene raggiunta a concentrazioni mille volte inferiori rispetto a quelle ottenibili nel lume intestinale dopo l'assunzione di quantità di sommacco molto piccole (1 g), compatibili con il tipico uso del sommacco come spezia.

2.3.2.3 Attività antiproliferativa

L'attività antiproliferativa di SFE su diverse linee cellulari (MCF-7, Caco-2, HeLa e HepG2) è stata valutata attraverso il test MTT (Tabella 7). Le concentrazioni utilizzate variavano da 200 a 20 µg DW/ml di terreno di coltura cellulare, risultando da 10 a 200 volte inferiori rispetto ai livelli raggiungibili nel lume intestinale dopo l'assunzione di una quantità di sommacco abitualmente utilizzata in cucina (1-2 g). Gli effetti inibitori della crescita più sostanziali sono stati osservati contro le cellule Caco-2, mentre l'effetto minore è stato osservato nelle cellule HeLa. I dati ottenuti indicano che le cellule di adenocarcinoma coloretale risultano particolarmente sensibili all'attività antiproliferativa esercitata dai composti presenti nell'estratto. In linea con queste osservazioni, uno studio del 2017 ha evidenziato come un estratto idroalcolico di frutti di *Rhus coriaria* (provenienti dal Libano) induca effetti antiproliferativi associati a meccanismi pro-autofagici e pro-apoptotici sulla linea cellulare HT29, con un valore di IC₅₀ pari a 271 µg/ml dopo 72 ore di trattamento. Nello stesso studio, l'IC₅₀ a 48 ore per le cellule Caco-2 è pari a 316 µg/ml, un valore nettamente superiore rispetto a quello riscontrato nel presente lavoro per l'estratto di *Rhus coriaria* di origine siciliana, valutato a 72 ore [136]. Sebbene l'attività antiproliferativa evidenziata possa avere rilevanza *in vivo* solo con la dimostrazione della biodisponibilità dei fitochimici nel sangue, la particolare sensibilità delle cellule Caco-2 nei confronti dell'estratto suggerisce un potenziale protettivo relativo al consumo di questo frutto nella prevenzione del cancro del colon-retto. Poiché il valore GI₅₀ registrato sulle cellule Caco-2 è inferiore rispetto alle concentrazioni del frutto raggiungibili nell'intestino dopo consumo di 1-2 g, è plausibile che l'azione dell'estratto possa avvenire localmente sulle cellule epiteliali intestinali, indipendentemente dalla biodisponibilità sistemica dei composti fitochimici.

Tabella 7. Attività antiproliferativa di SFE contro le linee cellulari tumorali HeLa, HepG2, Caco-2 e MCF-7. I valori di attività antiproliferativa sono espressi come valori GI₅₀ (Growth Inhibitory 50%), in µg di peso secco per ml di mezzo di coltura cellulare. I valori sono espressi come media ± SE di tre esperimenti. Lettere minuscole diverse indicano una differenza significativa a $p \leq 0,05$ come misurato dal multiplo di Tukey.

GI ₅₀			
HepG2	MCF-7	HeLa	CaCo-2
58,53 ± 0,53 ^c	77,19 ± 2,87 ^b	149,74 ± 8,72 ^a	31,08 ± 2,25 ^d

2.3.2.4 Valutazione microbiologica e attività antibatterica

L'analisi microbiologica condotta utilizzando un approccio coltura-dipendente non ha rivelato la presenza di popolazioni deterioranti o patogene (dati non mostrati), indicando l'idoneità igienica della polvere dei frutti di sommacco per l'uso come additivo negli alimenti trasformati. L'attività antibatterica di SFE è stata valutata contro diversi patogeni alimentari associati alle infezioni batteriche di origine alimentare. I risultati mostrano una marcata attività antibatterica sia verso ceppi Gram-positivi (*B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*) che Gram-negativi (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*) (Tabella 8). Le zone di inibizione, comprese tra 18,75 e 22,88 mm, confermano le proprietà inibitorie dell'estratto SFE (Figura 10). La capacità di agire sia contro Gram-positivi che Gram-negativi, è coerente con studi precedenti relativi a estratti di sommacco [137]. L'attività antibatterica, quantificata in termini di MIC, è di 25 mg/ml, ad eccezione del ceppo *S. enteritidis* (12,5 mg/ml); questi risultati sono in linea con osservazioni riportate per estratti etanolic di altre parti della pianta [138]. Tali risultati indicano che l'attività antibatterica dei frutti di sommacco è probabilmente attribuibile al suo contenuto in composti polifenolici.

Tabella 8. Attività antibatterica dei frutti di sommacco contro diversi patogeni batterici. I valori indicano il valore medio di tre saggi indipendenti.

Specie Patogeno	Ceppi	Fonte di isolamento	MIC (mg/ml)
<i>B. cereus</i>	ICE170	Cubetti di ghiaccio per alimenti	25
<i>E. coli</i>	ATCC25922	Sconosciuto	25
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC19114	Sconosciuto	25
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC27853	Sconosciuto	25
<i>S. typhimurium</i>	50432	Molluschi	25
<i>S. enteritidis</i>	ATCC13076	Sconosciuto	12,5
<i>St. aureus</i>	ATCC33862	Sconosciuto	25

Abbreviazioni: *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*. MIC: concentrazione minima inibente.

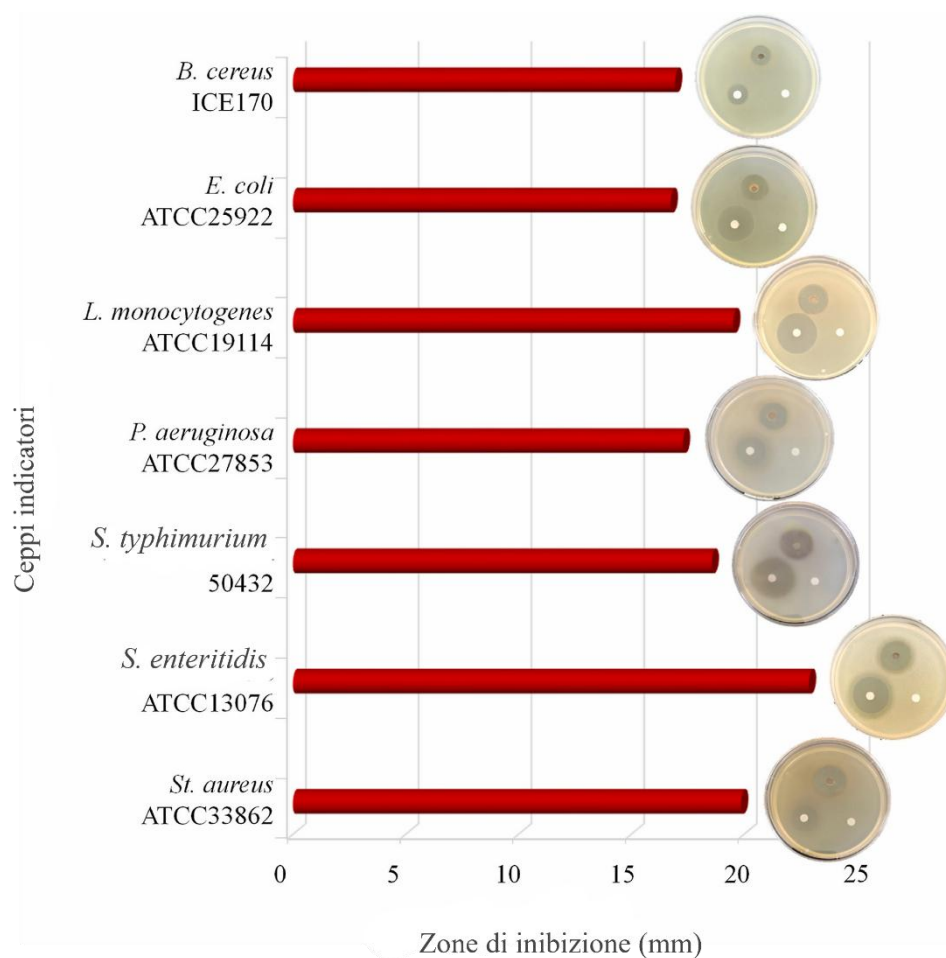


Figura 10. Attività inibitoria dell'estratto di frutti di sommacco in polvere. L'attività è espressa come diametro dell'alone di inibizione (mm) contro i microrganismi testati. Ogni piastra Petri è organizzata nel seguente modo: il pozzetto superiore è riempito con l'estratto dei frutti di sommacco, il disco di carta a sinistra funge da controllo positivo e il disco di carta a destra funge da controllo negativo.

2.4 CONCLUSIONI

I risultati ottenuti mettono in luce l'elevato potenziale dei residui della spremitura a freddo dei semi di lampone rosso (WRSP) come fonte vegetale di interesse per l'estrazione di composti bioattivi. L'elevato contenuto di polifenoli, in particolare quercetina, catechina e proantocianidine a basso peso molecolare, suggerisce che anche quantità moderate di WRSP (5–10 g) possano apportare benefici funzionali significativi. Le attività antiossidanti, antiproliferative e antimicrobiche riscontrate ne evidenziano il potenziale impiego non solo nel settore alimentare, come ingrediente funzionalizzante, ma anche in altri ambiti applicativi.

Si rendono tuttavia necessari ulteriori studi per chiarire la biodisponibilità delle sostanze fitochimiche nei WRSP.

Lo studio condotto sui frutti di sommacco (*Rhus coriaria* L.), ha evidenziato un profilo fitochimico altrettanto promettente, caratterizzato da una marcata attività antiossidante e antiproliferativa. L'estratto si è inoltre distinto per la sua capacità di inibire in maniera efficace diversi patogeni di origine alimentare anche a basse concentrazioni, prospettandone l'impiego come additivo naturale in grado di migliorare le proprietà funzionali e la sicurezza degli alimenti trasformati. Nonostante il buon profilo di sicurezza riportato in letteratura per estratti dei frutti di sommacco o loro parti, ulteriori indagini tossicologiche e studi clinici sono richieste per garantirne un impiego sicuro e standardizzato.

Nel complesso, sia WRSP che i frutti di sommacco si configurano come matrici vegetali di elevato potenziale, capaci di coniugare valore nutrizionale, funzionale e tecnologico. La loro valorizzazione non solo offre prospettive concrete per lo sviluppo di nuovi ingredienti naturali e sostenibili, ma contribuisce a fornire opportunità innovative per la salute umana secondo i principi dell'economia circolare.

La sezione relativa al capitolo 2 raccoglie le analisi sperimentali e le evidenze scientifiche contenute nelle seguenti pubblicazioni peer-reviewed:

1. Di Viola, E., Mannino, G., Serio, G., **La Rosa, L.**, Garofalo, G., Schicchi, R., Settanni, L., Gentile, C., Gaglio, R. (2024). *Phytochemical Profiling and Investigation of Antioxidant, Anti-Proliferative, and Antibacterial Properties in Spontaneously Grown Sicilian Sumac (Rhus coriaria L.) Fruits*. *Food Bioscience*, 61(June):104704.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104704>
2. Mannino, G., Serio, G., Gaglio, R., Busetta, G., **La Rosa, L.**, Lauria, A., Settanni, L., Gentile, C. (2022). *Phytochemical Profile and Antioxidant, Antiproliferative, and Antimicrobial Properties of Rubus idaeus Seed Powder*. *Foods*, 11(17), 2605.
<https://doi.org/10.3390/foods11172605>

Inoltre, una parte dei risultati è stata presentata al 95° Congresso della Società Italiana di Biologia Sperimentale (SIBS), tenutosi a Trieste dal 12 al 15 aprile 2023, ed ha inoltre ricevuto il premio come miglior videoposter, con il titolo:

- “Valorization of food waste: Raspberry seed powder (*Rubus idaeus* L.) as a functionalizing agent of a bakery product.”
La Rosa, L., Serio, G., Mannino, G., Gaglio, R., Settanni, L., Gentile, C.
-

CAPITOLO 3

**Valutazione degli effetti dell'estratto della resina di
Boswellia sacra sulle funzioni rigenerative delle cellule
progenitrici endoteliali in un modello di endotelio
vascolare**

3.1 CONTESTO FISIOPATOLOGICO

3.1.1 Il sistema vascolare e la sua capacità rigenerativa

Il sistema vascolare rappresenta una componente imprescindibile per la sopravvivenza e l'omeostasi dell'organismo, in quanto assicura il trasporto di substrati energetici, intermedi metabolici, ossigeno (O₂), anidride carbonica (CO₂), molecole segnale e prodotti di scarto da e verso tutti i tessuti.

L'endotelio, che riveste la superficie interna dei vasi, è l'elemento cardine di questo sistema. Lungi dall'essere una semplice barriera, l'endotelio modula processi essenziali quali la regolazione del tono vascolare, l'omeostasi emostatica, la permeabilità selettiva, l'infiammazione e l'angiogenesi [139]. L'integrità e le funzioni dell'endotelio risultano quindi fondamentali per preservare l'equilibrio cardiovascolare e, più in generale, la salute dell'intero organismo.

Processi degenerativi associati all'invecchiamento, all'esposizione a fattori ambientali nocivi (chimici o fisici), così come numerose condizioni patologiche (diabete, aterosclerosi o ipertensione), compromettono la fisiologia endoteliale riducendo la capacità dell'endotelio di rispondere a stimoli rigenerativi, aumentando così la vulnerabilità a disordini cardiovascolari [140]. Lo stress ossidativo è tra i meccanismi coinvolti nella disfunzione endoteliale. Un eccesso di ROS riduce la biodisponibilità di monossido di azoto (NO), prodotto dalle cellule endoteliali tramite l'enzima endoteliale ossido nitrico sintasi (eNOS). Il NO svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi vascolare, regolando il tono vasale, inibendo l'adesione piastrinica e partecipando a processi rigenerativi attraverso la stimolazione della migrazione, proliferazione e angiogenesi delle cellule endoteliali [141].

La capacità rigenerativa del sistema vascolare è un processo complesso che si fonda su un equilibrio dinamico tra la riparazione locale mediata dalle cellule endoteliali residenti, l'angiogenesi stimolata da segnali molecolari e il contributo delle cellule progenitrici endoteliali circolanti (*Endothelial Progenitor Cells*, EPC) [142]. Le cellule endoteliali residenti, che rivestono il lume dei vasi sanguigni, rappresentano la prima linea di risposta al danno vascolare, partecipando attivamente al ripristino dell'endotelio danneggiato attraverso processi di migrazione e proliferazione. Nelle fasi iniziali post-lesione, le cellule migrano ed estendono il proprio corpo cellulare verso l'area lesa e, successivamente, proliferano per ristabilire la continuità della superficie endoteliale. [143], [144].

Parallelamente, queste cellule rilasciano segnali solubili, tra cui il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e altre chemochine, che favoriscono la mobilitazione delle EPC dal midollo osseo. Le EPC dal midollo migrano verso il sito leso, attraverso un processo noto come *homing*, dove possono differenziarsi in cellule endoteliali mature oppure contribuire indirettamente alla riparazione tissutale mediante la secrezione di fattori paracrini che promuovono l'angiogenesi e la proliferazione locale [145]. L'angiogenesi, ovvero la formazione di nuovi capillari a partire da vasi preesistenti, rappresenta un ulteriore meccanismo cardine per ristabilire il flusso ematico e l'ossigenazione tissutale e le condizioni microambientali necessarie alla rigenerazione dell'endotelio [139]. Complessivamente, migrazione e proliferazione delle cellule residenti insieme al contributo delle EPC sono fondamentali per assicurare un'efficiente rigenerazione endoteliale dopo un insulto.

3.1.2 Le cellule progenitrici endoteliali circolanti

Le cellule progenitrici endoteliali circolanti costituiscono una popolazione eterogenea di cellule mononucleate, implicate in modo cruciale nel mantenimento dell'integrità dell'endotelio vascolare e nella promozione della neovascolarizzazione, sia in condizioni fisiologiche che patologiche. La loro scoperta risale al 1997, grazie agli studi pionieristici di Asahara e collaboratori, che hanno inaugurato un nuovo paradigma nello studio della biologia endoteliale e della rigenerazione vascolare [142].

Nel tempo, la definizione e la classificazione delle EPC hanno subito un'evoluzione progressiva. Oggi è ampiamente riconosciuto che la loro principale origine sia il midollo osseo (*bone marrow*, BM), sebbene tali cellule possano essere identificate in diversi stadi di maturazione anche nel sangue periferico. Le EPC, condividendo precursori comuni con altre linee cellulari, possono infatti essere isolate da fonti non ematopoietiche, tra cui sangue cordonale e vari tessuti (adiposo, cardiaco e nervoso) [146].

Queste cellule rappresentano una frazione quantitativamente ridotta della popolazione midollare (1–5%) e, negli individui sani, costituiscono fino allo 0,01% delle cellule circolanti [147]. Nonostante la loro esiguità numerica, le EPC possiedono un rilevante potenziale rigenerativo: una volta mobilitate dal BM, entrano in circolo, migrano verso i siti di danno endoteliale e si differenziano in cellule endoteliali mature, contribuendo così alla riparazione vascolare e all'angiogenesi. L'efficacia delle EPC è strettamente dipendente dal loro numero e dalla loro funzionalità. Evidenze cliniche hanno dimostrato che l'invecchiamento, il fumo e diverse condizioni patologiche, tra cui dislipidemia e ipertensione, possono comprometterne la

mobilizzazione e la capacità rigenerativa, con conseguente riduzione del potenziale angiogenico e incremento della suscettibilità alle malattie cardiovascolari [147], [148].

Negli ultimi anni si è intensificato l'interesse verso il potenziale terapeutico degli approcci di tipo *cell-based* per il trattamento delle patologie vasodegenerative. Nella medicina vascolare, è stato evidenziato il ruolo vasoriparativo di cellule staminali e progenitori adulti nei tessuti ischemici [149]. Una fonte di cellule endoteliali autologhe con potenziale per l'uso in applicazioni terapeutiche sono le EPC a crescita tardiva note anche come cellule formanti colonie endoteliali (ECFC) [150], [151]. Dal punto di vista pratico, il paradigma del trapianto autologo prevede l'isolamento delle ECFC dal sangue periferico del paziente, l'espansione *ex vivo* e il potenziamento della loro attività mediante modulazione farmacologica e successivo reimpianto nel paziente. Tuttavia, l'efficacia di questi approcci è ancora oggetto di dibattito, a causa della variabilità nella definizione fenotipica delle cellule, delle difficoltà di espansione *ex vivo* e dei limiti legati alla loro integrazione nei tessuti bersaglio [152], [153].

Parallelamente agli approcci cellulari, si è sviluppata una linea di ricerca complementare volta a modulare endogenamente il processo di rigenerazione vascolare mediante molecole bioattive di origine naturale. In questo contesto, alcuni polifenoli e terpeni, sono stati identificati come composti in grado di supportare la funzione endoteliale, agendo sia attraverso proprietà antiossidanti e antinfiammatorie, sia mediante la regolazione di vie angiogeniche chiave, con effetti che includono l'aumento della disponibilità di NO, la modulazione dei pathway VEGF-dipendenti [154], [155]. In questo contesto, il preconditioning *ex vivo* delle ECFC potrebbe potenziare la sopravvivenza e la capacità angiogenica delle cellule destinate al trapianto. Contestualmente, l'integrazione nutraceutica potrebbe contribuire a creare un microambiente endoteliale favorevole, prevenendo stress ossidativo e infiammazione. L'integrazione tra queste strategie apre interessanti opportunità nell'ambito della medicina rigenerativa vascolare, ma resta necessaria una più approfondita comprensione dei meccanismi molecolari alla base della risposta endoteliale, nonché studi clinici robusti.

3.1.3 Le cellule formanti colonie endoteliali come modello sperimentale per lo studio della funzione vascolare

Dalla progenie delle EPC derivano le cellule formanti colonie endoteliali (*Endothelial Colony-Forming Cells*, ECFC), caratterizzate da un elevato potenziale proliferativo, migratorio e differenziativo. Le ECFC possono essere isolate sia dal sangue periferico di adulti (*Adult Blood-Derived Endothelial Colony Forming Cells*, AB-ECFC) sia dal sangue cordonale (*Cord*

Blood-Derived Endothelial Colony Forming Cells, CB-ECFC) [156]. Queste ultime, rispetto alle AB-ECFC, presentano vantaggi significativi: *in vitro* generano un numero maggiore di colonie e possono essere ampiamente espanse senza manifestare rapidamente senescenza replicativa; inoltre, non essendo ancora specializzate in un fenotipo endoteliale tessuto-specifico, rappresentano un modello sperimentale di cellule endoteliali generiche [157], [158]. Le CB-ECFC si configurano dunque come un sistema cellulare idoneo per valutare l'impatto di composti bioattivi sul sistema vascolare, permettendo di studiare processi quali la proliferazione, la migrazione e l'angiogenesi in un contesto fisiologicamente rilevante e sperimentalmente riproducibile.

3.2 STATO DELL'ARTE E RAZIONALE DELLA RICERCA

Nonostante le comprovate evidenze sugli effetti antinfiammatori degli estratti di *Boswellia*, manca un'approfondita caratterizzazione del loro impatto sulle funzioni rigenerative in un modello di cellule endoteliali umane. Alla luce delle evidenze fin qui discusse, il nostro studio si propone di colmare tale lacuna, investigando gli effetti di BosLiq® Fluid Extract (BFE), sulla proliferazione, migrazione e capacità angiogenica di cellule progenitrici endoteliali isolate dalle cellule mononucleate del sangue del cordone ombelicale (CB-ECFC) e coltivate *ex vivo*. Tale indagine mira a chiarire le potenziali applicazioni del BFE contribuendo a definire nuove strategie basate su composti naturali per il supporto alla salute vascolare e la prevenzione di disfunzioni endoteliali.

3.3 MATERIALI E METODI

3.3.1 Campione vegetale

Per lo studio, campioni di estratto fluido BosLiq®, denominato per lo studio BosLiq Fluid Extract (BFE), sono stati forniti dall'azienda Biosfered S.r.l. (Torino, Italia) come liquido giallastro ottenuto da resina di *Boswellia sacra* e contenente olio di riso denominato per lo studio Rice Oil (RO).

3.3.2 Preparazione del campione per le analisi cromatografiche

La caratterizzazione chimica di BosLiq® Fluid Extract è stata determinata dal Dott. Alberto Asteggiano, presso l'azienda Abel Nutraceuticals (Torino). Ai fini dell'analisi HPLC, quantità di BFE comprese tra 50 e 100 mg sono state pesate e miscelate con 10 ml di metanolo; la soluzione è stata sottoposta a estrazione in bagno a ultrasuoni per 20 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, la frazione insolubile è stata precipitata a $5000 \times g$ per 5 minuti in centrifuga e il surnatante è stato diluito 20 volte (per analisi HPLC-PDA) e 100 volte (per analisi HPLC-MS) in vial da autosampler. Per l'analisi mediante gascromatografia (GC), il materiale è stato estratto con 10 ml di cicloesano e trattato secondo le stesse condizioni impiegate per l'HPLC, con diluizione finale in cicloesano.

3.3.3 Analisi quali-quantitativa degli acidi boswellici mediante HPCL-MS/PDA

Per l'identificazione e la quantificazione degli acidi boswellici in BFE, è stato adottato un approccio analitico basato sulla HPLC. Il metodo HPLC sviluppato e validato dal Dott. Asteggiano *et al.* [159], è stato applicato sia all'accoppiamento con spettrometria di massa (analisi qualitativa) sia al rivelatore a diodi (analisi quantitativa). Questo metodo permette di separare, identificare e quantificare con elevata sensibilità e specificità i diversi acidi boswellici presenti nell'estratto, sfruttando sia le caratteristiche cromatografiche che gli spettri di massa e di assorbimento UV-visibili.

3.3.4 Analisi quali-quantitativa dei terpeni volatili e semivolatili mediante GC-MS/FID

È stato adottato un approccio analitico basato sulla gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa e al rivelatore a ionizzazione di fiamma (GC-MS/FID), messo a punto e validato dal Dott. Asteggiano, per la determinazione dei composti neutri e a basso punto di ebollizione presenti in BFE. Questa tecnica consente la separazione e l'identificazione qualitativa e quantitativa di molecole volatili o semi-volatili, combinando l'elevata risoluzione cromatografica con la specificità strutturale fornita dall'analisi di massa.

La GC-MS è stata utilizzata per l'identificazione iniziale dei composti principali mediante confronto con NIST 20 e valori LRI, mentre la GC-FID, grazie alla sua ampia risposta lineare,

è stata impiegata per la quantificazione utilizzando come standard le miscele di terpeni di Cannabis.

3.3.5 Isolamento e condizioni di coltura delle cellule endoteliali

Campioni di sangue del cordone ombelicale umano sono stati raccolti da neonati sani a termine in collaborazione con la Banca del Sangue Cordone dell'Ospedale Saint Louis (Parigi, Francia). Le cellule endoteliali formanti colonie (CB-ECFC) sono state isolate da cellule mononucleate (*Mononuclear Cells*, MNC) ottenute mediante centrifugazione su gradiente di densità con soluzione Pancoll (Pan Biotech, Aidenbach, Germania), come descritto in precedenza [157]. Le MNC isolate sono state seminate in piastre da 12 pozzetti pre-rivestite con collagene di tipo I da coda di ratto (Corning, Glendale, AZ, USA) e coltivate in mezzo EGM2 (EBM2 + EGM-2 single quotes kit con il 5% di FBS; Lonza, Basilea, Svizzera). Il mezzo è stato sostituito due volte a settimana fino alla comparsa delle colonie endoteliali, tipicamente dopo un periodo compreso tra 7 e 21 giorni (EPC tardive, anche note come ECFC).

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti impiegando le CB-ECFC, isolate da differenti donatori, a passaggi compresi tra 3 e 12.

3.3.6 Caratterizzazione delle CB-ECFC

Per confermare il fenotipo delle CB-ECFC isolate, è stata eseguita citofluorimetria a flusso secondo protocolli precedentemente validati presso l'Unità Inserm U1197 (Université Paris-Saclay, Francia). [160]. In breve, le cellule coltivate sono state tripsinizzate, lavate con PBS contenente 3% FBS e incubate per 20 min a 4 °C con i seguenti anticorpi: anti-VEGFR-2/KDR coniugato APC, anti-CD144 (VE-caderina) coniugato PE, anti-CD31 coniugato FITC (Miltenyi, Gladbach, Germania). Cellule non marcate sono state impiegate come controllo.

3.3.7 Saggio di vitalità cellulare

Il saggio MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossiphenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio; Promega, Madison, WI, USA) è stato utilizzato per valutare l'effetto del BFE sulla proliferazione delle CB-ECFC. Il BFE e il RO sono stati diluiti serialmente nel mezzo EGM2 a partire da soluzioni stock in DMSO. Per mantenere la concentrazione finale di DMSO

inferiore al 0,25% (v/v), gli intervalli di trattamento selezionati per BFE erano compresi tra 2,41 e 120,25 µg/ml. Le cellule sono state seminate a densità di 3×10^4 cellule/cm² in piastre da 96 pozzetti e incubate per 24 ore a 37 °C. Successivamente, sono state trattate con BFE e RO per 24, 48 e 72 ore. Dopo ogni incubazione, è stato aggiunto il reagente MTS e le piastre incubate per 3 ore a 37 °C. I controlli negativi sono stati incubati con mezzo contenente 0,25% (v/v) DMSO per escludere effetti dovuti al solvente. L'assorbanza è stata misurata a 490 e 630 nm. La prima piastra (P0) è stata analizzata 24 ore dopo la semina; le successive a 24, 48 e 72 ore senza cambio di mezzo. I valori sono stati corretti per l'assorbanza di fondo dei pozzetti senza cellule.

3.3.8 Analisi citofluorimetrica dei marker di attivazione endoteliale

Gli effetti del trattamento con BFE sull'espressione di marcatori di attivazione endoteliale sono stati valutati mediante citofluorimetria. Le CB-ECFC, al raggiungimento di circa il 90% di confluenza, sono state trattate per 24 ore con concentrazioni selezionate di BFE o con TNF- α (1 e 10 ng/ml). Gli anticorpi utilizzati sono di seguito riportati: Biotina-anti-ICAM (CD54) e PE-anti-VCAM (CD106) (Miltenyi, Gladbach, Germania). Le analisi sono state condotte con Fortessa (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) e i dati elaborati con FlowJo V10 (FlowJo, Ashland, OR, USA).

3.3.9 Saggio *Wound Healing*

Per indagare gli effetti del BFE sulla capacità migratoria delle CB-ECFC in una superficie bidimensionale è stato impiegato il *Wound Healing assay*. Le cellule sono state seminate ad alta densità in piastre da 12 pozzetti e incubate a 37 °C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂. Una volta raggiunta la confluenza, una ferita (*scratch*) lineare è stata creata sul monostrato cellulare utilizzando un puntale sterile da 200 µl. In seguito, le cellule sono state lavate due volte con PBS per rimuovere i detriti cellulari e trattate con EGM-2 contenente lo 0,25% (v/v) di DMSO (controllo) oppure concentrazioni selezionate di BFE (2,41 – 15,03 µg/ml) e RO. Le immagini sono state acquisite al tempo zero (T0) e dopo 24 ore mediante una fotocamera Nikon D5300 (Nikon, Tokyo, Giappone). L'area di chiusura dello *scratch* è stata quantificata con il software ImageJ.

3.3.10 Saggio di migrazione Transwell

Gli effetti di BSE sulla migrazione delle CB-ECFC sono stati valutati in un sistema tridimensionale, mediante inserti Transwell (Corning, Glendale, AZ, USA). Dopo un periodo di *starvation* di 4 ore in EBM2 integrato con lo 0,2% (v/v) di FBS e privo di fattori di crescita, le cellule sono state staccate mediante tripsina e 5×10^4 cellule sono state seminate nella camera superiore di inserti da 8 μm , posizionati in piastre da 24 pozzetti. Nella camera inferiore è stato aggiunto 1 ml di EBM2 + 0,2% v/v FBS contenente VEGF (1 ng/ml), oppure concentrazioni selezionate di BFE. Dopo 5 ore di incubazione a 37 °C, le cellule non migrate, presenti sul lato superiore della membrana, sono state rimosse con un batuffolo di cotone. Le cellule migrate sul lato inferiore sono state fissate con paraformaldeide (PFA) al 4% e successivamente colorate con RAL 555 (RAL Diagnostics, Martillac, Francia). Il numero di cellule migrate è stato quantificato mediante analisi delle immagini con il software ImageJ.

3.3.11 Produzione di ossido nitrico (NO)

La produzione di ossido nitrico (NO) è stata valutata mediante saggio fluorimetrico utilizzando la sonda DAF-FM (4-amino-5-metilamino-2',7'-difluoresceina; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Le CB-ECFC sono state coltivate fino a raggiungere circa il 90% di confluenza, successivamente lavate con PBS e trattate con diverse concentrazioni di BFE. Come controllo negativo sono state utilizzate cellule non trattate, incubate con EGM2 contenente lo 0,25% (v/v) di DMSO. Dopo un periodo di 24 ore a 37 °C, le cellule sono state incubate per 1 ora insieme alla sonda DAF-FM (1 μM). Successivamente, sono state staccate mediante tripsina/EDTA, centrifugate e risospese in PBS contenente lo 0,5% v/v di FBS. La fluorescenza è stata misurata tramite citofluorimetria con il sistema BD Accuri™ C6 Plus (BD Biosciences).

3.3.12 Saggio di angiogenesi *in vitro*

Per valutare l'effetto del BFE sulla capacità delle CB-ECFC di formare strutture tubulari, è stata utilizzata la matrice extracellulare Geltrex™ (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), che simula *in vitro* l'ambiente fisiologico necessario per l'angiogenesi. In breve, 200 μl di Geltrex™ sono stati distribuiti su una piastra da 48 pozzetti (precedentemente raffreddata su ghiaccio), e

incubati a 37 °C per 1 ora per consentire la solidificazione del gel. Le CB-ECFC, pretrattate per 24 ore con o senza BFE, sono state successivamente seminate sul Geltrex™ ad una densità di 1×10^4 cellule per pozzetto. Come controllo sono state utilizzate cellule coltivate con EGM2 contenente lo 0,25% (v/v) di DMSO.

Dopo 24 ore, le immagini delle reti tubulari formate sono state acquisite con un microscopio ottico invertito e analizzate tramite ImageJ per quantificare la lunghezza totale dei tubi, il numero di strutture chiuse e i punti di ramificazione.

3.3.13 Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state condotte con software Prism (GraphPad). Se non diversamente indicato, i dati sono stati elaborati mediante analisi della varianza a una via (ANOVA) seguita dal test post hoc di Dunnett oppure con t-test di Student. I risultati sono stati espressi come media $\pm$ SEM o $\pm$ SD. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

I dati sperimentali presentati nella sezione Materiali e Metodi, da cui derivano i risultati delle sezioni successive, sono stati raccolti tra il secondo semestre del primo anno di dottorato e l'inizio del secondo anno. In questo periodo, salvo diversa indicazione, tutte le attività descritte sono state svolte dalla sottoscritta durante il periodo di *PhD visiting* presso l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) – U1197, Hôpital Paul Brousse, Villejuif (Francia).

3.4 RISULTATI

3.4.1 Caratterizzazione chimica di BFE

La caratterizzazione analitica di BosLiq® Fluid Extract è stata eseguita attraverso diversi approcci strumentali, scelti in funzione delle proprietà chimico-fisiche delle principali classi di molecole presenti nella matrice. In considerazione dell'elevata temperatura di ebollizione degli acidi triterpenici, la loro identificazione è stata condotta mediante HPLC-MS, mentre la quantificazione è stata effettuata tramite HPLC accoppiata a rivelatore UV-VIS.

Le analisi hanno permesso l'identificazione putativa di una serie di acidi triterpenici, tra cui KBA, AKBA, α -BA, β -BA, A α BA e A β BA. Il profilo di abbondanza degli BA, riportato nella Tabella 9, mostra una netta predominanza delle forme acetilate, con AKBA ($47,0 \pm 2,13$ g/kg) e A β BA ($50,4 \pm 3,34$ g/kg) come componenti maggioritari. Le forme non acetilate, α -BA ($39,1 \pm 1,01$ g/kg) e β -BA ($33,0 \pm 2,20$ g/kg), risultano presenti in quantità intermedie, mentre KBA ($10,6 \pm 0,90$ g/kg) e A α BA ($13,1 \pm 1,10$ g/kg) rappresentano i costituenti meno abbondanti.

L'analisi della frazione volatile, eseguita mediante GC-MS e GC-FID, ha permesso l'identificazione e la quantificazione di un gruppo di diterpeni appartenenti alla serie cembrenica, caratterizzata da un anello macrociclico a 14 atomi di carbonio. All'interno di questa serie i composti identificati sono: l'incensolo (confermato anche mediante uno standard analitico di riferimento), l'iso-incensolo, il serratolo e l'iso-serratolo (Figura 11). A causa della parziale sovrapposizione dei picchi di iso-incensolo e serratolo, non è stato possibile quantificarli separatamente tramite GC-FID. Le informazioni sull'abbondanza relativa sono state stimate dai segnali MS, che indicano un contributo prevalente del serratolo; l'abbondanza è stata quindi riportata come somma complessiva. Al contrario, la parziale co-eluzione tra incensolo e iso-serratolo ha consentito la ricostruzione del profilo dei picchi, rendendo possibile una quantificazione attendibile delle singole specie. Tra i diterpeni, il più abbondante identificato nel campione è l'iso-serratolo, seguito dall'incensolo e, infine, dalla combinazione serratolo + iso-incensolo (Tabella 9).

Tabella 9. Caratterizzazione quali-quantitativa dei composti bioattivi di Bosliq® Fluid Extract.

HPLC-MS/PDA				
RT (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	m/z	Composto	Contenuto g/Kg in BFE (± SD)
10,2	469	451, 407, 391	KBA	10,6 ± 0,90
14	511	451, 361	AKBA	47,0 ± 2,13
17,5	455	437, 409, 377	α-BA	39,1 ± 1,01
18,7	455	437, 409, 377	β-BA	33,0 ± 2,20
21,7	497	459, 437	AαBA	13,1 ± 1,10
22,7	497	459, 437, 395	AβBA	50,4 ± 3,34
GS-MS/FID				
RT (min)	[M] ⁺ (m/z)	m/z	Composto	Contenuto g/Kg in BFE (± SD)
15,1	306	221, 156	Iso-incensolo	7,4 ± 0,7 (somma)
15,1	290	272, 257, 229, 202, 189	Serratolo	
15,31	306	288, 263, 221, 175, 156	Incensolo	7,5 ± 0,2
15,5	290	272, 247, 229, 189, 163	Iso-serratolo	54,8 ± 3,2

Abbreviazioni: AKBA: acido 3-O-acetil-11-cheto-β-boswellico; KBA: acido 11-cheto-β-boswellico; α-BA e β-BA: acido α e β-boswellico; AαBA e AβBA: acido 3-O-acetil-α e β-boswellico; BFE: Bosliq Fluid Extract.

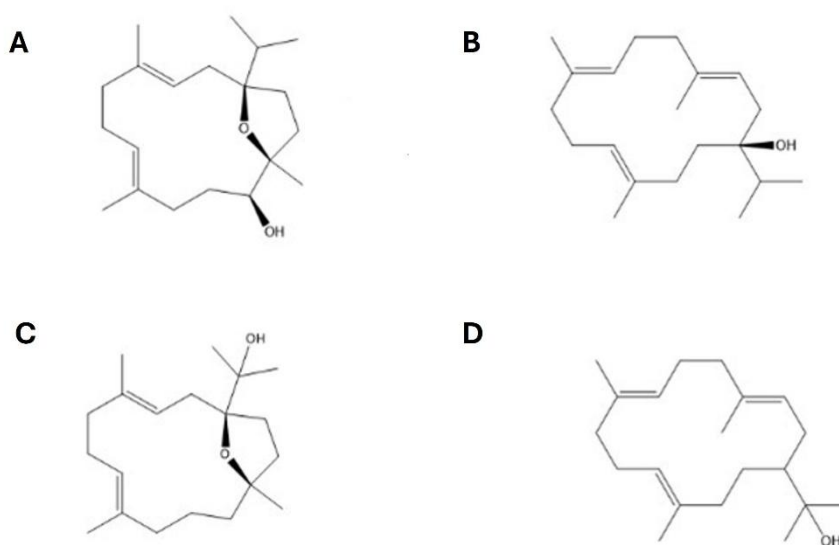


Figura 11. Strutture chimiche dei diterpeni cembrenici presenti in BosLiq® Fluid Extract. (A) incensolo, (B) serratolo, (C) iso-incensolo e (D) iso-serratolo.

3.4.2 Caratterizzazione delle CB-ECFC

Le cellule delle colonie comparse tra i 7 e i 21 giorni di coltura nel terreno EGM2, erano positive per i marcatori di superficie CD31, l'endoteliale vascolare [VE]-caderina (CD144) e il recettore del fattore di crescita endoteliale-2/recettore del dominio dell'inserito chinasi (VEGFR-2/KDR) (Figura 12).

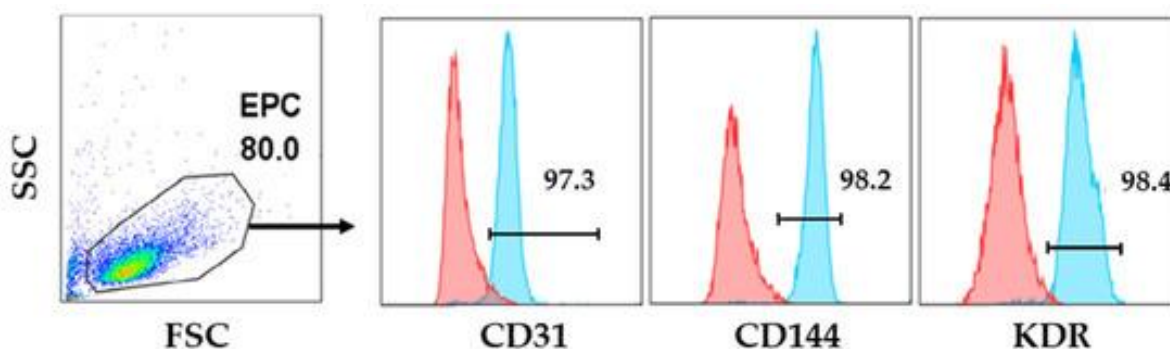


Figura 12. Profilo di espressione dei marcatori di superficie endoteliale nelle EPC rilevata mediante citometria a flusso. Le cellule, isolate da campioni di sangue cordonale umano, sono state marcate con anticorpi anti-VEGFR-2/KDR coniugati con aloficocianina (APC), anti-CD31 coniugati con isotiocianato di fluoresceina (FITC) e anti-CD144 (caderina endoteliale vascolare [VE-caderina]) coniugati con ficoeritrina (PE). Le cellule non colorate sono state utilizzate come controllo negativo (picco rosso). I risultati mostrati sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti.

3.4.4 Effetti del trattamento con BFE sulla proliferazione delle CB-ECFC

Gli effetti del BFE e del suo eccipiente (RO) sull'attività proliferativa delle CB-ECFC sono stati valutati mediante saggio MTS. Come riportato in Figura 13, le cellule di controllo hanno raggiunto la confluenza dopo 48 ore di coltura. Il trattamento con BFE ha indotto un effetto antiproliferativo nelle prime 24-48 ore, mentre un effetto citotossico è stato osservato alle concentrazioni più elevate (da 120,25 a 30,06 $\mu\text{g/ml}$), tra 48 e 72 ore di trattamento (Figura 13A).

Parallelamente, sono stati effettuati controlli specifici con RO per discriminare eventuali effetti dell'eccipiente (Figura 13B). Le concentrazioni testate (1,84–57,38 $\mu\text{g RO/ml}$ medium cellulare) comprendevano l'intervallo di RO corrispondente alle dosi di BFE utilizzate (2,41 – 120,25 $\mu\text{g/ml}$), calcolato in base alla sua percentuale compositiva in BFE (49,4%). In nessuna delle condizioni analizzate, il RO ha influenzato negativamente la vitalità cellulare delle CB-ECFC rispetto al controllo ($p > 0,05$), confermando l'assenza di citotossicità attribuibile all'eccipiente.

Sulla base di questi dati, i successivi esperimenti sono stati condotti utilizzando le concentrazioni di BFE di 2,41, 4,81, 7,52 e 15,03 $\mu\text{g/ml}$.

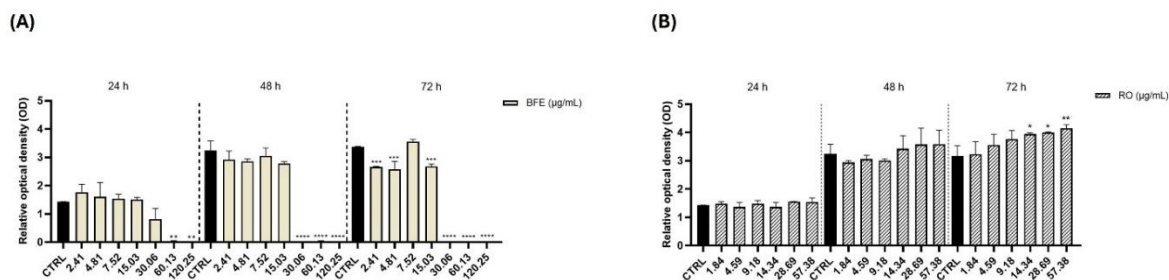


Figura 13. Effetto del trattamento con BoLiq Fluid Extract (BFE) e con l'eccepiante olio di riso (RO) sulla proliferazione delle CB-ECFC. Le CB-ECFC sono state seminate in piastre a 96 pozzetti e trattate con concentrazioni variabili di BFE (A) o RO (B) per 24, 48 o 72 ore. La vitalità cellulare è stata determinata utilizzando il test MTS, con assorbanza misurata a 630 nm e correzione del fondo a 490 nm. L'asse Y mostra il rapporto tra i valori di densità ottica nei campioni trattati rispetto a quelli di controllo in ogni punto temporale, normalizzato alla densità ottica iniziale misurata a $t = 0$. Tutti i risultati sono espressi come media $\pm$ SD di 3 esperimenti condotti in triplice copia. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'ANOVA a una via seguita dal test post hoc di Dunnett: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ rispetto al gruppo di controllo (CTRL).

3.4.5 Espressione di VCAM-1 e ICAM-1 nelle CB-ECFC trattate con BFE

Per valutare l'effetto del BFE sui marcatori di attivazione endoteliale e risposta infiammatoria, le CB-ECFC sono state trattate per 24 ore con dosi selezionate dell'estratto. Successivamente sono stati analizzati i livelli di espressione dei principali marker di adesione cellulare, VCAM-1 e ICAM-1, noti indicatori di attivazione pro-infiammatoria dell'endotelio. Nelle nostre condizioni sperimentali, le due concentrazioni di $\text{TNF-}\alpha$ sono state utilizzate come controlli positivi. I risultati indicano che nessuna delle concentrazioni di BFE ha indotto un aumento significativo dell'espressione di VCAM-1 e ICAM-1 rispetto al controllo basale, rimanendo inoltre al di sotto dei livelli osservati con entrambe le dosi di $\text{TNF-}\alpha$ (Figura 14; $p > 0,05$).

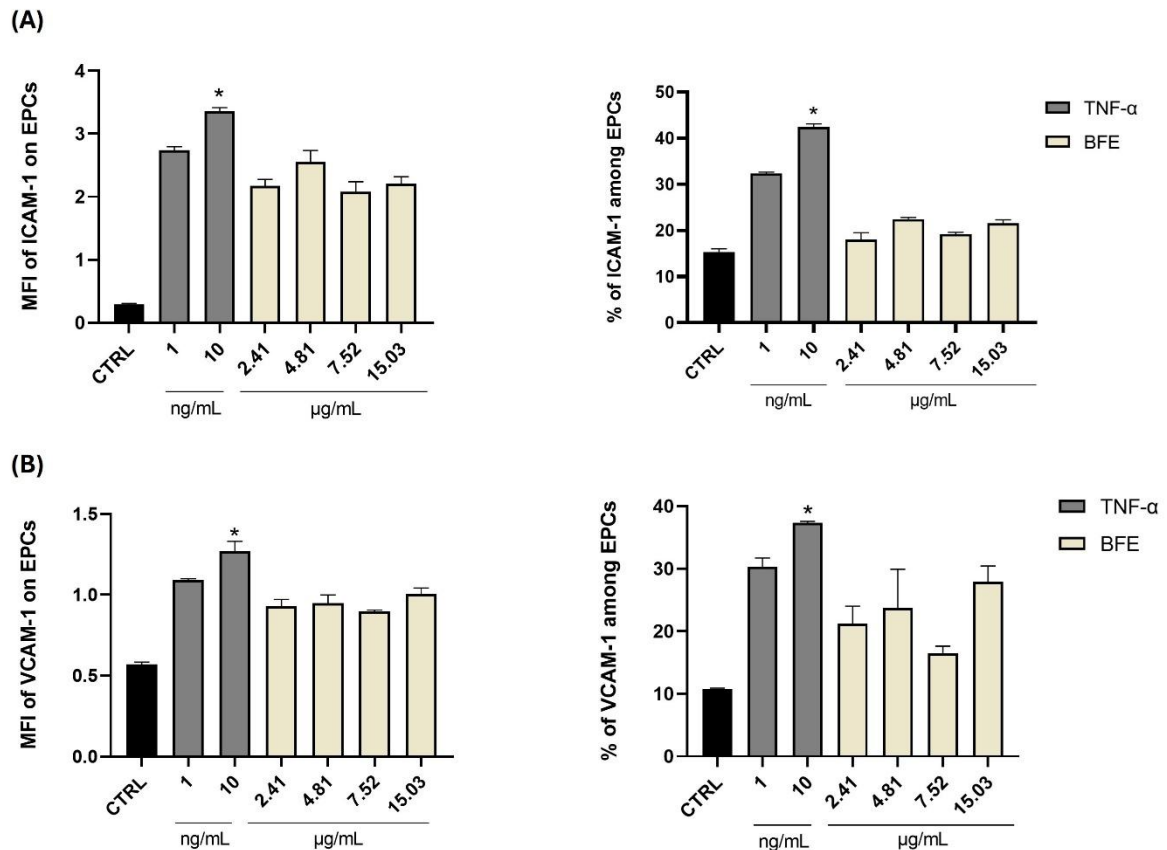


Figura 14. Effetti del trattamento con BosLiq Fluid Extract (BFE) sull'espressione dei marcatori infiammatori. Le CB-ECFC sono state coltivate non trattate (CTRL) o trattate per 24 ore con varie concentrazioni di BFE o con TNF α (1 ng/ml o 10 ng/ml). Dopo l'incubazione, le cellule sono state raccolte e colorate con anticorpi Biotina-anti-ICAM1 e PE-anti-VCAM1. La colorazione è stata valutata mediante citometria a flusso e i dati grezzi sono stati elaborati utilizzando il software FlowJo V10. Quindi sono state quantificate la percentuale di cellule positive e l'intensità media della fluorescenza (MFI) per ICAM-1 (A) e VCAM-1 (B). I risultati sono espressi come media $\pm$ SD di 2 esperimenti indipendenti. Le cellule coltivate in EGM2 senza TNF α sono servite come controllo (CTRL). La significatività statistica è stata eseguita utilizzando il test di Kruskal-Wallis seguito dal test di confronto multiplo di Dunn: * $p < 0,05$ rispetto al gruppo di controllo (CTRL).

3.4.6 Effetti del trattamento con BFE sulla migrazione e la mobilità delle CB-ECFC

Per valutare l'impatto del BFE sulle funzioni rigenerative delle EPC, come la mobilità e la migrazione, sono stati eseguiti il saggio *Wound Healing* e il test di migrazione su Transwell.

Nel saggio Wound Healing, le CB-ECFC trattate con BFE hanno mostrato un incremento della mobilità rispetto alle cellule di controllo (Figura 15A), con un andamento dose-dipendente. Dopo 24 ore, infatti, il trattamento con BFE ha accelerato significativamente la mobilità e la migrazione cellulare, come evidenziato da una riduzione più rapida dell'area della ferita rispetto alle cellule controllo ($p < 0,01$). Nello specifico, nelle cellule trattate con 15,03 $\mu\text{g/ml}$, la percentuale della wounded area residua era pari a $5,96 \pm 1,06\%$, a fronte del $33,45 \pm 1,19\%$

nelle cellule controllo (Figura 15B). Al contrario, la concentrazione più bassa di BFE non ha determinato variazioni statisticamente significative nella chiusura della ferita rispetto al controllo ($p > 0,05$). Per verificare che gli effetti osservati non fossero imputabili all'eccipiente olio, le CB-ECFC sono state trattate con RO alle concentrazioni corrispondenti a quelle presenti nel BFE. In particolare, il trattamento con 7,17 $\mu\text{g/ml}$ di RO – equivalente alla quantità contenuta in 15,03 $\mu\text{g/ml}$ di BFE – non ha determinato variazioni significative nella velocità di chiusura della ferita rispetto al controllo ($p > 0,05$).

L'effetto pro-migratorio del BFE è stato ulteriormente confermato mediante il saggio di migrazione Transwell. Sebbene non sia emersa una chiara relazione dose-dipendente, tutte le concentrazioni testate, in condizioni di serum starvation (EBM2 + 0,2% v/v FBS), hanno incrementato la migrazione cellulare rispetto alle cellule controllo (Figura 15C). In particolare, la percentuale di cellule migrate nel controllo è risultata pari a $161,12 \pm 10,75\%$, mentre le cellule trattate con BFE hanno mostrato valori significativamente più elevati: $215,63 \pm 20,33\%$ (15,03 $\mu\text{g/ml}$), $263,13 \pm 21,04\%$ (7,52 $\mu\text{g/ml}$), $268,50 \pm 7,07\%$ (4,81 $\mu\text{g/ml}$) e $281,11 \pm 9,45\%$ (2,41 $\mu\text{g/ml}$) (Figura 15D). È interessante osservare che, ad eccezione della concentrazione più alta, tutte le altre concentrazioni di BFE hanno indotto una migrazione cellulare paragonabile o addirittura superiore a quella osservata con 1 ng/ml di VEGF ($254,08 \pm 15,73\%$), utilizzato come controllo positivo. Il VEGF essendo riconosciuto per il suo ruolo chiave nella regolazione di processi coinvolti nell'angiogenesi (come la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali), rappresenta il gold standard sperimentale per l'analisi comparativa della migrazione cellulare.

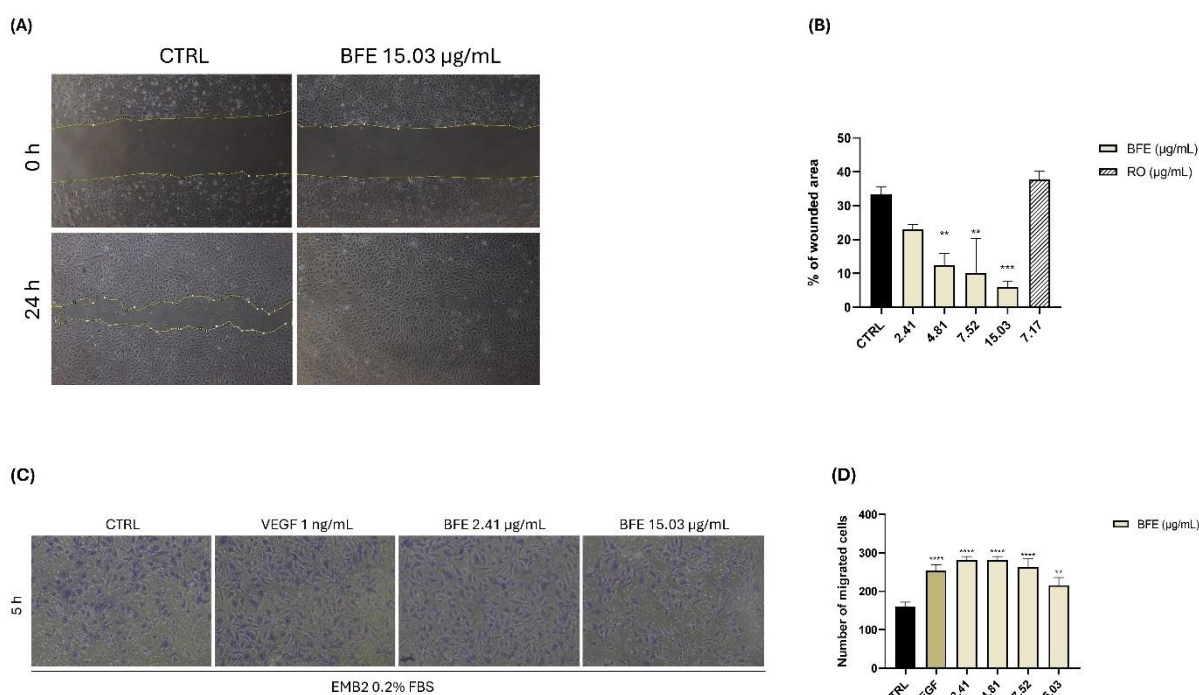


Figura 15. Effetto del trattamento con BosLiq Fluid Extract (BFE) sulla mobilità e sulla migrazione delle CB-ECFC valutato mediante guarigione delle ferite e saggi Transwell. Saggio di guarigione delle ferite: Le CB-ECFC sono state coltivate in EGM2 fino alla confluenza; quindi, graffiate e trattate con o senza (CTRL) diverse concentrazioni di estratti. **(A)** Le immagini sono state catturate a 0 e 24 ore utilizzando un microscopio invertito (X4), mostrando l'entità della chiusura della ferita. **(B)** L'area della ferita è stata quantificata con il software ImageJ ed espressa come densità relativa della ferita; l'aumento della mobilità delle EPC è indicato da una riduzione dell'area graffiata. Saggio di migrazione transwell: le EPC sono state sottoposte a starving per 4 ore in terreno basale con FBS allo 0,2%, v/v quindi staccate e seminate su inserti porosi da 8 µm. La camera inferiore conteneva un terreno di innesto integrato con 1 ng/ml di VEGF o varie concentrazioni dell'estratto. Le cellule nel mezzo starving servivano da controllo. Dopo 5 ore, le cellule migrate sono state fissate, colorate con colorante blu RAL 555 e sottoposte a imaging utilizzando un microscopio invertito (X10). **(C)** Le immagini rappresentative delle cellule migrate sono state scattate utilizzando un microscopio invertito (X4). **(D)** L'analisi quantitativa delle cellule migrate è stata ottenuta mediante conteggio con il software ImageJ. Tutti i risultati sono espressi come media $\pm$ SD di 3 esperimenti indipendenti. La significatività statistica è stata eseguita utilizzando l'ANOVA a una via seguita dal test post hoc di Dunnett: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ rispetto al gruppo di controllo (CTRL).

3.4.7 Effetti del trattamento con BFE sulla produzione di NO delle CB-ECFC

Il trattamento delle CB-ECFC con BFE, nell'intervallo di concentrazioni testato, non ha evidenziato effetti negativi sulla produzione di NO (Figura 16). L'analisi statistica ha rivelato un effetto significativo del BFE sulla produzione di NO solamente alla concentrazione più elevata di BFE ($p < 0,05$). I risultati indicano una correlazione dose-dipendente tra il trattamento con BFE e l'incremento della produzione di NO, rispetto al controllo.

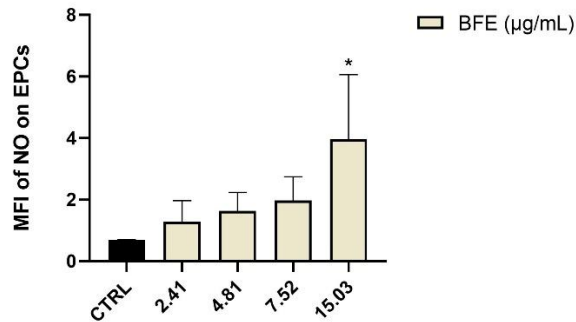


Figura 16. Effetto del trattamento con BosLiq Fluid Extract (BFE) sulla produzione di NO da parte delle CB-ECFC. Le CB-ECFC sono state coltivate fino a circa il 90% di confluenza e poi trattate con estratti 24 ore. Le cellule sono state successivamente incubate con la sonda DAF (1 µM) per 1 ora. La produzione di ossido nitrico (NO) è stata misurata mediante citometria a flusso ed è stata determinata l'intensità fluorescente media (MFI) delle cellule NO-positive. Tutti i risultati sono espressi come media $\pm$ SD di 3 esperimenti condotti in triplice copia. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'ANOVA a una via seguita dal test post hoc di Dunnett: * $p < 0,05$ rispetto al gruppo di controllo (CTRL).

3.4.8 Analisi della capacità tubulogenica delle CB-ECFC in presenza di BFE

Le cellule endoteliali possono formare strutture tubolari quando coltivate in presenza di matrice extracellulare (ECM). Per valutare l'effetto di BFE Sulla formazione dei tubuli delle ECFC, le cellule pretrattate con o senza BFE, sono state seminate sulla matrice extracellulare Geltrex. Sono state acquisite diverse immagini ogni 2 ore per analizzare la lunghezza dei tubuli, il numero di strutture chiuse e il numero dei punti di ramificazione. Le CB-ECFC pretrattate con 15,03 µg/ml di BFE hanno formato strutture tubulari più organizzate rispetto alle cellule controllo, già dopo 24 ore (Figura 17A). In particolare, è stato osservato un aumento statisticamente significativo della lunghezza dei tubi ($p < 0,01$) e del numero di strutture chiuse ($p < 0,001$), mentre non è stata rilevata alcuna differenza significativa nel numero dei punti di ramificazioni. Tali modifiche morfologiche sono risultate stabili fino al termine del periodo di osservazione (48 ore).

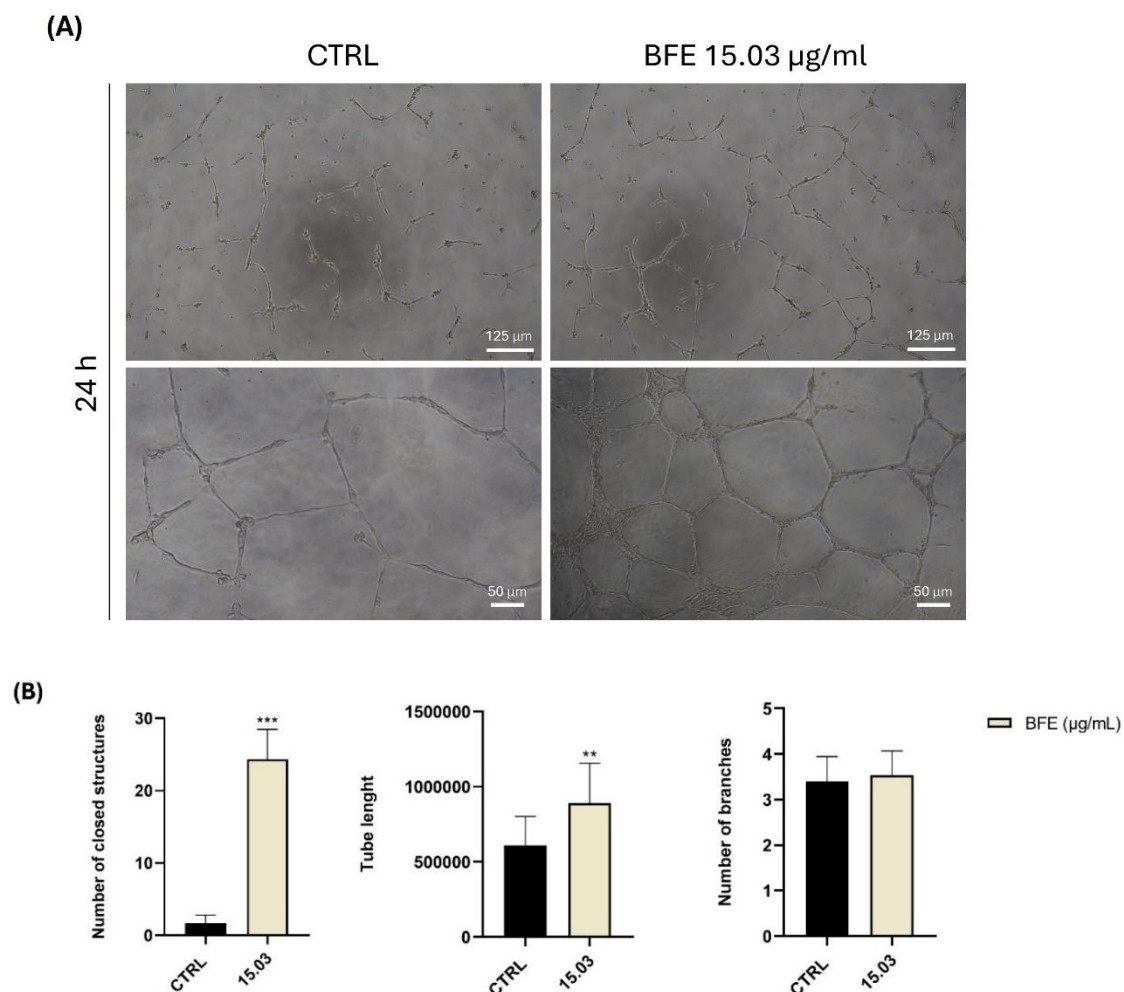


Figura 17. Impatto del trattamento con BosLiq Fluid Extract (BFE) sulla formazione di strutture tubulari nelle CB-ECFC. La formazione del tubo delle CB-ECFC è stata valutata utilizzando EPC seminate su componenti della matrice extracellulare (Geltrex) con o senza BFE. Le EPC coltivate in terreno EGM2 da sole sono servite come controllo (CTR). (A) Le immagini rappresentative della formazione del tubo sono state catturate con un ingrandimento di 10 $\times$ (barra di scala = 50 μm) e 4 $\times$ (barra di scala = 125 μm) (B) L'analisi quantitativa della lunghezza del tubo, del numero di strutture chiuse e del numero di diramazioni è stata eseguita utilizzando il software ImageJ. I risultati sono mostrati come media $\pm$ SD di 2 esperimenti indipendenti. Le differenze tra i due gruppi valutate mediante t-test non appaiato: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.5 DISCUSSIONE

Le EPC derivate dal midollo osseo hanno acquisito un crescente interesse nell'ambito della medicina rigenerativa, grazie al loro ruolo cruciale nella neovascolarizzazione e nella riparazione dell'endotelio danneggiato. Le EPC intervengono sia attraverso la differenziazione in cellule endoteliali mature una volta raggiunto il sito leso, sia mediante il rilascio di fattori paracrini pro-angiogenici *in situ*. Il loro intervento, in sinergia con la risposta delle cellule endoteliali residenti, risulta dunque essenziale per il ripristino dell'integrità endoteliale [161].

Studi clinici hanno evidenziato una correlazione inversa tra i livelli circolanti di EPC e i fattori di rischio cardiovascolare sottolineando l'importanza di queste cellule nel mantenimento della salute vascolare e il loro potenziale come bersagli terapeutici [148]. Oltre al contributo diretto delle EPC, meccanismi antiossidanti e antinfiammatori rappresentano elementi chiave nella protezione dell'endotelio da stress ossidativo e danno infiammatorio. In questo contesto, composti naturali di origine vegetale hanno suscitato notevole interesse. In particolare, le piante della *Boswellia* sono state oggetto di studi per le loro proprietà antinfiammatorie, capaci di supportare la riparazione endoteliale e la funzionalità vascolare. Estratti standardizzati della resina di *Boswellia* hanno mostrato effetti protettivi contro la disfunzione endoteliale in modelli *in vitro* e *in vivo* [83], [84].

Il presente studio ha quindi valutato il potenziale rigenerativo di BosLiq® Fluid Extract (BFE), un estratto fluido a base di resina di *Boswellia sacra*, analizzandone l'impatto su proliferazione, migrazione e capacità angiogenica delle EPC. La resina di *B. sacra* è stata estratta mediante miscela etanolo/acqua e successivamente formulata in estratto fluido mediante solubilizzazione in olio di riso (*Oryza sativa* L.). Il rapporto peso/peso nella formulazione finale (BFE) è di 50,6% di semilavorato di *B. sacra* e 49,4% di olio di riso. L'olio, che funge da eccipiente tecnologico nella forma fluida dell'estratto, presenta un profilo bilanciato di acidi grassi mono- e polinsaturi ed è inoltre ricco di composti antiossidanti naturali, tra cui orizanolo, tocotrienoli e tocoferoli [162].

Per lo studio sono state utilizzate EPC derivate dal sangue cordonale umano (CB-ECFC), selezionate per la loro accessibilità, l'elevato potenziale proliferativo rispetto alle APB-ECFC e per la loro natura "generica", non vincolata a fenotipi endoteliali tessuto-specifici.

La caratterizzazione chimica di BFE ha confermato la presenza delle principali classi di metaboliti secondari tipiche della resina, in particolare acidi triterpenici pentaciclici e diterpeni macrociclici. Le analisi condotte mediante HPLC-MS/PDA hanno evidenziato un profilo triterpenico dominato dalle forme acetilate, con AKBA e A β BA come componenti principali, seguiti dalle corrispondenti forme non acetilate (α -BA e β -BA). Il contenuto complessivo di acidi boswellici (circa 193 g/kg) risulta in linea con i profili tipici riportati per *Boswellia sacra* [159], [163]. Parallelamente, l'analisi della frazione volatile condotta mediante GC-MS e GC-FID ha permesso di individuare diterpeni cembrenici, tra cui iso-incensolo, iso-serratolo, serratolo e incensolo (circa 70 g/kg). L'identificazione di questi isomeri è coerente con quanto descritto per altre specie di *Boswellia* [164].

Sebbene le attività biologiche degli incensoli siano poco caratterizzate, essi potrebbero contribuire in modo sinergico al profilo funzionale dell'estratto. I risultati ottenuti in questo studio e nei successivi sottolineano l'importanza di considerare sia le specie principali che quelle minori nel definire il potenziale farmacologico complessivo della resina di *B. sacra*.

Nella fase iniziale dello studio, il saggio MTS ha evidenziato che il trattamento con BFE, nel range compreso tra 2,41 e 15,03 µg/ml, non altera la proliferazione delle CB-ECFC, né induce un incremento significativo dell'espressione dei marcatori di attivazione endoteliale/infiammatori, quali ICAM-1 e VCAM-1. Nelle cellule pretrattate con BFE, l'espressione di entrambi i marcatori endoteliali è risultata inferiore rispetto a quella indotta dalle due concentrazioni di TNFα utilizzate come controlli positivi. In particolare, 10 ng/ml è una concentrazione riconosciuta per provocare un'infiammazione marcata, mentre 1 ng/ml promuove un ambiente infiammatorio moderato, che determina l'attivazione cellulare e un aumento della funzione immunoregolatoria [160], [165]. Complessivamente, questi risultati suggeriscono che l'estratto non stimola processi di attivazione endoteliale né esercita effetti pro-infiammatori, nelle condizioni sperimentali adottate.

Dopo aver convalidato l'assenza di attivazione del fenotipo endoteliale pro-infiammatorio, abbiamo studiato l'impatto del trattamento con BFE sulle funzioni biologiche delle EPC come la mobilità, la migrazione e le capacità tubulogenica, nonché parametri fondamentali per la determinazione del potenziale pro-angiogenico.

Nel saggio *Wound Healing*, il trattamento con BFE ha determinato un'accelerazione significativa della chiusura della ferita rispetto alle cellule controllo, suggerendo un aumento della capacità migratoria delle CB-ECFC, in un modello bidimensionale. L'acido α-boswellico identificato nell'estratto può contribuire all'effetto osservato, la sua azione è stata infatti confermata in modelli *in vivo* di guarigione delle ferite, nei quali accelera la riparazione tissutale modulando la via di segnalazione NF-κB [166]. Il confronto con l'eccipiente olio ha mostrato un contributo trascurabile sulla migrazione cellulare. Questi risultati sono coerenti con precedenti studi nei quali oli naturali, come olio di sesamo e di cocco, hanno mostrato un modesto effetto stimolante sulla migrazione delle cellule endoteliali microvascolari umane (HUVEC) [167]. Tuttavia, è importante sottolineare che tale risultato non permette di concludere che l'effetto di BFE sia esclusivamente attribuibile ai composti bioattivi della resina. D'altronde, essendo BFE una miscela complessa, la propria attività può derivare da effetti additivi o sinergici tra i diversi composti bioattivi, come spesso osservato sperimentalmente nei fitocomplessi.

L'impatto positivo di BFE sulla migrazione cellulare è stato corroborato dai risultati del saggio di migrazione in Transwell, eseguito in condizioni sperimentali più stringenti rispetto al Wound Healing. Mentre in quest'ultimo le cellule erano mantenute in medium completo contenente tutti i principali fattori di crescita endoteliali (incluso il VEGF), le condizioni sperimentali relative alla migrazione nel sistema tridimensionale hanno previsto il condizionamento delle CB-ECFC in un mezzo privo di fattori di crescita e con bassa percentuale di siero. In queste condizioni, dopo 5 ore di trattamento con BFE è stato osservato un incremento della migrazione quasi doppio rispetto al controllo. Tale risultato non solo indica la capacità dell'estratto di ripristinare la capacità migratoria basale, ma mette in evidenza un effetto di particolare rilievo poiché l'entità della risposta indotta dall'estratto risulta comparabile o superiore a quella ottenuta con il fattore chemiotattico VEGF. La letteratura fornisce diversi studi sui triterpeni della *Boswellia* che possono spiegare i meccanismi alla base dell'effetto osservato. Tra i composti identificati in BFE, l'AKBA è noto per attivare pathway antiossidanti Nrf2-dipendenti, capaci di potenziare le difese redox endogene e di sostenere la sopravvivenza cellulare in condizioni stressanti. Un ulteriore meccanismo attribuito all'AKBA è l'attivazione della via delle MAP chinasi, cruciale nella regolazione dei processi di sopravvivenza e migrazione cellulare [168].

Un parametro chiave della funzionalità endoteliale è la produzione di NO, mediatore essenziale nelle EPC che regola proliferazione, migrazione, sopravvivenza cellulare e maturazione delle strutture capillari. La disfunzione endoteliale, associata a una ridotta biodisponibilità di NO, compromette questi processi e limita la capacità rigenerativa del tessuto vascolare [141], [169]. Sulla base di queste evidenze, abbiamo ipotizzato che l'incremento dose-dipendente dei livelli intracellulari di NO indotto da BFE nelle nostre condizioni sperimentali, possa derivare dall'attivazione di pathway eNOS-dipendenti potenzialmente promossi dall'acido β -boswellico [85] e che tale modulazione sia funzionalmente associata a un potenziamento della capacità vasculogenica delle CB-ECFC. Per verificare questa relazione, è stato eseguito un saggio di tubulogenesi su matrice extracellulare (Geltrex). L'analisi morfometrica ha evidenziato che il pretrattamento con BFE favorisce l'organizzazione delle cellule in strutture tubulari più organizzate rispetto al controllo, con un incremento significativo sia della lunghezza dei tubi sia del numero di network chiusi. Il numero di network chiusi è un parametro rilevante poiché riflette una fase più avanzata dell'organizzazione angiogenica. La formazione di strutture chiuse poligonali richiede infatti migrazione, allineamento e stabilizzazione delle giunzioni tra cellule endoteliali. La presenza di queste strutture poligonali indica quindi una maggiore stabilità del

network capillare rispetto alla semplice formazione di tubuli lineari. Questo effetto morfogenetico è coerente con il ruolo di NO nella promozione della tubulogenesi e con i meccanismi molecolari attivati dai composti triterpenici della resina. In particolare, β -BA e A β BA sono stati riportati come modulatori dell'attività eNOS, aumentando la fosforilazione dell'enzima e la produzione di NO in cellule endoteliali [85].

Collettivamente, sembra quindi delinearsi un meccanismo integrato promosso dal trattamento con BFE, in cui l'incremento della biodisponibilità di NO determinerebbe il miglioramento delle funzioni rigenerative dei progenitori endoteliali.

3.6 CONCLUSIONI

Il presente studio fa luce sul ruolo del BosLiq® Fluid Extract (BFE) come nuovo candidato per modulare le funzioni delle cellule endoteliali vascolari. I risultati hanno dimostrato che il BFE promuove le capacità rigenerative delle CB-ECFC migliorandone la motilità, la capacità migratoria e il potenziale angiogenico, senza indurre attivazione endoteliale infiammatoria. Questi effetti potrebbero essere mediati da meccanismi molecolari che includono l'aumento della produzione di NO da parte di eNOS.

In prospettiva, studi futuri saranno indispensabili per confermare e approfondire i risultati ottenuti, al fine di delineare con maggiore chiarezza il potenziale del BFE come ingrediente nutraceutico innovativo per la promozione della salute vascolare.

I dati presentati nel Capitolo 3 sono attualmente in fase di preparazione per la pubblicazione dell'articolo scientifico, con il titolo:

- “*Unleashing the bioactivity of Boswellia sacra gum-resin extract: The effect of BosLiq® on the regenerative functions of Endothelial Progenitor Cell*”
La Rosa L., Occhipinti A., Asteggiano, A., Arouche, N., Naserian, S., Uzan, G., Oberlin, E., Gentile, C.

Questi risultati sono stati inoltre presentati dalla sottoscritta tramite una comunicazione orale al 96° Congresso SIBS, tenutosi a Trieste dal 12 al 15 aprile 2023, con il titolo:

- “Effects of fluid extract of *Boswellia Sacra* gummi-resin (BosLiq®) on EPCs’ functions”
La Rosa, L., Oberlin, E., Serio, G., Occhipinti, A., Uzan, G., Arouche, Naserian, S., Gentile, C.
-

CAPITOLO 4

**Potenziale neuroprotettivo dell'estratto di *Boswellia sacra*
in un modello di astrociti primari murini sottoposti a stress
ossidativo, osmotico e nutrizionale: studio dei pathways
molecolari coinvolti**

4.1 CONTESTO FISIOPATOLOGICO

4.1.1 Le malattie neurodegenerative: meccanismi patogenetici e rilevanza clinica

Le malattie neurodegenerative costituiscono un insieme eterogeneo di patologie complesse, caratterizzate dalla perdita neuronale e dalla degenerazione di diverse aree del sistema nervoso centrale (SNC). Tali processi conducono a un deterioramento graduale, ma inesorabile, delle funzioni cognitive, motorie e comportamentali, con ripercussioni profonde sulla qualità di vita dei pazienti [170].

Tra le forme clinicamente più rilevanti si annoverano la malattia di Alzheimer, la malattia di Parkinson, la sclerosi multipla, la malattia di Huntington e la sclerosi laterale amiotrofica, che insieme rappresentano alcune delle principali sfide sanitarie per la ricerca biomedica, in quanto prive di terapie risolutive. Nonostante i progressi nella ricerca di base e clinica, infatti, le terapie attualmente disponibili risultano prevalentemente limitate al controllo dei sintomi, senza intervenire in maniera risolutiva sui meccanismi patogenetici responsabili della patologia.

L'eziopatogenesi delle patologie neurodegenerative è di natura multifattoriale e riflette un'interazione complessa tra predisposizione genetica, invecchiamento e fattori ambientali o legati allo stile di vita [171]–[173]. Numerose evidenze indicano la convergenza verso meccanismi molecolari comuni tra queste patologie, tra cui disfunzione mitocondriale, perdita sinaptica, apoptosi, neuroinfiammazione e stress ossidativo/nitrosativo [174]. In particolare, l'accumulo di ROS e RNS, insieme alla persistenza di processi infiammatori, viene oggi riconosciuto come un elemento cardine nell'amplificazione del danno neuronale e nella progressione della neurodegenerazione.

La centralità dei neuroni nei modelli di compromissione cerebrale ha dominato per decenni la ricerca neuroscientifica. Oggi, però, emerge con chiarezza l'insufficienza di una visione unicamente focalizzata sull'elemento neuronale. Recenti progressi scientifici stanno ridefinendo questo paradigma, ponendo l'accento su una rete più complessa di cellule e segnali coinvolti nel processo neurodegenerativo. Un crescente corpo di evidenze sottolinea l'importanza che le cellule gliali – e gli astrociti in modo specifico – rivestono nel mantenimento dell'omeostasi del microambiente neuronale. D'altra parte, queste cellule non si limitano a fornire supporto strutturale, ma partecipano attivamente alla regolazione della risposta redox e infiammatoria [175], [176].

4.1.2 Il ruolo degli astrociti nella fisiopatologia del SNC

Gli astrociti costituiscono la popolazione gliale più abbondante del SNC, numericamente superiore anche a quella neuronale, rappresentando circa il 20-40% delle cellule cerebrali nei mammiferi [177]. Con la loro peculiare morfologia stellata, stabiliscono un'interfaccia funzionale con neuroni, vasi sanguigni e sinapsi, contribuendo a una vasta gamma di funzioni fondamentali: regolazione dell'omeostasi ionica e dei neurotrasmettitori, formazione e modulazione sinaptica, secrezione di molecole trofiche, mantenimento dell'integrità della barriera ematoencefalica e produzione di proteine antiossidanti e antinfiammatorie [178].

Nel SNC, la microglia rappresenta il principale sensore immunitario, in grado di rilevare rapidamente alterazioni dell'omeostasi cerebrale e di avviare una risposta difensiva. Oltre alla microglia, anche gli astrociti svolgono un ruolo attivo nell'orchestrare i meccanismi di risposta a traumi o condizioni patologiche, attraverso un processo dinamico e complesso denominato astrogliosi, caratterizzato da una profonda riorganizzazione strutturale e funzionale. Durante questa risposta, gli astrociti acquisiscono un fenotipo reattivo, contraddistinto da ipertrofia cellulare, proliferazione e da un incremento nella secrezione di fattori trofici, molecole antiossidanti e citochine pro- e antinfiammatorie [179], [180]. Inoltre, un elemento distintivo a molte forme di astrogliosi è la sovraregolazione della proteina acida fibrillare gliale (GFAP) – un marcatore canonico dell'attivazione astrocitaria – la cui espressione aumentata è estesamente documentata in numerose patologie del SNC [181]. L'entità e la durata del processo di astrogliosi dipendono dalla natura e dalla severità dell'insulto, e possono variare da risposte transitorie e reversibili a gravi forme di astrogliosi. Infatti, sebbene la risposta astrocitaria rivesta inizialmente una funzione neuroprotettiva, attraverso la promozione di effetti anti-eccitotossici, rilascio di neurotrofine, e regolazione degli ioni extracellulari e dei livelli di neurotrasmettitori, una risposta prolungata o disfunzionale può amplificare il danno neuronale e contribuire all'instaurarsi di processi degenerativi. Di conseguenza, il mantenimento delle funzioni omeostatiche e trofiche degli astrociti rappresenta un obiettivo strategico per la prevenzione e il contenimento della degenerazione neuronale.

La maggior parte degli studi adotta una visione *neuro-centrica*, focalizzando l'attenzione sui neuroni come unici protagonisti dei processi fisiopatologici del SNC. Eppure, un singolo agente terapeutico mirato esclusivamente contro un singolo presunto meccanismo d'azione che prende di mira i neuroni, potrebbe risultare insufficiente a migliorare l'esito neurologico. Le strategie neuroprotettive dovrebbero quindi estendere il loro ambito di intervento oltre la sopravvivenza neuronale [182]. Per perseguire questi obiettivi, si rende necessario adottare approcci integrati che coinvolgano più tipi cellulari.

In questa prospettiva, evidenze ottenute da studi *in vitro*, su sistemi di co-cultura neuroni-astrociti, hanno mostrato come gli astrociti siano in grado di esercitare un ruolo protettivo nei confronti della morte neuronale indotta da stress ossidativo [183], [184]. Tali risultati suggeriscono che preservare la vitalità astrocitaria possa costituire un contributo determinante nei meccanismi di neuroprotezione. Gli astrociti, essendo il sottotipo gliale più abbondante e stabilendo contatti diretti con tutte le cellule parenchimali, rappresentano i bersagli privilegiati per queste strategie terapeutiche. Nello specifico, interventi volti a modulare la loro attività antiossidante e antinfiammatoria potrebbero contribuire a preservarne l'integrità funzionale e a ridurre la vulnerabilità del microambiente neuronale [185].

4.2 STATO DELL'ARTE E RAZIONALE DELLA RICERCA

Negli ultimi anni, l'impiego di composti fitochimici in ambito neurofarmacologico ha suscitato crescente interesse per il loro potenziale neuroprotettivo. In particolare, le resine di *Boswellia* spp. si sono distinte per le loro proprietà antinfiammatorie, antiossidanti e neuroprotettive, supportate da un numero sempre maggiore di evidenze sperimentali. Tuttavia, nonostante alcuni studi condotti su modelli neuronali, il potenziale effetto modulante degli estratti di *Boswellia sacra* sulle funzioni delle cellule gliali, nello specifico sugli astrociti, risulta limitatamente approfondito.

Il presente studio si propone quindi di contribuire al superamento della visione *neuro-centrica*, ampliando al contempo la comprensione del potenziale neuroprotettivo di *Boswellia sacra*. In particolare, l'obiettivo è valutare, in un modello di astrociti murini sottoposti a diverse condizioni di stress cellulare, la capacità dell'estratto di *Boswellia sacra* di preservare la vitalità cellulare e, parallelamente, mira ad indagare i principali meccanismi molecolari coinvolti nella sua azione protettiva.

4.3 MATERIALI E METODI

4.3.1 Preparazione dell'estratto etanolic di *Boswellia sacra*

L'estratto di *Boswellia sacra*, di seguito denominato BSE (Boswellia Sacra Extract), è stato preparato a partire da un semilavorato ricavato dalla resina, fornito da Abel Nutraceuticals. Il semilavorato essiccato è stato quindi solubilizzato in etanolo assoluto e conservato a -20 °C fino alle analisi biologiche.

4.3.2 Caratterizzazione chimica del semilavorato di *Boswellia sacra*

Per la caratterizzazione chimica del semilavorato di *B. sacra*, sono stati impiegati due sistemi di cromatografia accoppiati a detector di massa (GC e HPLC-MS), di fiamma (GC-FID) e spettrofotometrici (HPLC-PDA). Le analisi sono state condotte presso i laboratori di Abel Nutraceuticals, dal Dott. Asteggiano.

Per l'identificazione e la quantificazione degli acidi boswellici, è stato impiegato un approccio combinato HPLC-MS/PDA, basato su un metodo precedentemente pubblicato e validato dal Dott. Asteggiano [159]. Le analisi qualitative sono state condotte tramite spettrometria di massa (MS) e le analisi quantitative tramite rivelatore a diodi (PDA).

Per l'analisi dei composti neutri e a basso punto di ebollizione è stato impiegato un approccio combinato GC-MS/FID. La GC-MS è stata utilizzata per l'identificazione preliminare dei principali composti mediante confronto con la libreria NIST 20 e con gli indici di ritenzione lineare (LRI), mentre il GC-FID, grazie alla sua elevata linearità di risposta, è stato impiegato per la quantificazione, utilizzando miscele standard di terpeni.

4.3.3 Coltura cellulare

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando astrociti normali murini precedentemente purificati e congelati, derivati da protocolli approvati dal Comitato per il Benessere Animale dell'Università di Palermo [186]. Le cellule sono state coltivate in Dulbecco Modified Eagle Medium/Ham's F12 (DMEM/F12) (2:1) (Sigma-Aldrich, USA) integrato con l'1% di antibiotici (penicillina/streptomycin) (VWR International, Radnor, PA, USA) e 10% v/v di siero fetale bovino inattivato al calore (*Fetal Bovine Serum*, FBS; VWR International, Radnor, PA, USA). Le colture sono state mantenute a 37 °C in atmosfera umidificata contenente 5% di CO₂.

4.3.4 Modelli *in vitro* di stress cellulare

Per ricreare *in vitro* diversi contesti di neurotossicità, gli astrociti murini sono stati sottoposti a quattro differenti condizioni sperimentali. Tre di queste prevedevano l'esposizione a specifici agenti chimici, quali etanolo (EtOH), perossido di idrogeno (H₂O₂) e saccarosio (C₁₂H₂₂O₁₁), mentre la quarta ha comportato la coltura cellulare in mezzo privo di siero (serum starvation). Ogni condizione è stata selezionata per la capacità di attivare risposte cellulari rappresentative di differenti meccanismi di stress.

L'etanolo induce stress ossidativo attraverso la disfunzione mitocondriale e l'esaurimento delle riserve intracellulari di glutathione, con conseguente accumulo di ROS e RNS e attivazione di vie pro-infiammatorie e apoptotiche [187]–[190]. Il perossido di idrogeno, invece, agisce come ossidante diretto: grazie alla sua capacità di attraversare rapidamente le membrane cellulari, può generare radicali altamente reattivi (idrossilici e perossilici), causando danni a DNA, proteine e mitocondri [191].

Il trattamento con soluzioni ipertoniche di saccarosio è utilizzato per indurre condizioni di stress osmotico. Trattandosi di uno zucchero non permeabile, il suo accumulo nel mezzo extracellulare aumenta l'osmolarità del mezzo, inducendo un movimento d'acqua verso l'esterno della cellula e una conseguente riduzione del volume cellulare. Sebbene non alteri direttamente il bilancio redox, lo stress iperosmotico rappresenta una significativa condizione di perturbazione metabolica e funzionale [192].

In ultimo, la privazione del siero nel mezzo di coltura cellulare è una strategia sperimentale impiegata per simulare uno scenario di stress nutrizionale, contraddistinto dalla carenza di nutrienti e fattori di crescita essenziali per la sopravvivenza cellulare. In queste condizioni, le cellule attivano programmi autofagici. Se la condizione di stress persiste, la risposta cellulare può progressivamente evolvere nell'attivazione di vie apoptotiche [193], [194].

4.3.5 Design sperimentale dei modelli di stress cellulare e protocolli di trattamento

Le colture di astrociti murini, coltivate fino alla subconfluenza in fiasche da 25 cm², sono state staccate mediante tripsinizzazione, seminate in piastre multiwell e mantenute overnight per consentire l'adesione. Al raggiungimento della confluenza ($\approx 80\text{--}90\%$), le cellule sono state pretrattate per 24 ore con BSE. Successivamente, gli astrociti sono stati coincubati insieme alle sopramenzionate condizioni sperimentali di stress, applicate singolarmente o in combinazione. Le condizioni sperimentali adottate sono schematizzate in Tabella 10 e comprendono:

- Stress ossidativo: medium di coltura completo contenente EtOH (2% v/v) o H₂O₂ (400 μM).
- Stress osmotico: medium di coltura completo contenente C₁₂H₂₂O₁₁ (100–500 mM).
- Stress nutrizionale (*serum starvation*): medium di coltura privo di siero.
- Stress multifattoriale: combinazione di stress nutrizionale e stress ossidativo oppure stress nutrizionale e stress osmotico.

La concentrazione finale del 2% (v/v) di EtOH nel medium di coltura, è stata scelta in relazione a studi precedenti, che evidenziano come tale concentrazione induca deplezione di glutathione, aumento di ROS e RNS e attivazione di vie pro-ossidanti e pro-infiammatorie in modelli neuronali e gliali [190]. Analogamente, la concentrazione di 400 μ M H₂O₂ è stata definita sulla base di nostri studi precedenti, nei quali l'esposizione a H₂O₂ nel range 100-400 μ M mostrava un effetto citotossico dose-dipendente (dati non mostrati).

La combinazione di più stress è stata adottata per riprodurre scenari di neurotossicità più complessi e realistici, simili a quelli osservati negli eventi ischemici o altri disturbi neurodegenerativi, dove molteplici fattori di stress intervengono simultaneamente.

In ciascuna condizione sperimentale, le cellule sono state mantenute in medium completo o privo di siero, con o senza gli agenti chimici indicati, per periodi di 4 o 24 ore, in atmosfera umidificata a 37 °C con il 5% di CO₂. Al termine dei trattamenti, le cellule sono state raccolte e preparate per i successivi saggi biologici e molecolari volti a valutare la vitalità cellulare, la frammentazione del DNA (considerata endpoint molecolare dell'apoptosi) e l'analisi dell'espressione proteica tramite Western blot.

Tabella 10. Condizioni sperimentali di stress cellulare negli astrociti murini. La tabella riporta la tipologia di stress, la condizione sperimentale impiegata e la concentrazione o composizione dei trattamenti applicati, inclusa la privazione di siero per lo stress nutrizionale e l'esposizione agli agenti chimici per lo stress ossidativo e osmotico.

Tipologia di stress	Condizione sperimentale	Concentrazione/Composizione
STRESS OSSIDATIVO	EtOH	2% v/v
	H ₂ O ₂	400 μ M
STRESS OSMOTICO	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	100–500 mM
STRESS NUTRIZIONALE	Medium di coltura privo di siero (serum starvation)	Medium 0% v/v FBS
STRESS MULTIFATTORIALE	Serum starvation + EtOH,	0% v/v FBS + 2% v/v
	Serum starvation + H ₂ O ₂	0% v/v FBS + 400 μ M
	Serum starvation + C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	0% v/v FBS + 100–500 mM

Abbreviazioni: FBS: siero fetale bovino.

4.3.6 Saggio di vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata determinata utilizzando il metodo di riduzione del 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio bromuro (MTT). In breve, per studiare l'influenza di BSE sulla proliferazione cellulare in condizioni standard, gli astrociti sono stati seminati a una concentrazione di $4,8 \times 10^3$ cellule/pozzetto in piastre a 96 pozzetti. Dopo 24 ore, le cellule in fase di crescita esponenziale sono state trattate per 48 o 72 ore con diverse concentrazioni di BSE (range compreso tra 531,05 e 1,04 μg BSE/ml medium cellulare). Potenziali effetti citotossici, sono invece stati valutati su cellule a confluenza incubate per 72 ore con BSE. Le soluzioni a diversa concentrazione di BSE sono state preparate diluendo la soluzione stock in etanolo in appropriato volume di medium di coltura. La concentrazione di etanolo nei trattamenti era pari allo 0,25% v/v e medium contenente lo 0,25% di etanolo è stato utilizzato per le diluizioni e i trattamenti controllo.

Al termine dei trattamenti, l'MTT è stato aggiunto al medium ad una concentrazione finale di 0,5 mg/ml e incubato per 3 ore a 37°C. Alla fine dell'incubazione, i cristalli insolubili di formazano sono stati solubilizzati in DMSO e l'assorbanza è stata misurata a 570 nm mediante il lettore di micropiastre. L'intensità del valore OD è stata utilizzata come indice della vitalità cellulare. I risultati sono stati espressi come percentuale di vitalità relativa, normalizzando i valori delle cellule trattate rispetto al controllo non trattato, la cui vitalità è stata considerata pari al 100%. Tutte le prove sono state eseguite in tre repliche biologiche indipendenti.

4.3.7 Saggio di immunofluorescenza

Per analizzare la morfologia cellulare e la distribuzione di specifici marker negli astrociti murini, è stata adottata la tecnica di immunofluorescenza. Brevemente, gli astrociti murini sono stati seminati a una densità di 6×10^3 cellule/pozzetto in vetrini collocati all'interno di una multiwell da 24 pozzetti. Dopo un periodo di adesione overnight e al raggiungimento della confluenza, le cellule sono state trattate con concentrazioni selezionate di BSE per 24 ore. Successivamente, le cellule sono state fissate con EtOH al 96% (v/v) preraffreddato a -20°C per 10 minuti e lavate tre volte con PBS. La permeabilizzazione è stata effettuata mediante trattamento con Triton X-100 allo 0,25% in PBS per 15 minuti, seguita dal blocco dei siti di legame non specifici con una soluzione di BSA al 3% in PBS per 1 ora a temperatura ambiente. Le cellule sono state quindi incubate per 1 ora a temperatura ambiente in camera umida con l'anticorpo primario anti-GFAP (1:100, SIGMA, Milano, Italia) diluito in BSA al 3% in PBS.

Dopo tre lavaggi in PBS, è stata eseguita l'incubazione con l'anticorpo secondario Rabbit TRITC (1:200, SIGMA) in BSA al 3% in PBS, per 2 ore a temperatura ambiente in camera umida.

Dopo tre lavaggi in PBS, i vetrini sono stati montati con 5 µl di soluzione contenente DAPI per la colorazione dei nuclei. La soluzione montante era composta da 1,4-diazobicciclo [2,2,2] ottano (DABCO, Sigma) al 2%, 20 mM Tris pH 8 e glicerolo (1:9, vol/vol) in acqua.

I vetrini così preparati sono stati osservati al microscopio a fluorescenza (Olympus BX50, Giappone), con un obiettivo 20×. Gli esperimenti sono stati replicati due volte.

4.3.8 Analisi Western blot

L'analisi Western blot è stata eseguita secondo procedure precedentemente descritte da Chiarelli *et al.* [195]. In breve, i campioni di proteine totali sono stati estratti dalle cellule astrocitarie primarie (coltivate fino alla subconfluenza in fiasche da 75 cm²) e trattate in un tampone di lisi (7 M Urea, 2% CHAPS e 10 mM DTT) contenente un cocktail di inibitori della proteasi (Sigma P8340). I campioni di proteine (25 µg) sono stati separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide-dodecil solfato di sodio al 10% (SDS-PAGE) e quindi trasferiti su membrane di nitrocellulosa. Le membrane sono state incubate con anticorpi primari a 4 °C durante la notte. Gli anticorpi utilizzati erano anti-iNOS (Invitrogen, 14592082), anti-COX-2 (Invitrogen, 358500), anti-IκB-α (LS Bio 148310), anti-fosfo-IκB-α (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC., SC1017113), anti-NrF2 (Invitrogen PA5-27882), anti-cleaved caspase 7 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, cod. 9491), anti-p62 (P0068, Sigma) e anti-LC3 (L8918, Sigma). Successivamente, le membrane sono state lavate accuratamente e incubate con anticorpi secondari anti-topo o anti-coniglio coniugati con perossidasi (W4021 e W4011, Promega Corporation, Madison, WI, USA), a temperatura ambiente per 1 ora.

L'espressione proteica è stata visualizzata utilizzando un imager molecolare Versadoc MP Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e il kit chemiluminescente Immun StarTM WesternCTM (Bio-Rad). L'analisi quantitativa delle bande è stata effettuata con il software Quantity One v.4.6.6 (Bio-Rad) e riferita all'intensità delle bande di actina, utilizzata come controllo di caricamento.

4.3.9 TUNEL test

Il metodo TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) (Promega, Madison, WI, USA, cod. G3250) è stato utilizzato per i nuclei apoptotici sulla linea astrocitaria, come precedentemente descritto [196]. Il DNA frammentato nei nuclei apoptotici è stato osservato al microscopio a fluorescenza (Olympus BX50, Giappone) con un obiettivo 20×.

4.3.10 Analisi statistica

Tutti i dati sono stati riportati come media $\pm$ deviazione standard (SD). Le differenze tra le condizioni sperimentali sono state valutate mediante ANOVA a una via seguita dal test post-hoc di Bonferroni. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software GraphPad Prism.

I dati sperimentali presentati in questo capitolo sono stati ottenuti nel corso del secondo anno del dottorato. Salvo diversa indicazione, tutte le attività sperimentali descritte nella sezione "Materiali e Metodi" sono state svolte presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF) dell'Università degli Studi di Palermo.

4.4 RISULTATI

4.4.1 Caratterizzazione chimica del semilavorato di *Boswellia sacra*

I risultati della caratterizzazione del semilavorato, ottenuti dal lavoro condotto dal dott. Asteggiano, sono riportati in Tabella 11. L'analisi chimica del semilavorato di *B. sacra* ha rivelato una predominanza di acidi boswellici (23,1% p/p). Tra gli acidi boswellici triterpenici, l'AKBA è risultato il componente più abbondante (9,14% p/p), seguito da β -BA (4,1%) e α -BA (3,78%), mentre KBA (1,4%), A α BA (1,29%) e A β BA (3,36%) erano presenti in quantità minori. Per quanto riguarda la frazione diterpenica cembrenica, l'iso-serratolo si è rivelato il principale costituente (13,8%), superando il serratolo (1,76%) e l'incensolo (1,6%). Complessivamente, il profilo compositivo è coerente con quanto riportato in letteratura per *Boswellia sacra*.

Tabella 11. Caratterizzazione quali-quantitativa dei composti bioattivi del semilavorato di *Boswellia sacra*.

Composto	Contenuto % (p/p) nel SL di <i>B. sacra</i>
HPLC-MS/PDA	
KBA	1,4
AKBA	9,14
α -BA	3,78
β -BA	4,1
A α BA	1,29
A β BA	3,36
GC-MS/FID	
Serratolo	1,76
Incensolo	1,6
Iso-serratolo	13,8

Abbreviazioni: SL: semilavorato *Boswellia sacra*; AKBA: acido 3-O-acetil-11-cheto- β -boswellico; KBA: acido 11-cheto- β -boswellico; α -BA e β -BA: acido α e β -boswellico; A α BA e A β BA: acido 3-O-acetil- α e β -boswellico.

4.4.2 Effetti di BSE sulla proliferazione e sulla vitalità cellulare degli astrociti in condizioni standard

Gli effetti di BSE sulla proliferazione e sulla vitalità degli astrociti sono stati valutati attraverso saggi MTT, come illustrato in Figura 18. L'intervallo di concentrazione di BSE testato era compreso fra 531 e 1,04 μ g BSE/ml medium cellulare. Per analizzare l'influenza di BSE sulla

proliferazione cellulare, le cellule sono state incubate per 48 e 72 ore, a partire da 24 ore dopo la semina, in presenza dell'estratto (Figura 18A–B). La densità cellulare alla semina è stata definita sulla base di preliminari curve di crescita, al fine di eseguire i trattamenti durante la fase di crescita esponenziale. Gli effetti citotossici sono invece stati valutati su cellule confluenti incubate per 72 ore con le diverse concentrazioni di BSE (Figura 18C). Come mostrano i risultati, BSE esercita un effetto antiproliferativo evidente a partire da 133 $\mu\text{g/ml}$, in ciascuna condizione sperimentale considerata. Inoltre, un impatto lieve sulla proliferazione è stato osservato alle concentrazioni intermedie (66,38 e 33,19 $\mu\text{g/ml}$), che tuttavia non producono importanti effetti antiproliferativi fino a 72 ore di trattamento (Figura 18B). Gli effetti citotossici diventano marcati dopo esposizione prolungata (72 ore) a concentrazioni di BSE pari e superiori a 133 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 18C). Sulla base di questi dati, per le prove successive, sono state selezionate concentrazioni comprese tra 66,38 e 16,6 $\mu\text{g/ml}$.

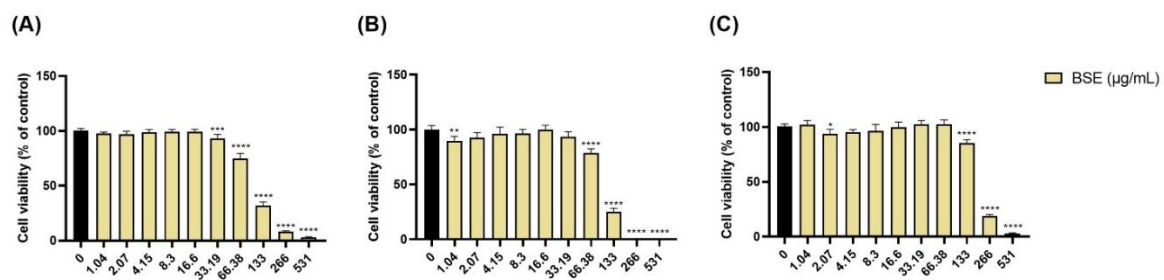


Figura 18. Effetti del trattamento con l'estratto di *Boswellia sacra* (BSE) sulla proliferazione e la vitalità degli astrociti in condizioni standard. (A) Trattamenti con BSE per 48 ore su cellule proliferanti. (B) Trattamenti con BSE per 72 ore su cellule proliferanti (C) Trattamenti per 72 ore su cellule a confluenza. Ogni barra rappresenta la media di 3 esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato ($n = 3$). Tutti i valori per gruppo sono espressi come media ($\pm$ SD) ($n = 3$ esperimenti). Differenze tra gruppi sono state valutate mediante ANOVA a una via, seguita da post-hoc Bonferroni. I livelli di significatività sono indicati come: **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, rispetto al gruppo di controllo.

4.4.3 Effetti di BSE sulla morfologia e sull'organizzazione del citoscheletro degli astrociti in condizioni standard

Gli astrociti possono rispondere a stimoli stressogeni con modificazioni fenotipiche, tra cui la sovraregolazione della proteina fibrillare acida della glia (GFAP), il principale marcatore dell'attivazione astrocitaria. L'analisi morfometrica non ha evidenziato alterazioni evidenti: rispetto al gruppo controllo, il segnale GFAP si è mantenuto stabile in termini di intensità e distribuzione, indicando che l'organizzazione citoscheletrica è stata preservata a seguito del trattamento con BSE. Inoltre, non sono stati osservati cambiamenti nella morfologia del corpo

centrale, né nella lunghezza e nella ramificazione dei processi citoplasmatici. In Figura 19, è riportata la micrografia relativa al trattamento con la dose più bassa di BSE (16,6 $\mu\text{g/ml}$); le concentrazioni maggiori (33,19 e 66,38 $\mu\text{g/ml}$) hanno determinato un quadro qualitativo sovrapponibile (dati non mostrati).

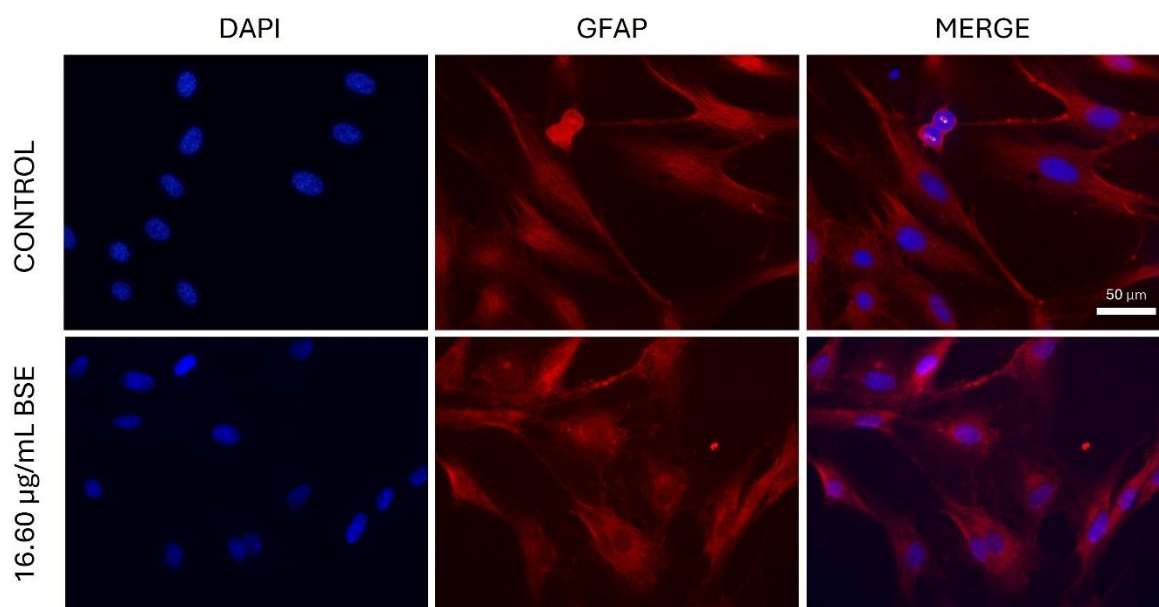


Figura 19. Immunocolorazione di astrociti murini dopo trattamento con l'estratto di *Boswellia sacra* per 24 ore. Le micrografie mostrano il citoscheletro degli astrociti marcato per la proteina acida fibrillare gliale (GFAP; rosso) e i nuclei evidenziati con DAPI (blu). Il MERGE è il risultato della sovrapposizione dei due segnali di fluorescenza. Le acquisizioni sono state effettuate allo stesso ingrandimento (40 $\times$). Barra di scala = 50 μm .

4.4.4 Proprietà antiossidanti di BSE

Per la valutazione dell'attività antiossidante di BSE sono stati impiegati tre saggi colorimetrici in soluzione. In particolare, l'attività scavenger nei confronti dei radicali liberi è stata quantificata mediante i saggi ABTS e DPPH, mentre la capacità metallo-riducente è stata determinata tramite il saggio FRAP, seguendo le procedure già descritte nel Capitolo 2.

I risultati ottenuti evidenziano una moderata capacità antiossidante dell'estratto di BSE. I valori medi stimati con i tre saggi sono pari a $2,146 \pm 0,52$ e $1,227 \pm 0,41$ $\mu\text{mol TE/g SL}$, rispettivamente nei saggi ABTS e DPPH, mentre il valore FRAP risulta pari a $7,46 \pm 0,49$ $\mu\text{mol TE/g SL}$ (Tabella 12).

Tabella 12. Attività radical-scavenging e metallo-riducente dell'estratto di *Boswellia sacra*. I valori sono espressi come media $\pm$ DS di tre esperimenti.

ABTS	DPPH	FRAP
2,146 $\pm$ 0,52 μ mol TE/ g SL	1,227 $\pm$ 0,41 μ mol TE/ g SL	7,46 $\pm$ 0,49 μ mol TE/ g SL

Abbreviazioni: DPPH:2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABST: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid; FRAP:Ferric Reducing Antioxidant Power; SL: semilavorato essiccato di *Boswellia sacra*; TE: equivalenti Trolox.

4.4.5 Effetti di BSE sulla vitalità cellulare degli astrociti in condizioni di stress singolo e stress multifattoriale

Gli effetti del pretrattamento con BSE in condizioni di singolo stress (ossidativo, osmotico e nutrizionale) sono riportati in Figura 20. L'incubazione con il 2% v/v EtOH per un periodo di 4 ore ha mostrato una lieve ma significativa riduzione della vitalità cellulare ($p < 0,001$). Mentre il trattamento con 400 μ M H₂O₂ per 4 ore ha avuto un impatto drastico, con una riduzione della vitalità superiore al 90%. Sorprendentemente, dopo 24 ore di esposizione a EtOH o H₂O₂, si osserva un parziale recupero della popolazione cellulare vitale, con un aumento di circa 1,2 volte con EtOH e di circa 18 volte con H₂O₂, rispetto ai valori registrati a 4 ore; tale risposta è plausibilmente attribuibile all'attivazione di meccanismi adattativi di sopravvivenza. BSE, nel range di concentrazione testato, preincubato per 24 ore e quindi coincubato con EtOH o H₂O₂, non produce variazioni apprezzabili nella vitalità cellulare rispetto alle cellule controllo trattate con EtOH o H₂O₂ (Figura 20A-B).

In relazione alla risposta cellulare allo stress nutrizionale, dopo 4 e 24 ore, la vitalità cellulare risulta ridotta rispettivamente di circa il 15% e il 30% rispetto alle cellule controllo mantenute in medium completo. Nelle cellule pretrattate con BSE e coincubate in medium privo di siero (serum starvation) per 4 ore, i valori si mantengono comparabili a quelli registrati per il gruppo controllo di cellule coltivate in assenza di siero. Analogamente, non si rilevano effetti citoprotettivi di BSE dopo 24 ore (Figura 20C).

Relativamente alla condizione di stress osmotico, il trattamento con C₁₂H₂₂O₁₁ (100, 200, 300, 400 e 500 mM) per 4 ore, determina una riduzione dose-dipendente della vitalità rispetto al gruppo controllo. L'effetto citotossico risulta particolarmente evidente alle concentrazioni più elevate (400 e 500 mM), dove la vitalità si riduce del 30%. Il pretrattamento con BSE, seguito da coincubazione con C₁₂H₂₂O₁₁, non preserva la vitalità cellulare (Figura 20D).

La risposta protettiva del pretrattamento con BSE in uno scenario di stress multifattoriale, nonché stress ossidativo oppure osmotico associato a stress nutrizionale (serum starvation), è riportata in Figura 21.

L'incubazione delle cellule in medium privo di siero contenente EtOH al 2% v/v, per 4 o 24 ore, riduce del 60% la vitalità cellulare (Figura 21A). In queste condizioni sperimentali, la preincubazione con BSE attenua moderatamente la morte cellulare indotta dallo stress combinato, sia a 4 ore che a 24 ore. Nello specifico, BSE alla concentrazione di 66,38 µg/ml aumenta la vitalità del 17% dopo 4 ore ($p < 0,0001$), e del 10% dopo 24 ore ($p < 0,01$).

In presenza di 400 µM H₂O₂ in medium privo di siero, la riduzione della vitalità è marcata (>90%) già dopo 4 ore di trattamento. A 24 ore si assiste ad un modesto recupero (≈7%), verosimilmente associato all'attivazione di meccanismi adattativi di sopravvivenza cellulare. Il pretrattamento con BSE determina una citoprotezione dose-dipendente, a 4 e a 24 ore. In particolare, dopo 4 ore, la vitalità cellulare passa dal 2,4% al 28,8% in presenza di 66,38 µg/ml di BSE ($p < 0,001$); dopo 24 ore, la vitalità aumenta dal 17% al 71,75% con la medesima concentrazione di estratto ($p < 0,0001$) (Figura 21B).

Infine, i risultati relativi alle condizioni di stress osmotico associato a stress nutrizionale, sono riportati in Figura 21C. L'effetto del saccarosio (100, 200, 400 e 500 mM) sulla vitalità cellulare è sia dose-dipendente che tempo dipendente. Tuttavia, il trattamento con BSE non ha mostrato un effetto protettivo, suggerendo che la sua capacità di mitigare il danno cellulare non è efficace in queste specifiche condizioni.

Sulla base dei risultati ottenuti, al fine di approfondire il potenziale citoprotettivo dell'estratto di *Boswellia sacra*, è stato selezionato il modello sperimentale che associa stress ossidativo (indotto da EtOH oppure H₂O₂) e nutrizionale.

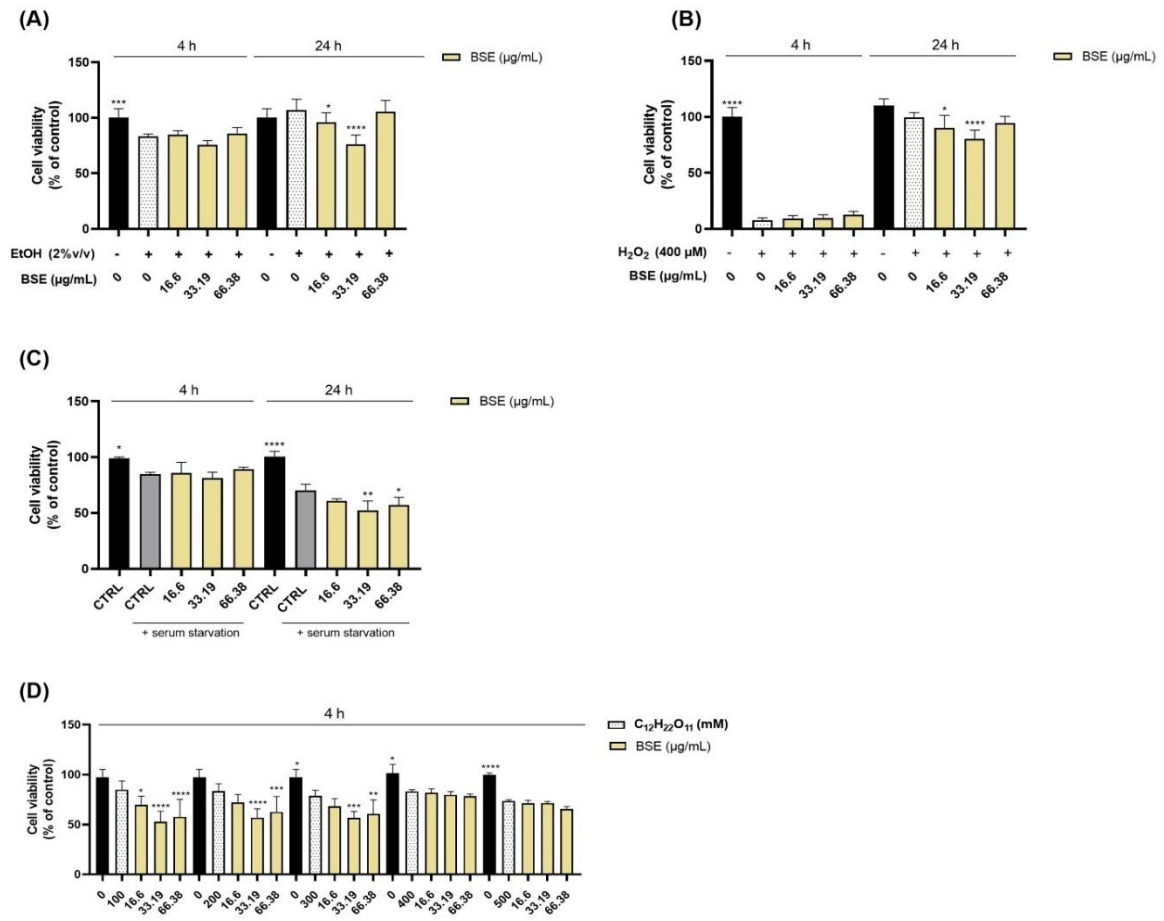


Figura 20. Effetti del pretrattamento con l'estratto di *Boswellia sacra* (BSE) sulla vitalità degli astrociti sottoposti a condizioni di singolo stress cellulare. Gli astrociti sono state incubati in assenza di trattamenti aggiuntivi in medium completo, preincubati in assenza di trattamenti aggiuntivi in medium completo e successivamente co-incubati per 4 o 24 ore con (A) 2% v/v EtOH, (B) 400 μM H₂O₂, (C) medium serum-free e (D) 100-500 mM C₁₂H₂₂O₁₁, oppure preincubati per 24 ore in presenza di diversa concentrazione di BSE (16,6, 33,19 e 66,38 μg/ml) in medium completo e successivamente co-incubate per 4 o 24 ore con (A) 2% v/v EtOH, (B) 400 μM H₂O₂, (C) medium serum-free e (D) 100-500 mM C₁₂H₂₂O₁₁. Tutti i valori per gruppo sono espressi come media (±SD) (n = 3 esperimenti). Differenze tra gruppi sono state valutate mediante ANOVA a una via, seguita da post-hoc Bonferroni. I livelli di significatività sono indicati come: ****p < 0,0001, ***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,05, rispetto al gruppo controllo con EtOH (A) / H₂O₂ (B) / CTRL in condizioni di serum starvation (C) o C₁₂H₂₂O₁₁ (D)

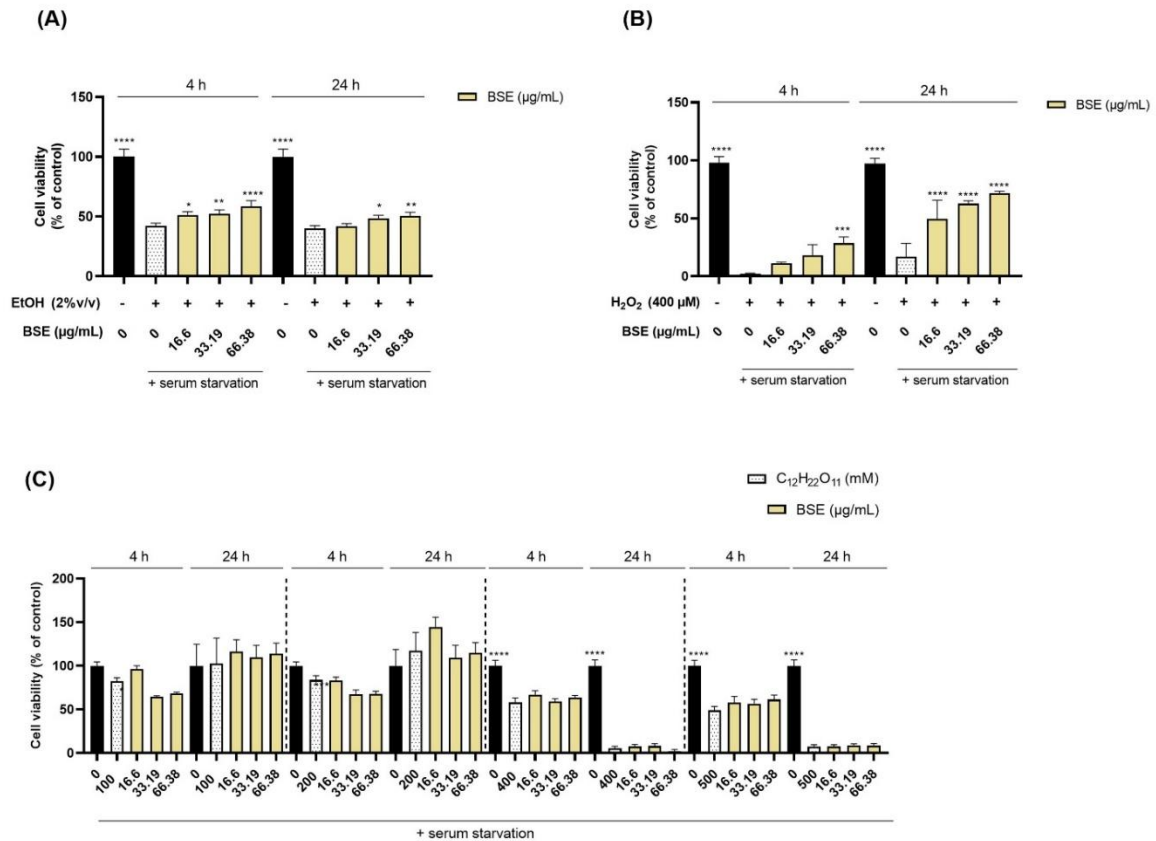


Figura 21. Effetti del pretrattamento con l'estratto di *Boswellia sacra* (BSE) sulla vitalità degli astrociti sottoposti a stress ossidativo oppure osmotico associato a stress nutrizionale (serum starvation). Gli astrociti sono state incubati in assenza di trattamenti aggiuntivi in medium completo, preincubati in assenza di trattamenti aggiuntivi in medium completo e successivamente co-incubate per 4 o 24 ore con (A) 2% v/v EtOH + medium serum-free (B) 400 μM H₂O₂ + medium serum-free (C) 100-500 mM C₁₂H₂₂O₁₁ + medium serum-free, oppure preincubati per 24 ore in presenza di diversa concentrazione di BSE (16,6, 33,19 e 66,38 μg/ml) in medium completo, e successivamente co-incubate per 4 o 24 ore con (A) 2% v/v EtOH, + medium serum-free (B) 400 μM H₂O₂ + medium serum-free e (C) 100-500 mM C₁₂H₂₂O₁₁ + medium serum-free. Tutti i valori per gruppo sono espressi come media (±SD) (n = 3 esperimenti). Differenze tra gruppi sono state valutate mediante ANOVA a una via, seguita da post-hoc Bonferroni. I livelli di significatività sono indicati come: ****p < 0,0001, ***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,05, rispetto al gruppo controllo con H₂O₂ (A) / EtOH (B) o C₁₂H₂₂O₁₁ (C).

4.4.6 Attività anti-apoptotica di BSE in condizioni di stress ossidativo associato a stress nutrizionale (test TUNEL e cleaved caspase-7)

Per valutare un possibile danno al DNA indotto dalle condizioni di stress ossidativo associato a stress nutrizionale, è stato eseguito il test TUNEL (Figure 22 e 24), mentre i livelli di cleaved caspase-7 sono stati analizzati tramite Western blot (Figura 23).

L'analisi di microscopia a fluorescenza rivela l'assenza di cellule TUNEL-positive (apoptotiche) nel gruppo controllo (cellule coltivate in medium completo). Al contrario, l'analisi ha rilevato un aumento significativo del numero di cellule TUNEL-positive dopo il trattamento delle cellule in medium privo di siero contenente EtOH (Figura 22A). In particolare,

la percentuale di cellule positive sul totale è del 67% e del 100%, rispettivamente dopo 4 e 24 ore di stress (Figura 22B). Invece, già dopo 4 ore, il 100% della popolazione cellulare è positiva dopo il trattamento con H₂O₂ in assenza di siero (Figura 24B). Il pretrattamento con BSE ha esercitato un significativo effetto protettivo, riducendo in modo dose-dipendente il numero di cellule TUNEL-positive. Nello specifico, in presenza di medium privo di siero contenente EtOH, la percentuale di cellule TUNEL-positive è stata ridotta dal 67% al 4,27% dopo 4 ore, e dal 100% all'8,35% dopo 24 ore di trattamento con 66,38 µg/ml BSE (Figura 21B). Nelle cellule esposte a H₂O₂ in assenza di siero, il pretrattamento con la dose più alta di BSE ha ridotto del 90% la frazione di cellule TUNEL-positive dopo 4 ore, mentre ha completamente azzerato la presenza di cellule apoptotiche dopo 24 ore (Figura 24B).

L'analisi Western blot ha evidenziato un significativo aumento del segnale di cleaved caspase-7 nel gruppo trattato per 4 ore in medium privo di siero contenente EtOH, con un incremento di circa 1,7 volte rispetto al controllo basale (Figura 23). Il pretrattamento con BSE ha determinato una down-regulation dell'espressione di cleaved caspase-7, con un effetto dose-dipendente. In particolare, la concentrazione più elevata (66,38 µg/ml) ha ridotto drasticamente e significativamente i livelli di cleaved caspase-7, portandoli a valori circa 3 volte inferiori rispetto al gruppo trattato con EtOH ($p < 0,0001$), e al di sotto di quelli relativi al controllo basale. Le concentrazioni intermedia (33,19 µg/ml) e bassa (16,6 µg/ml) hanno invece indotto una riduzione meno marcata ma comunque significativa rispetto al gruppo EtOH ($p < 0,0001$). Dopo 24 ore di trattamento, il profilo di espressione della proteina rimane analogo a quello osservato a 4 ore, sebbene i livelli di cleaved caspase-7 risultino complessivamente più bassi.

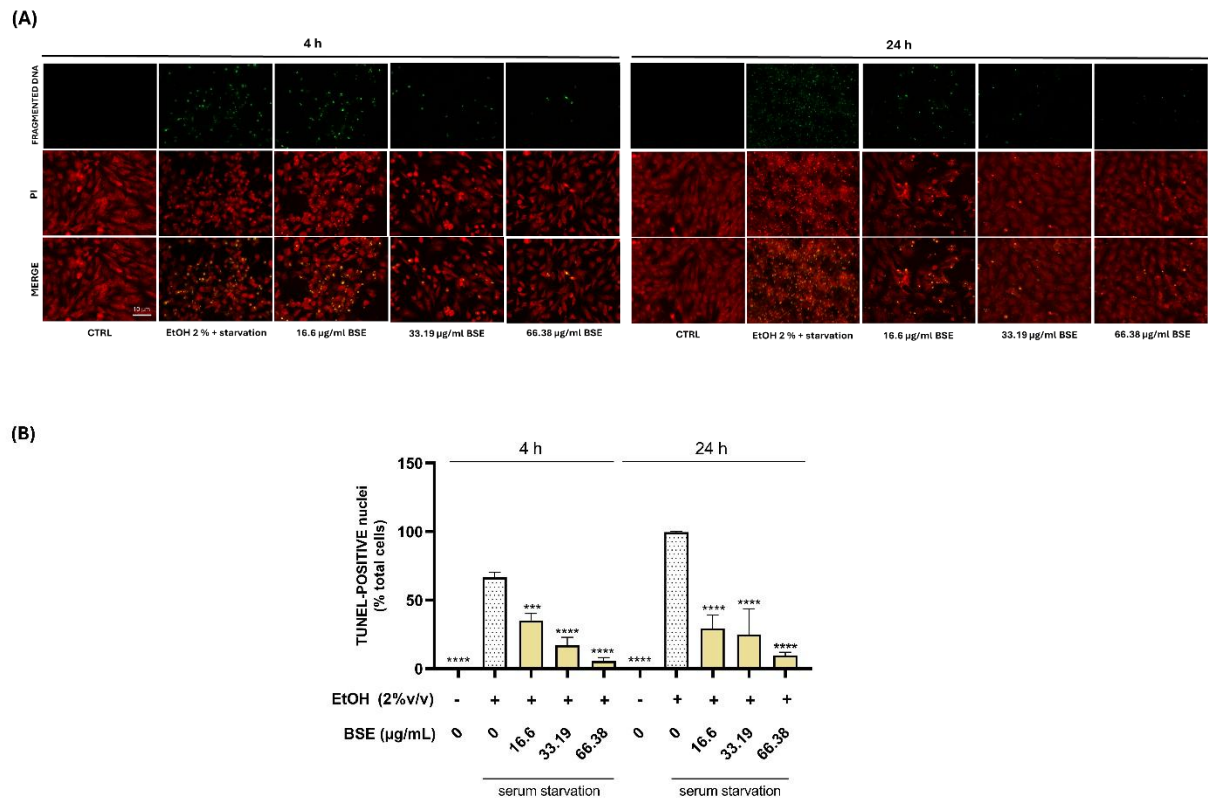


Figura 22. Valutazione dell'apoptosi mediante saggio TUNEL fluorescente in astrociti sottoposti a stress ossidativo (EtOH) associato a stress nutrizionale e pretrattati con l'estratto di *Boswellia sacra* (BSE). Lo stress è stato indotto incubando le cellule pretrattate con o senza BSE in medium serum-free contenente 2% v/v EtOH. **(A)** In verde viene evidenziata la frammentazione del DNA marcata tramite FITC (Isotiocianato di fluoresceina). In rosso, la controcolorazione con l'agente intercalante PI (Propidio ioduro). Il MERGE è il risultato della sovrapposizione dei due segnali di fluorescenza. Barra di scala = 10 µm. **(B)** Quantificazione dell'apoptosi: i dati rappresentano la percentuale di nuclei TUNEL-positivi sul totale delle cellule (% total cells). Tutti i valori per gruppo sono espressi come media ($\pm$ SD) ($n = 3$ esperimenti). Differenze tra gruppi sono state valutate mediante ANOVA a una via, seguita da post-hoc Bonferroni. I livelli di significatività sono indicati come: **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, rispetto al gruppo controllo con EtOH.

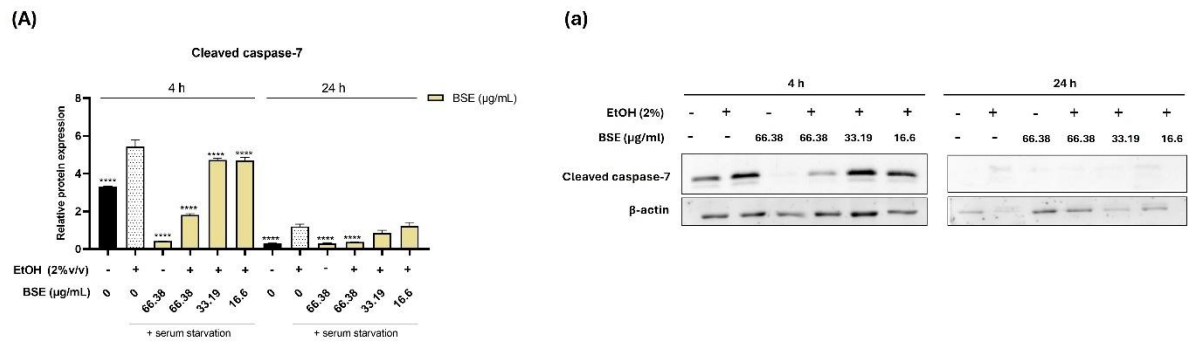


Figura 23. Espressione della cleaved caspase-7 in astrociti sottoposti a stress ossidativo (EtOH) associato a stress nutrizionale ed effetti del pretrattamento con l'estratto di *Boswellia sacra* (BSE). (A) L'istogramma mostra l'analisi densitometrica delle bande relative alla cleaved caspase-7. L'espressione proteica relativa, riportata come unità arbitraria, è stata calcolata come il rapporto di densità della banda rispetto a quello della β -actina. (a) Rappresentazione Western blot della cleaved caspase-7 in lisati totali di astrociti coltivati in medium completo senza trattamenti aggiuntivi, preincubati in assenza di trattamenti aggiuntivi e successivamente sottoposti a co-incubazione con 2% v/v EtOH in medium serum-free per 4 o 24 ore, oppure preincubati per 24 ore con diverse concentrazioni di BSE (16,6; 33,19; 66,38 $\mu\text{g/ml}$) e successivamente co-incubate per 4 o 24 ore con 2% v/v EtOH in medium serum-free. Tutti i valori per gruppo sono espressi come media ($\pm\text{SD}$) ($n = 3$ esperimenti). Differenze tra gruppi sono state valutate mediante ANOVA a una via, seguita da post-hoc Bonferroni. I livelli di significatività sono indicati come: **** $p < 0,0001$, rispetto al gruppo controllo con EtOH.

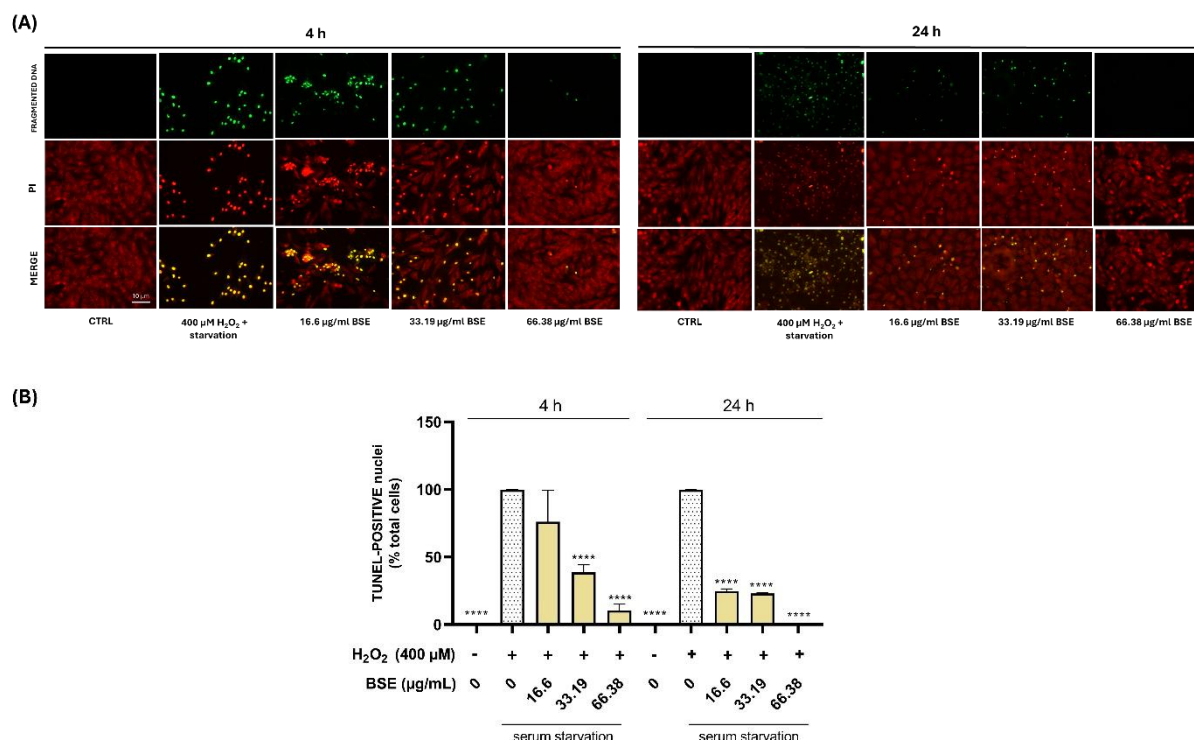


Figura 24. Valutazione dell'apoptosi mediante TUNEL fluorescente in astrocyti sottoposti a stress ossidativo (H_2O_2) associato a stress nutrizionale e pretrattati con l'estratto di *Boswellia sacra* (BSE). Lo stress è stato indotto incubando le cellule pretrattate con o senza BSE, in medium serum-free contenente 400 μM H_2O_2 . (A) In verde viene evidenziata la frammentazione del DNA marcata tramite FITC (Isotiocianato di fluoresceina). In rosso, la controcolorazione con l'agente intercalante PI (Propidio ioduro). Il MERGE è il risultato della sovrapposizione dei due segnali di fluorescenza. Barra di scala = 10 μm . (B) Quantificazione dell'apoptosi: i dati rappresentano la percentuale di nuclei TUNEL-positivi sul totale delle cellule (% total cells). Tutti i valori per gruppo sono espressi come media ($\pm SD$) ($n = 3$ esperimenti). Differenze tra gruppi sono state valutate mediante ANOVA a una via, seguita da post-hoc Bonferroni. I livelli di significatività sono indicati come: **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, rispetto al gruppo controllo con H_2O_2 .

4.4.7 Valutazione dei pathway molecolari in cellule sottoposte a stress ossidativo (indotto da EtOH) associato a stress nutrizionale

4.4.7.1 Effetti di BSE sull'espressione di marker infiammatori (iNOS, COX-2, p-IkBa/IkBa)

L'espressione di iNOS, COX-2 e il rapporto p-IkBa/IkBa sono stati analizzati come indicatori dell'attivazione di vie infiammatorie nel modello di stress ossidativo (indotto da EtOH) associato a stress nutrizionale. I risultati delle analisi Western blot, sono mostrati in Figura 25A-C.

Le analisi mostrano che dopo 4 ore di trattamento in medium privo di siero contenente EtOH, i livelli di iNOS risultano paragonabili al controllo basale (cellule mantenute in medium completo) e sostanzialmente invariati in ciascun gruppo sperimentale. A 24 ore emerge invece

un andamento peculiare: nel controllo basale, i livelli aumentano di circa tre volte rispetto a 4 ore, mentre nel controllo trattato con EtOH in assenza di siero sono inferiori di circa 1,5 volte rispetto al controllo basale. Nei gruppi pretrattati con BSE e coincubati in medium privo di siero contenente EtOH, i livelli di iNOS si distribuiscono in modo variabile: alla concentrazione più elevata (66,38 $\mu\text{g/ml}$) e più bassa (16,6 $\mu\text{g/ml}$) questi risultano comparabili al controllo basale, mentre alla dose intermedia i livelli sono paragonabili al controllo trattato con EtOH in assenza di siero. Invece, il pretrattamento con BSE 66,38 $\mu\text{g/ml}$ e successiva co-incubazione in medium privo di siero e senza EtOH (condizione di singolo stress), determina un incremento superiore anche al gruppo basale.

Per quanto COX-2, a 4 ore non si osservano differenze apprezzabili tra tutti i gruppi sperimentali. A 24 ore, invece, il trattamento con EtOH in assenza di siero, ha determinato una evidente up-regulation dell'espressione di COX-2 ($\approx 1,9$ volte rispetto al controllo basale). Il pretrattamento con BSE ha modulato significativamente questa risposta infiammatoria, in modo dose-dipendente. In particolare, le concentrazioni di 66,38 e 33,19 $\mu\text{g/ml}$ hanno determinato una marcata riduzione dell'espressione di COX-2 ($p < 0,0001$), riportando i livelli proteici a valori inferiori ($\approx 2,4$ volte) rispetto al gruppo trattato con EtOH in assenza di siero. Al contrario, la concentrazione più bassa (16,6 $\mu\text{g/ml}$) non ha esercitato un effetto protettivo, mostrando un'espressione addirittura aumentata ($\approx 1,3$ volte) rispetto al controllo trattato con EtOH.

L'analisi del rapporto p-I κ B α /I κ B α , utilizzato come indicatore dell'attivazione della via di segnalazione NF- κ B, non ha mostrato variazioni significative tra tutti i gruppi sperimentali, dopo 4 ore. Al contrario, dopo 24 ore, il trattamento in medium privo di siero contenente EtOH ha indotto un significativo incremento del rapporto ($\approx 9,3$ volte) rispetto al controllo basale ($p < 0,0001$), suggerendo un'attivazione robusta della segnalazione infiammatoria mediata da NF- κ B. Il pretrattamento con BSE ha contrastato in maniera significativa tale attivazione. Le concentrazioni di 66,38 e 33,19 $\mu\text{g/ml}$ hanno infatti riportato il rapporto p-I κ B α /I κ B α a livelli comparabili a quelli osservati nel controllo basale, con una riduzione di circa 2,4 volte rispetto al gruppo trattato con EtOH. Anche la concentrazione più bassa (16,6 $\mu\text{g/ml}$) ha determinato una riduzione significativa del rapporto, sebbene in misura minore ($\approx 1,3$ volte rispetto al controllo trattato con EtOH; $p < 0,05$).

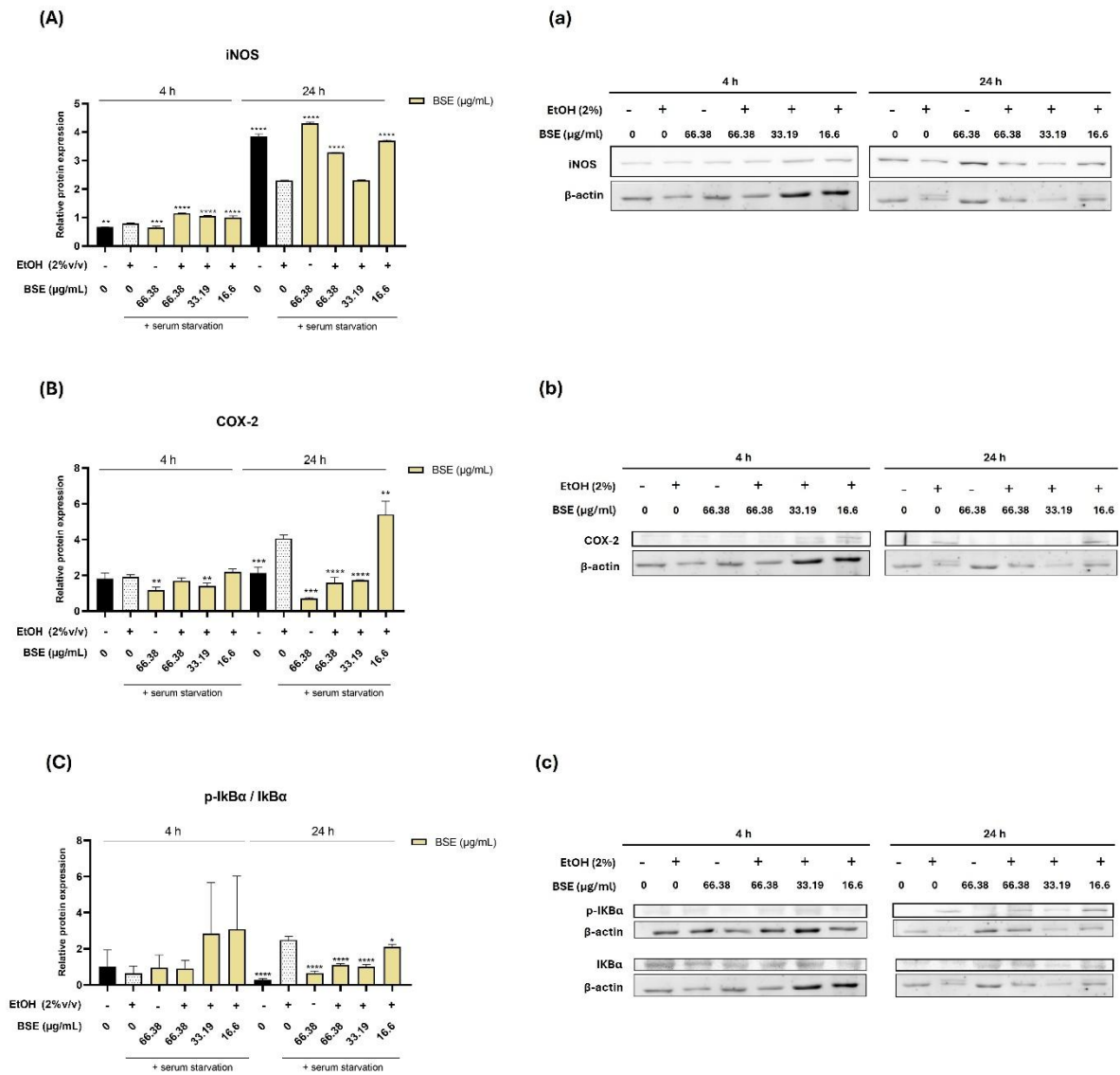


Figura 25. Espressione di iNOS, COX-2 e p-IkBα/IkBα in astrocyti sottoposti a stress ossidativo (EtOH) associato a stress nutrizionale ed effetti del pretrattamento con l'estratto di *Boswellia sacra* (BSE). Gli istogrammi mostrano l'analisi densitometrica delle bande ottenute per **(A)** iNOS, **(B)** COX-2, **(C)** rapporto p-IkBα/IkBα. L'espressione proteica relativa, riportata come unità arbitraria, è stata calcolata come il rapporto di densità della banda rispetto a quello dell'actina. **(a-c)** Rappresentazione Western blot per iNOS, COX-2, p-IkBα/IkBα in lisati totali di astrocyti coltivati in medium completo senza trattamenti, preincubati in assenza di trattamenti aggiuntivi e successivamente sottoposti a co-incubazione con 2% v/v EtOH in medium serum-free per 4 o 24 ore, oppure preincubati per 24 ore con diverse concentrazioni di BSE (16,6; 33,19; 66,38 µg/ml) e successivamente co-incubate per 4 o 24 ore con 2% v/v EtOH in medium serum-free. Tutti i valori per gruppo sono espressi come media (±SD) (n = 3 esperimenti). Differenze tra gruppi sono state valutate mediante ANOVA a una via, seguita da post-hoc Bonferroni. I livelli di significatività sono indicati come: ****p < 0,0001, ***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,05. rispetto al gruppo controllo con EtOH.

4.4.7.2 Effetti di BSE sull'espressione di marker antiossidanti (Nrf2)

L'espressione della proteina Nrf2 è stata analizzata come indicatore dell'attivazione delle vie di risposta antiossidante, nel modello di stress ossidativo associato a stress nutrizionale. I risultati sono illustrati in Figura 26.

L'analisi dell'espressione di Nrf2 mostra che, a 4 ore, in seguito al trattamento con EtOH in assenza di siero, i livelli di espressione per Nrf2 resta sostanzialmente invariati rispetto al controllo basale. Di contro, nei campioni pretrattati con BSE si osserva un incremento significativo dell'espressione di Nrf2, sebbene non in modo dose-dipendente. In particolare, la concentrazione intermedia di BSE (33,19 µg/ml) induce un aumento di circa 3 volte rispetto ai gruppi controllo ($p < 0,0001$), mentre le concentrazioni più alta (66,38 µg/ml) e più bassa (16,6 µg/ml) mostrano livelli comparabili ai gruppi controllo. A 24 ore, si rileva un comportamento differente: il gruppo controllo basale presenta livelli di Nrf2 superiori rispetto al gruppo trattato con EtOH in assenza di siero ($\approx 1,1$ volte). Il pretrattamento con la concentrazione più elevata di BSE (66,38 µg/ml) determina un aumento significativo dell'espressione di Nrf2 rispetto al controllo trattato con EtOH in medium serum-free (2 volte; $p < 0,0001$), mentre le concentrazioni inferiori non mostrano variazioni apprezzabili rispetto al gruppo controllo trattato con EtOH in assenza di siero. Il gruppo pretrattato con BSE 66,38 µg/ml e successivamente co-incubato in medium privo di siero e senza EtOH, presenta il maggiore incremento osservato per questo marcatore, con livelli di Nrf2 superiori di circa 1,5 volte rispetto al controllo basale e di 3,2 volte rispetto al gruppo trattato con medium privo di siero contenente EtOH.

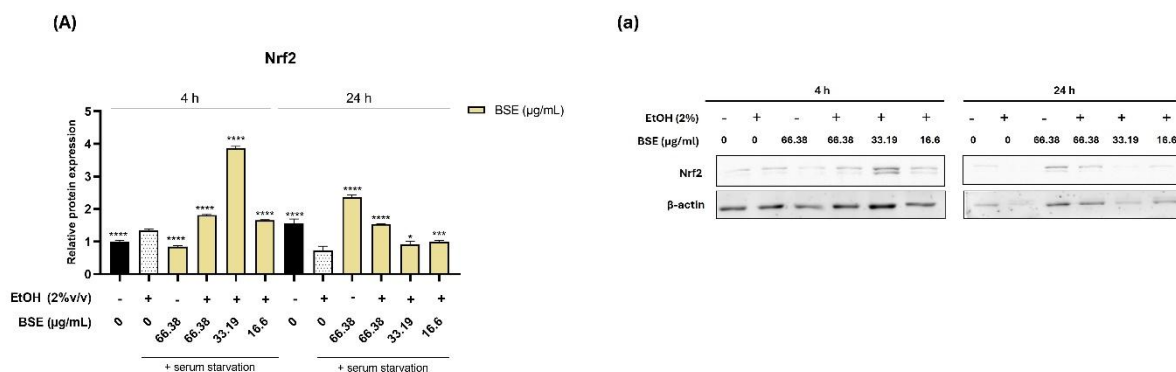


Figura 26. Espressione di Nrf2 in astroцитi sottoposti a stress ossidativo (EtOH) associato a stress nutrizionale ed effetti del pretrattamento con l'estratto di *Boswellia sacra* (BSE). Gli istogrammi mostrano l'analisi densitometrica delle bande ottenute per (A) Nrf2. L'espressione proteica relativa, riportata come unità arbitraria, è stata calcolata come il rapporto di densità della banda rispetto a quello dell'actina. (a) Rappresentazione Western blot per Nrf2 in lisati totali di astroцитi coltivati in medium completo senza trattamenti, preincubati in assenza di trattamenti aggiuntivi e successivamente sottoposti a co-incubazione con 2% v/v EtOH in medium serum-free per 4 o 24 ore, oppure preincubati per 24 ore con diverse concentrazioni di BSE (16,6; 33,19; 66,38 μg/ml) e successivamente co-incubate per 4 o 24 ore con 2% v/v EtOH in medium serum-free. Tutti i valori per gruppo sono espressi come media (±SD) (n = 3 esperimenti). Differenze tra gruppi sono state valutate mediante ANOVA a una via, seguita da post-hoc Bonferroni. I livelli di significatività sono indicati come: ****p < 0,0001, ***p < 0,001, *p < 0,05, rispetto al gruppo controllo con EtOH.

4.4.7.3 Effetti di BSE sull'espressione di marker autofagici (p62, LC3-II/LC3-I)

L'espressione di p62 e il rapporto LC3-II/LC3-I sono stati analizzati come marker molecolari dell'attivazione del pathway autofagico nel modello di stress ossidativo associato a stress nutrizionale. I risultati delle analisi Western blot, sono mostrati in Figura 27A-B.

Dopo 4 ore di trattamento, il gruppo trattato con EtOH in medium serum-free mostra un aumento significativo dei livelli di p62 (≈1,5 volte rispetto al controllo basale). Il pretrattamento con BSE, alle concentrazioni di 33,19 e 16,6 μg/ml, ha determinato una down-regulation marcata dei livelli di p62, con una riduzione significativa rispetto sia al gruppo trattato con EtOH sia al controllo basale (p < 0,001). Al contrario, la concentrazione più elevata (66,38 μg/ml) non ha mostrato effetto apprezzabile sull'espressione della proteina, mantenendo livelli comparabili al gruppo trattato con EtOH in medium serum-free e al gruppo pretrattato con BSE e co-incubato in medium privo di siero e senza EtOH. Dopo 24 ore, i livelli di p62 nei gruppi controllo (medium completo e medium serum-free contenente EtOH) si mantengono sostanzialmente invariati rispetto al tempo di 4 ore. Di contro, il pretrattamento con BSE, nell'intero range testato, ha incrementato i livelli proteici raggiungendo valori comparabili al controllo trattato con EtOH. Viceversa, nel gruppo pretrattato con BSE (66,38 μg/ml) e successivamente co-incubato in medium privo di siero e senza EtOH, i livelli di p62 restano comparabili a quelli del controllo basale (Figura 27A).

Il rapporto LC3-II/LC3-I è stato analizzato come ulteriore indicatore dell'attivazione del processo autofagico (Figura 27B). Dopo 4 ore di esposizione a EtOH in assenza di siero, si osserva un modesto incremento del rapporto LC3-II/LC3-I ($\approx 0,5$ volte rispetto al gruppo controllo basale). Nei gruppi pretrattati con BSE, il rapporto risulta lievemente ridotto rispetto al gruppo trattato con EtOH, pur mantenendosi al di sopra dei livelli del controllo basale. Nel complesso, le differenze tra i gruppi sperimentali, a questo time-point, risultano quantitativamente basse e comparabili tra i diversi gruppi sperimentali. A 24 ore, invece, nel controllo basale si registra un incremento significativo di LC3-II/LC3-I (2,8 volte rispetto ai livelli osservati a 4 ore). Il trattamento con EtOH in medium serum-free ha aumentato i livelli di LC3-II/LC3-I di circa 1,4 volte rispetto al controllo basale. Al contrario, il pretrattamento con BSE determina una riduzione significativa del rapporto LC3-II/LC3-I in tutti i gruppi sperimentali co-incubati con EtOH in assenza di siero, determinando valori inferiori rispetto al controllo basale, senza tuttavia mostrare una chiara dose-dipendenza. Invece, nel gruppo pretrattato con BSE alla concentrazione di 66,38 $\mu\text{g/ml}$ e successivamente co-incubato in medium privo di siero e senza EtOH, i livelli del rapporto LC3-II/LC3-I risultano inferiori ($\approx 0,5$ volte) rispetto al gruppo trattato con EtOH.

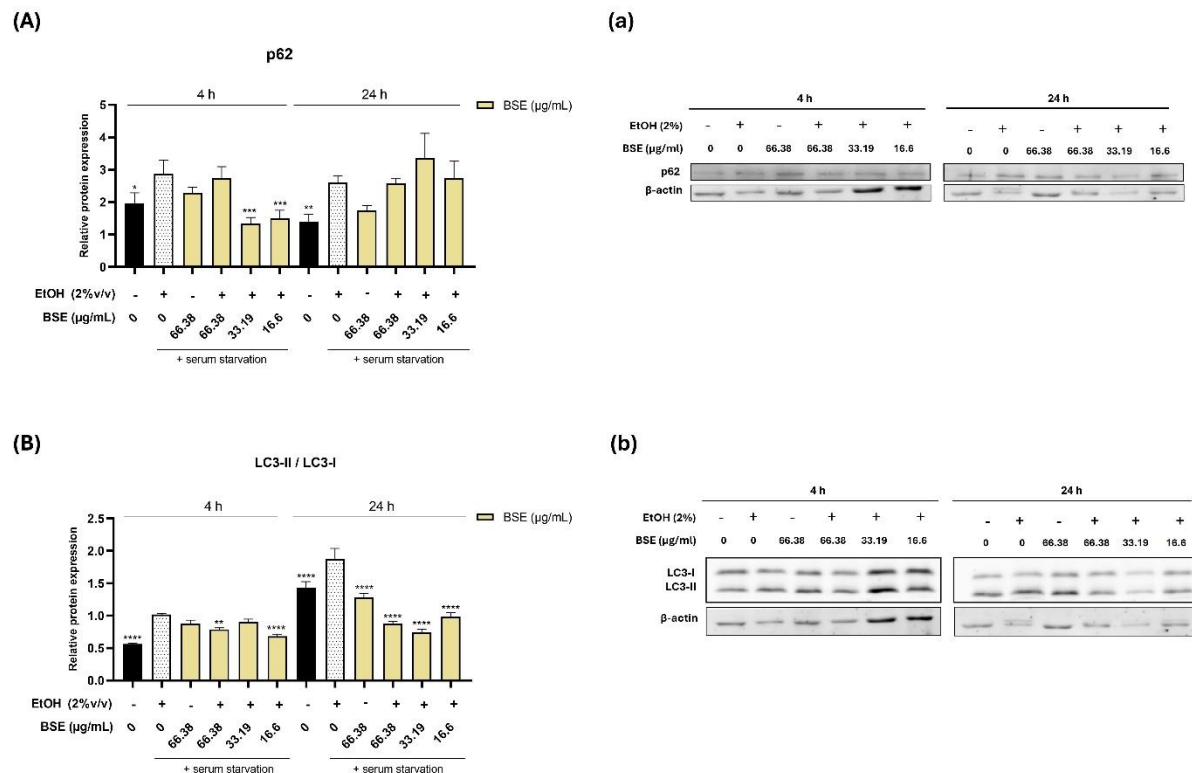


Figura 27. Espressione di p62 e LC3-II/LC3-I in astroцитi sottoposti a stress ossidativo e nutrizionale ed effetti del pretrattamento con l'estratto di *Boswellia sacra* (BSE). Gli istogrammi mostrano l'analisi densitometrica delle bande ottenute per (A) p62 e (B) LC3-II/LC3-I. L'espressione proteica relativa, riportata come unità arbitraria, è stata calcolata come il rapporto di densità della banda rispetto a quello dell'actina. (a-b) Rappresentazione Western blot per p62 e LC3-II/LC3-I in lisati totali di astroцитi coltivati in medium completo senza trattamenti, preincubati in assenza di trattamenti aggiuntivi e successivamente sottoposti a co-incubazione con 2% v/v EtOH in medium serum-free per 4 o 24 ore, oppure preincubati per 24 ore con diverse concentrazioni di BSE (16,6; 33,19; 66,38 μg/ml) e successivamente co-incubate per 4 o 24 ore con 2% v/v EtOH in medium serum-free. Tutti i valori per gruppo sono espressi come media (±SD) (n = 3 esperimenti). Differenze tra gruppi sono state valutate mediante ANOVA a una via, seguita da post-hoc Bonferroni. I livelli di significatività sono indicati come: ****p < 0,0001, ***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,05, rispetto al gruppo controllo con EtOH.

4.5 DISCUSSIONE

Le malattie neurodegenerative condividono meccanismi molecolari comuni, tra cui stress ossidativo, neuroinfiammazione e attivazione delle vie di morte cellulare, che determinano una progressiva compromissione delle funzioni cellulari del SNC. Sebbene la ricerca preclinica e clinica si sia tradizionalmente concentrata sui neuroni come principali responsabili dei meccanismi fisiopatologici nel SNC, evidenze emergenti indicano che anche gli astroцитi – la popolazione gliale più abbondante nel SNC – svolgano un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi cerebrale. Alterazioni funzionali a carico degli astroцитi, infatti, non rappresentano un mero evento secondario, ma possono contribuire in maniera determinante alla

progressione dei danni neuronali. In tale prospettiva, lo sviluppo di strategie volte a preservare l'integrità e le funzioni astrocitarie si configura come una direzione essenziale per lo sviluppo di approcci neuroprotettivi efficaci.

Il presente studio mirava a indagare, *in vitro*, gli effetti neuroprotettivi dell'estratto di *Boswellia sacra* (BSE) in un modello di astrociti murini sottoposti a differenti condizioni sperimentali di stress cellulare.

La caratterizzazione chimica del semilavorato di *Boswellia sacra*, utilizzato per la preparazione dell'estratto, ha confermato la presenza di una complessa miscela di triterpeni e diterpeni. Tra i primi, prevalgono gli acidi boswellici in forma acetilata, con l'AKBA come componente dominante, mentre nella frazione diterpenica il composto più abbondante è risultato essere l'isosserratolo. Questo profilo fitochimico, coerente con i dati presenti in letteratura, fornisce un solido riferimento per l'interpretazione dei successivi risultati biologici e suggerisce che gli effetti osservati nelle cellule trattate con BSE possano riflettere l'azione sinergica delle due classi di terpeni presenti nel campione.

La valutazione degli effetti del trattamento con BSE sulla vitalità degli astrociti in condizioni standard ha permesso di caratterizzarne un profilo dose-risposta. I risultati del saggio MTT indicano che concentrazioni medio-alte ($\geq 66,38 \mu\text{g/ml}$) di BSE inducono un effetto antiproliferativo già osservabile entro 48–72 ore dall'esposizione. Invece, non sono stati rilevati segni di citotossicità a dosi moderate ($\leq 66,38 \mu\text{g/ml}$), anche in caso di trattamento prolungato fino a 72 ore, suggerendo una buona tollerabilità cellulare entro questo range di concentrazione. Questi risultati confermano l'assenza di effetti tossici sugli astrociti entro specifici intervalli di concentrazione, in linea con quanto riportato per altri estratti di *Boswellia* o per i suoi composti bioattivi isolati, noti per inibire la proliferazione in modelli tumorali, ma in grado di esercitare un ruolo protettivo in cellule non trasformate [168], [197]. In particolare, la somministrazione di dosi diverse (16,6, 33,19 e 66,38 μg BSE/ml di medium cellulare) dell'estratto non ha avuto alcun impatto negativo sulla vitalità cellulare per trattamenti fino a 72 ore, definendo così un intervallo ottimale per il nostro modello sperimentale.

In aggiunta, l'indagine morfologica sulla risposta degli astrociti al trattamento di 24 ore con l'estratto, nel range di concentrazioni compreso tra 16,6 e 66,38 $\mu\text{g/ml}$, conferma la tollerabilità cellulare del trattamento. Di fatto, il mantenimento dell'intensità del segnale per GFAP unitamente all'assenza di alterazioni nei parametri morfometrici, indica che il trattamento con

BSE non compromette il fenotipo astrocitario, preservandone l'organizzazione del citoscheletro.

Con l'obiettivo di definire il modello sperimentale di stress più rappresentativo di eventi neurodegenerativi, è stata esaminata la sopravvivenza cellulare in condizione di singolo stress (stress osmotico indotto da saccarosio; stress ossidativo indotto dal trattamento con etanolo oppure acqua ossigenata e stress nutrizionale dovuto alla privazione di siero nel terreno di coltura) o loro associazioni (stress ossidativo oppure osmotico combinato a stress nutrizionale), applicati in trattamenti acuti o prolungati (4 e 24 ore). La scelta di associare più fonti di stress aveva l'obiettivo di ricreare condizioni più complesse e realistiche di neurotossicità.

Nelle nostre condizioni sperimentali, abbiamo osservato una diversa suscettibilità degli astrociti in relazione alla natura dello stimolo applicato. Lo stress ossidativo indotto da H_2O_2 ha determinato un marcato effetto citotossico, già nelle fasi precoci (4 ore). Invece, lo stress ossidativo indotto da EtOH, non ha modificato in maniera importante la vitalità delle cellule, anche per trattamenti di 24 ore. In presenza di stress iperosmotico indotto da saccarosio, al contrario, si assiste ad una progressiva riduzione della vitalità dipendente dalla dose, che non è stata attenuata dal pretrattamento con BSE, suggerendo che l'estratto non intervenga in maniera significativa sulla regolazione dei danni associati a squilibri osmotici. Analogamente, la condizione sperimentale di stress nutrizionale, ha causato una riduzione moderata della vitalità, senza che BSE mostrasse un effetto citoprotettivo apprezzabile.

L'effetto del BSE è invece risultato particolarmente evidente nei modelli di stress combinato. In presenza di stress ossidativo (indotto dal trattamento con EtOH oppure H_2O_2) associato a stress nutrizionale, l'estratto ha, infatti, impedito in maniera significativa la perdita di vitalità, specialmente contro l'effetto indotto da H_2O_2 , sia a 4 che a 24 ore. Al contrario, riguardo la combinazione di stress osmotico e stress nutrizionale, BSE non ha mostrato protezione. Questi risultati sono di particolare interesse, poiché suggeriscono che gli effetti citoprotettivi dell'estratto siano, verosimilmente, mediati da specifiche vie di segnalazione. In questo contesto, il ruolo dei triterpeni presenti nell'estratto risulta coerente con i meccanismi osservati. Gli acidi boswellici, in particolare AKBA e β -BA, sono noti per attivare le difese antiossidanti endogene e contrastare il danno da ROS in diversi modelli cellulari, fornendo una base razionale alla protezione osservata contro il danno ossidativo [88], [198]. Inoltre, in uno studio *in vitro* su cellule neuronali, l'AKBA ha aumentato significativamente la sopravvivenza cellulare dopo esposizione a condizioni di privazione di ossigeno, glucosio e siero [199], suggerendo che gli acidi boswellici possano svolgere un ruolo citoprotettivo anche in situazioni di stress

nutrizionale o metabolico, coerentemente con quanto osservato nei nostri modelli di stress combinato.

Tenendo conto dei risultati, il modello di stress ossidativo (indotto da EtOH oppure H₂O₂) associato allo stress nutrizionale, è stato identificato come il più interessante per approfondire i meccanismi molecolari sottostanti la citoprotezione promossa da BSE. Tale modello ha pertanto fornito costituito la base sperimentale per gli approfondimenti successivi, volti ad indagare la modulazione di vie antiossidanti e infiammatorie, nonché l'influenza di BSE sul pathway autofagico e apoptotico.

Lo stress ossidativo e l'infiammazione sono processi strettamente interconnessi fra loro. Un eccesso di ROS, derivante da squilibri tra produzione di radicali liberi e capacità dei sistemi antiossidanti endogeni, può infatti fungere da stimolo primario per l'attivazione di pathways pro-infiammatori. A livello molecolare, i ROS attivano fattori di trascrizione chiave come NF- κ B, determinando l'aumentata espressione di citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , IL-6, TNF- α), chemochine ed enzimi come COX-2 e iNOS [200]. Questa risposta amplifica il reclutamento e l'attivazione di cellule immunitarie, che a loro volta rilasciano ulteriori ROS e mediatori infiammatori, perpetuando il danno cellulare e tissutale. Inoltre, in condizioni di stress nutrizionale – inteso in termini di restrizione o eccesso di nutrienti – lo squilibrio metabolico può esacerbare la produzione di ROS mitocondriali e alterare i meccanismi di difesa redox, innescando un ambiente pro-infiammatorio cronico [201]. Queste osservazioni motivano l'analisi congiunta di marker ossidativi e infiammatori nel modello di stress cellulare adottato. Un'attenzione particolare è stata rivolta anche alle vie dell'autofagia e dell'apoptosi, meccanismi regolatori fondamentali e strettamente interconnessi nel determinare il destino della cellula in risposta a stimoli stressogeni [202].

L'autofagia è un processo di autodigestione cellulare che svolge un ruolo citoprotettivo essenziale, favorendo la degradazione selettiva di organelli danneggiati e aggregati proteici. Tale meccanismo prevede il sequestro del materiale citoplasmatico in vescicole a doppia membrana, gli autofagosomi, che successivamente si fondono con i lisosomi per consentire la degradazione e il riciclo dei componenti cellulari. Tuttavia, è stato dimostrato che l'attivazione prolungata dell'autofagia, può perdere la sua funzione adattativa, contribuendo all'innescare di processi di morte cellulare dovuti ad un'eccessiva degradazione di costituenti cellulari [203].

L'apoptosi è un programma di morte cellulare che si verifica nel normale ricambio cellulare, eliminando le cellule superflue durante il normale sviluppo e le cellule non funzionanti nell'organismo adulto. La sua funzione può inoltre essere innescata da diversi segnali, sia

intracellulari, come per esempio il danno ossidativo e l'ipossia, sia extracellulari, come la presenza di batteri patogeni o tossine [204], [205]. Il processo si articola in più fasi, inizia con la condensazione della cromatina nucleare, seguita dalla frammentazione del nucleo e dalla formazione di micronuclei e corpi apoptotici contenenti frammenti di cromatina, citosol e proteine degradate [196].

I dati ottenuti mediante microscopia a fluorescenza, hanno dimostrato che l'associazione di stress ossidativo e nutrizionale induce una rapida e marcata attivazione della via apoptotica, con un incremento progressivo delle cellule TUNEL-positive, fino a coinvolgere quasi l'intera popolazione entro 24 ore. Già a 4 ore, mentre il gruppo controllo non presentava frammentazione nucleare, le cellule trattate con EtOH o H₂O₂ in medium privo di siero, mostravano nuclei parzialmente frammentati ma ancora strutturalmente integri; di contro, a 24 ore, il DNA risultava totalmente frammentato e la cromatina ripartita in piccoli *spots*. È rilevante sottolineare che il pretrattamento con BSE ha esercitato un effetto protettivo significativo già nelle prime fasi del danno (4 ore), riducendo drasticamente la percentuale di cellule in apoptosi. Di particolare rilievo è che, in condizioni di stress prolungato, BSE abbia completamente soppresso l'attivazione apoptotica in presenza di H₂O₂ e l'abbia quasi totalmente inibita in presenza di EtOH.

I risultati appena discussi sono ulteriormente supportati dall'analisi Western blot riguardo la modulazione dei livelli di caspasi-7. La caspasi-7, insieme ad altre caspasi effettrici, riveste un ruolo cruciale nella fase esecutiva dell'apoptosi, in quanto responsabile del clivaggio di proteine strutturali e regolatorie, contribuendo così alla frammentazione del DNA e ad altre modificazioni morfologiche tipiche del processo apoptotico [206]. Nelle nostre condizioni sperimentali, l'aumento del segnale di caspasi-7 attiva osservato dopo 4 ore di trattamento risulta coerente con la presenza di nuclei apoptotici rilevati mediante test TUNEL, indicando la convergenza dei due approcci sperimentali nell'identificazione di cellule in apoptosi. Il pretrattamento con BSE determina una significativa down-regulation dell'espressione della caspasi-7 attiva, coerentemente con la marcata riduzione delle cellule TUNEL-positive. Questi risultati si allineano con quanto riportato in letteratura, secondo cui l'AKBA agisce come inibitore dell'attivazione delle caspasi-3/-8/-9, in diversi modelli cellulari [81], [207]. Dopo 24 ore, è ancora possibile individuare una riduzione dose-dipendente della caspasi-7 clivata nelle cellule pretrattate con BSE, sebbene i livelli della proteina risultino complessivamente inferiori in tutti i gruppi sperimentali rispetto al primo time-point. Questa diminuzione del segnale di immunorilevazione può essere attribuita sia al fisiologico turnover della proteina, sia alla possibile perdita delle cellule apoptotiche entro il tempo di raccolta dei campioni per l'analisi,

che conduce a una riduzione apparente del segnale nei campioni analizzati. Tale interpretazione è supportata dalla massiccia attivazione della morte cellulare, come evidenziato dall'elevata percentuale di cellule TUNEL-positive ($\approx 100\%$).

Oltre alla modulazione dei meccanismi apoptotici, è altresì emersa una regolazione legata al pathway autofagico, la cui compromissione rappresenta un nodo cruciale nella fisiopatologia delle malattie neurodegenerative. Gli induttori dell'autofagia stanno infatti attualmente ricevendo crescente attenzione, poiché la loro sovraregolazione potrebbe avere un effetto terapeutico su alcune malattie neurodegenerative, favorendo la rimozione di aggregati proteici da degradare [193].

La proteina adattatrice p62 e la proteina associata ai microtubuli della catena leggera 3B (LC3), rappresentano marker autofagici di riferimento per lo studio del processo autofagico. La proteina p62 è una proteina adattatrice che lega proteine ubiquitinate e LC3, dirigendo l'indirizzamento dei substrati verso la degradazione. Il suo accumulo intracellulare è, infatti, indicativo di un blocco del flusso autofagico. Oltre a tale funzione, p62 è coinvolta in molte vie di trasduzione del segnale, inclusa la via Keap1/Nrf2, essenziale per la regolazione della risposta antiossidante [208].

La proteina LC3B dei mammiferi è un marcatore dell'autofagosoma. Inizialmente viene sintetizzata come precursore e successivamente processata per generare la forma citosolica LC3-I. Quest'ultima viene coniugata con la fosfatidiletanolamina per formare LC3-II, che si inserisce sia sulla membrana esterna che su quella interna dell'autofagosoma. Al momento della fusione dell'autofagosoma con il lisosoma, la proteina LC3-II legata alla membrana interna viene degradata dalle proteasi lisosomiali. Il monitoraggio della conversione di LC3-I in LC3-II, che avviene durante le fasi iniziali del processo, è pertanto un metodo comune per monitorare i cambiamenti nella via autofagica [209].

Nelle nostre condizioni sperimentali, è emersa una modulazione dinamica del processo autofagico da parte di BSE, con effetti differenziati tra le fasi iniziali e tardive dell'insulto cellulare. Dopo 4 ore di trattamento con etanolo in medium privo di siero, i gruppi di controllo mostrano bassi livelli di LC3-II e, parallelamente, un aumento dell'espressione di p62. Questo profilo potrebbe riflettere la fase iniziale del processo autofagico, in cui la formazione di autofagosomi non è ancora significativamente attivata. Nei gruppi pretrattati con BSE, invece, la marcata riduzione dei livelli di p62 – seppur in assenza di un concomitante aumento di LC3-II – suggerisce un possibile potenziamento della fase di degradazione lisosomiale dei substrati autofagici. In tal senso, BSE potrebbe favorire l'efficienza del flusso autofagico piuttosto che

l'accumulo di autofagosomi. Questo meccanismo è coerente con precedenti osservazioni riportate in letteratura, secondo cui estratti ottenuti da *Artemisia annua* e *Panax ginseng* e il resveratrolo isolato, sono in grado di promuovere l'autofagia funzionale e di ridurre la neurotossicità in diversi modelli sperimentali [210]–[212]. Attualmente non esistono evidenze che supportino in ruolo degli acidi boswellici come induttori di autofagia protettiva in cellule normali sottoposte a stress; questo rende il risultato osservato nel nostro studio un dato nuovo. Per quanto riguarda la risposta nella fase tardiva dell'insulto (24 ore), era prevedibile un aumento del rapporto LC3-II/LC3-I nel gruppo controllo trattato con EtOH in assenza di siero, in quanto l'esposizione prolungata a condizioni di stress, tende ad attivare l'autofagia come risposta adattativa. Al contrario, nei gruppi pretrattati con BSE, il rapporto LC3-II/LC3-I risulta ridotto, mentre i livelli di p62 si mantengono elevati e comparabili a quelli del gruppo trattato con EtOH. Questo pattern potrebbe indicare un'alterazione della formazione degli autofagosomi, o più in generale una compromissione del flusso autofagico. L'accumulo di p62, infatti, è considerato un marker affidabile della disfunzione autofagica, riflettendo la presenza di aggregati proteici non degradati e un'efficienza ridotta del sistema di clearance intracellulare [213]. Questi risultati suggeriscono che, nella fase tardiva, BSE potrebbe modulare selettivamente l'autofagia, limitandone un'eccessiva attivazione che può essere dannosa per la cellula. D'altra parte, è stato dimostrato che un'attivazione prolungata o eccessiva dell'autofagia può perdere la sua funzione adattativa e determinare l'accumulo di autofagosomi citoplasmatici e la degradazione di componenti cellulari essenziali, conducendo infine alla morte cellulare [81], [214].

Studi su modelli tumorali hanno mostrato che alcuni acidi boswellici, come l'AKBA, tendono a inibire l'autofagia, con esito citotossico, come parte di un meccanismo antitumorale [215]. Con lo stesso esito citoprotettivo, nel nostro modello, l'inibizione dell'autofagia indotta plausibilmente da AKBA sembra favorire la sopravvivenza cellulare.

Pertanto, considerati nel loro insieme, questi risultati indicano che l'estratto di *Boswellia sacra* esercita un effetto citoprotettivo nei confronti del danno indotto dalla combinazione di stress ossidativo e deprivazione nutrizionale, modulando finemente l'interazione tra i pathway dell'autofagia e dell'apoptosi: durante la fase acuta dello stress il trattamento con BSE sembra facilitare la rimozione di componenti intracellulari danneggiati, sostenendo così la capacità di clearance della cellula, pur in presenza di segnali di attivazione apoptotica. Nella fase avanzata, invece, BSE sembra intervenire limitandone un'eccessiva attivazione.

Rispetto alla rilevata coesistenza dei fenomeni di autofagia e apoptosi, questa risulta compatibile con l'ipotesi secondo cui, in condizioni di stress, le cellule attivano

simultaneamente risposte adattative e segnali di morte programmata. Tali risposte si configurano come le componenti di un meccanismo integrato di sopravvivenza volto da un lato a preservare l'integrità cellulare in presenza di danni reversibili e, dall'altro, a eliminare le cellule irreversibilmente compromesse. Autofagia e apoptosi sono processi, per altro, regolati da una rete di segnali intracellulari comuni a entrambe le vie, come la proteina p62 [202].

In questo contesto, è plausibile ipotizzare che BSE contribuisca a un controllo dinamico del bilancio tra processi di sopravvivenza e morte, promuovendo l'attivazione coordinata di meccanismi citoprotettivi multipli, oltre quelli anti-apoptotici già osservati.

Le evidenze sperimentali emerse dallo studio sulla risposta antinfiammatoria e antiossidante supportano questa ipotesi. Dopo 24 ore di stress combinato, il pretrattamento con BSE ha infatti determinato una marcata inibizione della via infiammatoria mediata NF- κ B, come dimostrato dalla riduzione del rapporto p-I κ B α /I κ B α , accompagnata inoltre da una significativa down-regulation dell'espressione di COX-2. Questi effetti risultano coerenti con l'attività antinfiammatoria propria degli acidi boswellici, descritti in letteratura come inibitori della fosforilazione e della conseguente degradazione di I κ B α [216], [217].

Nel contesto della cascata infiammatoria regolata da NF- κ B, anche l'espressione di iNOS è soggetta a regolazione trascrizionale da parte di questo fattore; iNOS rappresenta infatti uno dei target a valle più rilevanti della via NF- κ B, e la sua attivazione è strettamente associata a stimoli infiammatori prolungati o intensi [218]. Le ossido nitrico sintasi (NOS) sono enzimi coinvolti nella produzione di NO a partire dall'amminoacido arginina. Tra le tre isoforme principali, la forma inducibile (iNOS) si distingue per essere espressa *de novo* in risposta a stimoli extracellulari pro-infiammatori, come citochine (TNF- α , IL-1 β), LPS o altri mediatori immunitari [169], [219]. Sebbene l'eccessiva attivazione di iNOS possa contribuire a danni tissutali in condizioni infiammatorie croniche, un'attivazione controllata può avviare circuiti redox, modulando l'equilibrio tra stress ossidativo e meccanismi citoprotettivi. A supporto di ciò, è stato dimostrato che il NO prodotto da iNOS neutralizza i radicali superossido, riducendo la formazione di ROS, come il perossido di idrogeno o i radicali idrossilici [220], [221]. Inoltre, evidenze sperimentali indicano che il NO stesso può agire come regolatore negativo della via NF- κ B, inibendo la fosforilazione e degradazione di I κ B α , limitando così l'attivazione trascrizionale di geni pro-infiammatori [222].

Nelle nostre condizioni sperimentali, l'analisi proteica dei livelli proteici di iNOS ha mostrato un comportamento inaspettato. In condizioni di stress acuto (4 ore), non è stata osservata up-regulation di iNOS nel gruppo controllo trattato con EtOH in assenza di siero. Tuttavia, va considerato che, quando la quasi totalità della popolazione cellulare è in apoptosi – come

mostrato dai risultati del test TUNEL già dopo 4 ore – il segnale proteico riflette principalmente le cellule residue, rendendo difficile interpretare con precisione l'espressione di marker a breve emivita come iNOS, che potrebbe essere stato già degradato a valle del processo apoptotico. Di contro, dopo 24 ore, l'espressione di iNOS è risultata aumentata in modo significativo sia nel gruppo controllo basale che nei campioni pretrattati con BSE, rispetto al controllo trattato con EtOH in assenza di siero. In particolare, l'incremento osservato nei gruppi trattati con BSE potrebbe riflettere l'attivazione di una risposta redox adattativa, piuttosto che un danno di natura pro-ossidante. Considerando l'effetto antinfiammatorio precedentemente descritto per BSE – testimoniato dalla down-regulation di COX-2 e dalla soppressione dell'attivazione di NF- κ B – è verosimile ipotizzare che l'induzione di iNOS osservata a 24 ore, faccia parte di un circuito protettivo compensatorio, volto a sostenere l'omeostasi redox e a limitare l'infiammazione cronica, tramite meccanismi di feedback negativi sulla stessa via NF- κ B. Nonostante queste considerazioni, non si può escludere con assoluta certezza che l'incremento indotto dal pretrattamento con BSE possa riflettere un possibile contributo pro-ossidante. Ulteriori indagini saranno pertanto necessarie per chiarire con maggiore precisione il ruolo funzionale di iNOS nel contesto dell'azione di BSE.

Per valutare in maniera integrata il potenziale antiossidante dell'estratto di *Boswellia sacra*, contro lo stress ossidativo applicato nei nostri modelli, è stato adottato un approccio combinato che comprende sia saggi colorimetrici in soluzione (ABTS, DPPH, FRAP), sia analisi molecolari relativi all'attivazione di Nrf2 mediante Western blot. Nei saggi spettrofotometrici in soluzione, l'attività riducente di BSE è risultata moderata. I valori di ABTS e DPPH ottenuti per BSE sono risultati inferiori (ABTS) o sostanzialmente comparabili (DPPH) a quelli riportati in recenti studi per la polvere di incenso di *Boswellia serrata*, mentre l'attività metallo-riducente (FRAP) si colloca su valori più elevati [223]. D'altra parte, il potenziale antiossidante degli estratti vegetali è generalmente correlato al contenuto di polifenoli, che nelle resine è notoriamente limitato. È quindi plausibile che la ridotta presenza di composti fenolici in BSE sia responsabile della scarsa efficienza antiradicalica. Va inoltre considerato che il profilo fitochimico degli estratti delle specie di *Boswellia*, può variare considerevolmente in funzione del metodo di estrazione, della cultivar, dell'area geografica di raccolta [68], [84]. Di conseguenza, tali variabili concorrono a giustificare le differenze osservate nell'attività riducente degli estratti delle diverse specie di *Boswellia*.

L'analisi molecolare ha evidenziato un incremento significativo dei livelli di Nrf2 in seguito al trattamento con BSE. In condizioni fisiologiche, la sua attività è repressa dal legame con Keap1

nel citoplasma; in risposta a stimoli ossidativi, Nrf2 si libera dal complesso citosolico, trasloca nel nucleo e attiva geni che contrastano lo stress ossidativo [224]. Nei nostri esperimenti, il pretrattamento con BSE ha indotto un incremento dei livelli di Nrf2, particolarmente evidente alla dose intermedia già dopo 4 ore, suggerendo un possibile effetto di rapido condizionamento volto a contenere la produzione di ROS. Tale attivazione, pur risultando attenuata, rimane rilevabile anche a 24 ore. Dunque, l'attività riducente relativamente modesta rilevata nei saggi colorimetrici, si traduce in un effetto in un contesto biologico. L'effetto antiossidante di BSE è in linea con varie evidenze presenti in letteratura che riconoscono agli acidi boswellici, e in particolare all'AKBA, un ruolo chiave nella regolazione della via Nrf2 [225]–[227].

È interessante notare che, a 24 ore, i livelli di Nrf2 aumentano in modo significativo nel gruppo pretrattato con BSE e successivamente incubato in condizioni di singolo stress nutrizionale, ovvero soltanto in medium privo di siero. Questo dato suggerisce che, in condizioni di stress metabolico isolato, la risposta antiossidante attivata dal trattamento con BSE può essere più efficace o sostenuta rispetto a quanto avviene in presenza di uno stress ossidativo più severo, come quello indotto dall'associazione di stress ossidativo e nutrizionale.

Sebbene la scelta iniziale fosse stata diretta ad esplorare la tipologia di stress più severa data dall'associazione di stress ossidativo e nutrizionale, nell'analisi Western l'inserimento di un gruppo sperimentale che valuta il pretrattamento di BSE seguito da co-incubazione in condizioni di stress nutrizionale isolato, è stato pensato per confrontare gli effetti del trattamento in risposta a un singolo stimolo stressogeno. Sebbene in tali condizioni non era stato osservato un rilevante effetto citoprotettivo da parte di BSE, questa scelta permette di verificare se il BSE agisce come modulatore preventivo, attivando meccanismi difensivi in risposta a uno stress moderato, oltre che come agente citoprotettivo attivo in condizioni di danno conclamato. Valutando congiuntamente i risultati, la citoprotezione mediata dal pretrattamento con BSE nei nostri modelli di stress combinato, non è riconducibile a un meccanismo isolato; con specifico riferimento al modello di stress che associa il danno indotto da etanolo con la privazione di siero, coinvolge la modulazione di sistemi antiossidanti, in sinergia con gli effetti anti-apoptotici e antinfiammatori già descritti.

4.6 LIMITI DELLO STUDIO

I risultati di vitalità cellulare (saggi MTT) hanno guidato la selezione di due modelli di stress combinato, utilizzati per approfondire i meccanismi molecolari coinvolti nell'effetto citoprotettivo dell'estratto di *Boswellia sacra*. I modelli selezionati sono di seguito riportati:

- a) stress ossidativo indotto da 400 μ M H₂O₂ associato a stress nutrizionale;
- b) stress ossidativo indotto da 2% v/v EtOH associato a stress nutrizionale.

I risultati dei saggi di MTT hanno evidenziato una protezione più marcata da parte dell'estratto nel modello con H₂O₂ (a) rispetto a quello con EtOH (b). Per entrambi i modelli è stata quindi analizzata la frammentazione del DNA, mentre le analisi proteiche (Western blot) sono state eseguite e riportate unicamente per il modello con EtOH (b). La valutazione della risposta autofagica, apoptotica, infiammatoria e ossidativa in astrociti sottoposti a stress combinato nel modello con H₂O₂ (a), sono attualmente in corso.

È importante sottolineare che l'assenza di dati proteici relativi alla serie con H₂O₂ (a), non invalida le osservazioni fin qui discusse, ma limita la possibilità di attribuire, con certezza molecolare, le differenze di efficacia osservate tra i due modelli.

In termini interpretativi, è verosimile che i profili di risposta cellulare siano differenti in quanto riflettono le caratteristiche intrinseche dei due modelli di stress. L'H₂O₂ induce un danno ossidativo diretto, caratterizzato da produzione diretta di ROS e conseguente danno a lipidi, proteine e DNA; mentre l'EtOH genera ROS indirettamente, modulando vie metaboliche e di segnalazione che possono richiedere tempistiche di risposta cellulare differenti. Tali differenze nei meccanismi di azione possono contribuire a spiegare perché l'effetto protettivo di BSE risulti più evidente nel modello con H₂O₂ (relativamente ai risultati ottenuti dal test di vitalità), pur in assenza di conferme molecolari. Allo stesso tempo, esse potrebbero giustificare l'eterogeneità dei risultati ottenuti nelle analisi molecolari condotte nel modello con EtOH (b), che, per alcuni marker, si sono rivelati più complessi da interpretare.

4.7 CONCLUSIONI

Collettivamente, nello studio, è stato dimostrato che l'estratto della resina di *Boswellia sacra* esercita una notevole azione citoprotettiva contro la morte cellulare indotta da condizioni di stress multifattoriale, derivato dalla combinazione di stress ossidativo e deprivazione di nutrienti, agendo attraverso meccanismi interconnessi. In particolare, il pretrattamento con l'estratto inibisce direttamente la cascata apoptotica, come dimostrato dalla riduzione dell'attivazione della caspasi-7 e dall'inibizione della frammentazione del DNA. Parallelamente, l'estratto modula il processo autofagico, promuovendone il flusso nelle fasi iniziali di stress e limitandone l'attivazione protratta, mentre attiva la via antiossidante mediata da Nrf2 e regola la risposta infiammatoria tramite l'inibizione dell'espressione di NF- κ B e

COX-2. La combinazione di effetti antiossidanti, anti-apoptotici, antinfiammatori e di regolazione dell'autofagia, osservata nel modello di stress indotto da etanolo e privazione di siero, suggerisce un'azione protettiva sinergica dell'estratto, che aumenta la resilienza degli astrociti agli insulti citotossici.

Sebbene siano necessari ulteriori approfondimenti, le evidenze raccolte supportano l'ipotesi che la resina di *Boswellia sacra* possa rappresentare un potenziale candidato per lo sviluppo di formulazioni nutraceutiche mirate alla prevenzione del danno neuronale e, più in generale, al mantenimento della salute cerebrale.

I dati presentati nel Capitolo 4 sono attualmente in fase di preparazione per la pubblicazione di un articolo scientifico.

Inoltre, una parte dei risultati è stata oggetto di presentazione sotto forma di videoposter al 97° Congresso SIBS tenutosi a Palermo dal 10 al 13 aprile 2025, con il titolo:

- “Multifactorial neuroprotective mechanisms of *Boswellia sacra* in astrocytes under oxidative and nutritional stress”
Vermiglio, A., **La Rosa, L.**, Chiarelli, R., Serio, G., Asteggiano, A., Occhipinti, A., Di Liegro, I., Schiera G., Gentile, C.

CAPITOLO 5

Potenziale condroprotettivo dell'estratto e delle frazioni purificate di *Boswellia sacra* su condrociti primari umani in un modello *in vitro* di osteoartrite

5.1 CONTESTO FISIOPATOLOGICO

5.1.1 Meccanismi patogenetici e rilevanza clinica dell'osteoartrite

Le patologie osteoarticolari comprendono un insieme eterogeneo di condizioni cronico-degenerative che compromettono significativamente la qualità della vita [228]. Tra queste, l'osteoartrite (OA) rappresenta la forma più diffusa e invalidante, caratterizzata da degradazione progressiva della matrice cartilaginea, infiammazione sinoviale e alterazioni biomeccaniche dell'articolazione [229], [230]. La malattia colpisce oltre 500 milioni di persone a livello globale, manifestandosi prevalentemente dopo i 60 anni e con un'incidenza in costante aumento con l'avanzare dell'età [231].

Dal punto di vista molecolare, la patogenesi dell'OA, sebbene ancora non pienamente compresa, è mediata da uno squilibrio citochinico che altera l'omeostasi dei condrociti, le uniche cellule residenti nella cartilagine matura. I condrociti, infatti, in condizioni fisiologiche mantengono un equilibrio dinamico tra sintesi e degradazione dei componenti della matrice extracellulare (ECM); l'alterazione di questo equilibrio comporta attivazione infiammatoria, stress ossidativo, riduzione dei processi anabolici e, infine, apoptosi cellulare [232].

Una rete complessa di citochine pro-infiammatorie non solo avvia, ma contribuisce alla perpetuazione del danno artrosico [233]. Mediatori chiave come IL-1 β , TNF- α e IL-6, insieme a chemochine e mediatori lipidici (prostaglandine, leucotrieni) secreti da condrociti, cellule sinoviali, macrofagi infiltranti e altre cellule immunitarie, promuovono la degradazione della cartilaginee e l'infiammazione [219],[220]. In particolare, IL-1 β e TNF- α inducono la distruzione della cartilagine articolare, stimolando la produzione di metalloproteinasi della matrice (MMP-1, MMP-9, MMP-13), prostaglandina E₂ (PGE₂), NO e ulteriori citochine pro-infiammatorie (IL-6 e IL-8), mentre inibiscono la sintesi di principali componenti della ECM cartilaginea, come aggregano e collagene di tipo II [236], [237].

Le attuali strategie terapeutiche sono principalmente sintomatiche, basate sull'impiego di farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) o inibitori selettivi della COX-2, che alleviano dolore e infiammazione senza modificare la progressione della malattia. L'uso cronico di tali farmaci è associato a importanti effetti collaterali gastrointestinali e cardiovascolari [238], [239]. Pertanto, negli ultimi decenni, crescente attenzione è stata rivolta anche agli interventi non farmacologici, come la dieta, l'integrazione nutraceutica e l'attività fisica, che hanno mostrato un potenziale nel modulare la risposta infiammatoria e rallentare la progressione dell'OA [240].

5.2 STATO DELL'ARTE E RAZIONALE DELLO STUDIO

Nel trattamento di disturbi articolari, l'interesse verso composti di origine naturale dotati di proprietà antinfiammatorie e condroprotettive è in costante crescita [241], [242]. Evidenze cliniche e precliniche indicano che l'assunzione di specifici prodotti nutraceutici – a base di glucosamina, collagene idrolizzato, acidi grassi omega-3 o estratti vegetali della curcuma, zenzero, aglio e capsaicina – possa contribuire alla riduzione del dolore e al miglioramento della funzionalità articolare [243]. Diversi studi hanno valutato l'efficacia di estratti standardizzati di *Boswellia* o dei suoi composti bioattivi isolati, nel rallentamento della progressione della malattia [244], [245].

Tuttavia, la letteratura disponibile si concentra su modelli preclinici murini, mentre restano relativamente scarsi i dati su condrociti primari umani. Questi ultimi rappresentano un sistema fisiologicamente più rilevante, in quanto permettono di valutare in maniera diretta l'effetto dei composti sulla popolazione cellulare principalmente coinvolta nel danno articolare.

Alla luce di queste considerazioni, il presente studio si propone di contribuire al superamento di tale gap conoscitivo, valutando l'effetto di estratti di *Boswellia sacra* in un modello *in vitro* di osteoartrite, basato su condrociti primari umani sottoposti a stimolo infiammatorio. L'obiettivo è chiarirne l'efficacia come approccio preventivo e di supporto nella gestione dell'osteoartrite.

5.3 MATERIALI E METODI

5.3.1 Preparazione degli estratti di *Boswellia sacra*

5.3.1.1 Estratto della resina di *Boswellia sacra*

L'estratto di *Boswellia sacra* utilizzato in questo studio, denominato *Boswellia Sacra Extract* (BSE), è stato preparato a partire da un semilavorato ricavato dalla resina appartenente allo stesso lotto di produzione utilizzato per la preparazione dell'estratto descritto nel Capitolo 4.

Il semilavorato essiccato è stato quindi solubilizzato in DMSO e conservato a -20°C fino alle analisi biologiche.

5.3.1.2 Estratto arricchito in cembreni

La frazione arricchita in cembreni, denominata Cembrane Extract (CE), è stata preparata presso i laboratori di Abel Nutraceuticals, a partire dal semilavorato di *B. sacra* (la cui caratterizzazione chimica è riportata in Tabella 10, nella sezione Risultati del Capitolo 4, al paragrafo 4.4.1).

Il semilavorato è stato sottoposto a un processo di purificazione sequenziale volto a rimuovere la componente acida; il procedimento ha previsto una precipitazione basica iniziale, seguita da una purificazione su ossido di alluminio e da una cromatografia su gel di silice, monitorata mediante analisi su cromatografia su strato sottile (TLC). La frazione CE così ottenuta è stata fornita da Abel Nutraceuticals, unitamente ai dati di caratterizzazione chimica riportati in Tabella 13, nella successiva sezione dei Risultati. La titolazione dei principali composti bioattivi presenti nelle frazioni isolate e raccolte è stata eseguita secondo le metodiche riportate nel paragrafo 5.3.2.

5.3.2 Caratterizzazione chimica di CE

Per l'analisi dei composti neutri e a basso punto di ebollizione è stato impiegato un approccio combinato GC-MS/FID, basato su un metodo precedentemente pubblicato e validato dal Dott. Asteggiano [159]. La GC-MS è stata utilizzata per l'identificazione preliminare dei principali composti mediante confronto con la libreria NIST 20 e con gli indici di ritenzione lineare (LRI), mentre il GC-FID, grazie alla sua elevata linearità di risposta, è stato impiegato per la quantificazione, utilizzando miscele standard di terpeni.

Parallelamente, è stata eseguita un'analisi HPLC con rivelatore UV-VIS per verificare il contenuto degli acidi boswellici.

5.3.3 Coltura cellulare e trattamento delle cellule HCH

La cultura di condrociti primari umani (Human Chondrocytes, HCH) è stata acquistata da PromoCell (Heidelberg, Germania). Le cellule sono state isolate dalla cartilagine articolare umana normale delle articolazioni del ginocchio e dell'anca e coltivate in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, Italia), integrato con 10% di siero bovino fetale (FBS) (Euroclone, Italia), 100 U/ml penicillina e 100 µg/ml streptomicina (Sigma-Aldrich, Italia) e 2 mM di L-glutammina (Gibco-Invitrogen, Eggenstein, Germania). Le colture cellulari sono state mantenute a 37 °C in incubatore al 5% di CO₂.

Per stabilire il modello *in vitro* di infiammazione simil-OA, le cellule HCH sono state pretrattate con diverse concentrazioni di BSE per 24 ore, quindi co-incubate con IL-1 β 20 ng/ml (PeproTech/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in DMEM integrato con il 2% v/v FBS, per ulteriori 24 o 72 ore.

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando le cellule HCH ai passaggi compresi fra 5 e 11.

5.3.4 Saggio di vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata mediante il saggio luminescente CellTiter-Glo® (Promega Corporation, Madison, WI, USA), che quantifica i livelli intracellulari di ATP come indice dell'attività metabolica, seguendo le istruzioni del produttore. In breve, le cellule HCH sono state seminate a una densità di 3×10^3 cellule/pozzetto in piastre bianche da 96 pozzetti (Corning, Corning, NY, USA) e mantenute in coltura per 24 ore prima del trattamento. Le cellule sono state quindi esposte a concentrazioni crescenti di BSE per ulteriori 24 ore. L'intervallo di concentrazione di BSE testato era compreso fra 1 e 250 μ g BSE/ml medium cellulare.

Le soluzioni a concentrazioni crescenti di BSE sono state ottenute diluendo la soluzione stock in DMSO in adeguati volumi di terreno di coltura. La concentrazione finale di DMSO non ha mai superato lo 0,25% (v/v). Per controllare eventuali effetti aspecifici del solvente, le cellule di controllo sono state trattate con terreno contenente DMSO allo 0,25% (v/v).

Al termine del tempo di incubazione, è stato aggiunto il reagente CellTiter-Glo® (1:1, v/v) e i segnali luminescenti sono stati registrati mediante lettore di micropiastre (FilterMax F5, Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices). I risultati sono stati espressi come percentuale di vitalità relativa, normalizzando i valori delle cellule trattate rispetto al controllo non trattato, la cui vitalità è stata considerata pari al 100%.

5.3.5 Rilevamento di IL-6, ROS, TNF- α

La rilevazione delle citochine pro-infiammatorie IL-6, ROS e TNF- α , è stata misurata mediante kit in luminescenza (Promega, USA). Il test è stato eseguito seguendo il protocollo fornito dal fornitore.

5.3.6 Saggi ELISA

Il surnatante cellulare è stato raccolto e utilizzato per determinare i livelli di IL-8, MMP-9 e MMP-13, utilizzando specifici kit ELISA (ELK Biotechnology, China; Sigma-Aldrich, USA; Thermo Fisher Scientific, USA), secondo le istruzioni del produttore. Con un lettore di micropiastre, i valori di densità ottica sono stati determinati a 450 nm.

5.3.7 Analisi statistiche

I dati sono presentati come media $\pm$ SD o $\pm$ SEM. La distribuzione dei dati è stata preliminarmente valutata mediante il test di Shapiro-Wilk per verificarne la normalità. Nei casi in cui i dati presentavano distribuzioni approssimativamente normali e varianze omogenee, la significatività statistica dei diversi gruppi è stata analizzata utilizzando l'analisi della varianza a una via (ANOVA) con test post-hoc di Dunnett. Se i dati non rispettavano la normalità, è stato applicato il test non parametrico di Kruskal-Wallis seguito da confronti multipli con il metodo di Dunn. Le analisi sono state effettuate utilizzando il software GraphPad Prism. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato significativo.

I dati sperimentali presentati nella sezione Materiali e Metodi, da cui derivano i risultati delle sezioni successive, sono stati raccolti durante il terzo anno di dottorato. In questo periodo, tutte le attività descritte sono state svolte durante il periodo di *PhD visiting* presso l'azienda Abel Nutraceuticals e il Laboratorio di Angiogenesi Cellulare e Molecolare del Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi (DBios) dell'Università degli studi di Torino.

5.4 RISULTATI

5.4.1 Caratterizzazione chimica della frazione arricchita in cembreni

I risultati della caratterizzazione, ottenuti dal lavoro condotto dal dott. Asteggiano, sono riportati in Tabella 13. L'analisi sull'estratto arricchito in cembreni (CE) ha confermato che la frazione è costituita da composti diterpenici di tipo cembrenico, con una purezza pari al 78,6%. Il confronto con gli standard analitici degli acidi boswellici ha permesso di verificare in modo diretto l'assenza della frazione acida, confermando l'efficacia del processo di purificazione impiegato.

Tabella 13. Caratterizzazione quali-quantitativa dei composti bioattivi della frazione arricchita in cembreni.

Composto	Contenuto % (p/p) in CE
HPLC-MS/PDA	
KBA	—
AKBA	—
α -BA	—
β -BA	—
A α BA	—
A β BA	—
GS-MS/FID	
Serratolo	9,08
Incensolo	8,9
Iso-serratolo	60,6

Abbreviazioni: CE: Cembrane Extract; AKBA: acido 3-O-acetil-11-cheto- β -boswellico; KBA: acido 11-cheto- β -boswellico; α -BA e β -BA: acido α e β -boswellico; A α BA e A β BA: acido 3-O-acetil- α e β -boswellico. Simbolo: — non determinato.

5.4.2 Effetti di BSE sulla vitalità delle cellule HCH in condizioni standard e nel modello di OA

In condizioni standard, gli effetti di BSE sulla vitalità cellulare sono stati valutati, tramite saggio Cell-Titer Glo, trattando le cellule HCH con concentrazioni crescenti di BSE (1–250 μ g/ml) per 24 ore. Come riportato in Figura 28A, il trattamento con BSE ha determinato un effetto citotossico significativo a partire da 16 μ g/ml, mentre concentrazioni inferiori non hanno determinato variazioni significative della vitalità cellulare. Sulla base di tali risultati, le

concentrazioni di 2, 4 e 8 $\mu\text{g/ml}$ sono state selezionate come ottimali da impiegare negli esperimenti successivi.

Nel modello OA, la stimolazione infiammatoria con IL-1 β ha determinato una riduzione significativa della vitalità cellulare, pari a circa il 20% rispetto al gruppo controllo ($p < 0,01$). Il pretrattamento con BSE ha parzialmente contrastato tale effetto, determinando un recupero della vitalità cellulare pari al 16,4% alla concentrazione di 2 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,01$) e del 22,7% a 4 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,001$) (Figura 28B). A 8 $\mu\text{g/ml}$, l'incremento osservato è stato più contenuto (+6,3%) e non statisticamente significativo, suggerendo un'azione protettiva non chiaramente dose-dipendente.

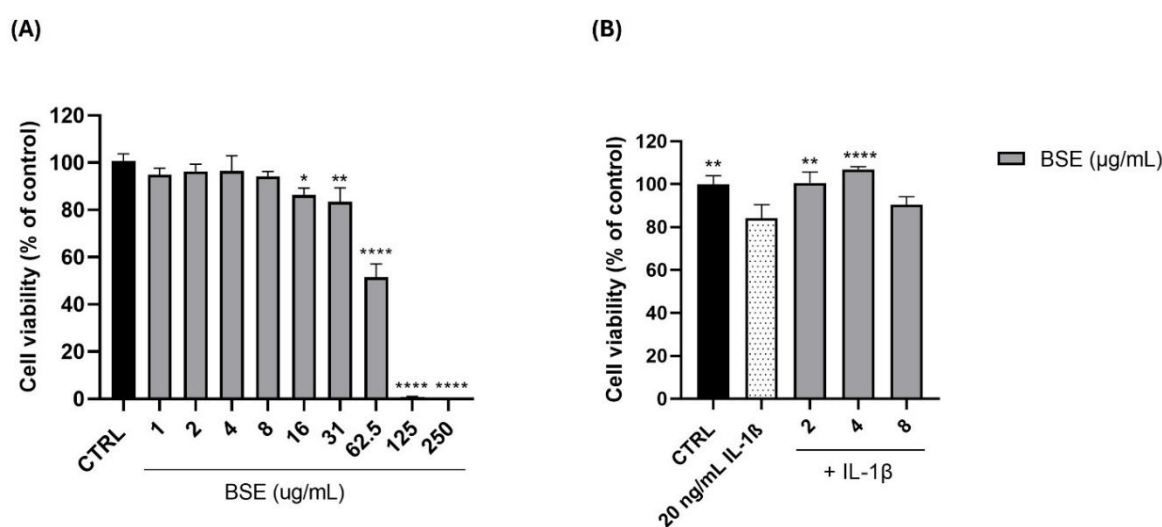


Figura 28. Effetti del trattamento con l'estratto di *Boswellia sacra* (BSE) sulla vitalità delle cellule HCH in condizioni standard e nel modello di osteoartrite. (A) Le cellule HCH sono state trattate in assenza di trattamenti aggiuntivi (CTRL) oppure trattate con varie concentrazioni di BSE (0–250 $\mu\text{g/ml}$) per 24 ore. **(B)** Le cellule HCH sono state incubate in assenza di trattamenti aggiuntivi (CTRL), preincubate in assenza di trattamenti aggiuntivi e successivamente incubate per 72 ore con 20 ng/ml di IL-1 β , oppure preincubate per 24 ore in presenza di diversa concentrazione di BSE (2, 4 e 8 $\mu\text{g/ml}$), e successivamente co-incubate per 72 ore con 20 ng/ml di IL-1 β . Tutti i valori per gruppo sono espressi come media ($\pm$ SD), $n=3$. I dati sono stati analizzati con l'analisi della varianza a una via (ANOVA) con test post-hoc di Dunnett: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ rispetto al gruppo di controllo (CTRL) oppure rispetto al gruppo IL-1 β (B).

5.4.3 Effetti di BSE sulla risposta infiammatoria e sullo stress ossidativo nel modello di OA

Sono stati valutati gli effetti di BSE sull'espressione dei marcatori infiammatori IL-6, IL-8 e TNF- α , nonché sulla produzione di ROS, utilizzando saggi in luminescenza ed ELISA (Figura 29A-C).

A tal fine, le cellule HCH sono state pretrattate per 24 ore in presenza di BSE e successivamente co-incubate con IL-1 β (20 ng/ml) per 24 ore. La stimolazione con IL-1 β ha determinato un marcato incremento del segnale ELISA relativo a IL-6, con valori circa 166 volte superiori

rispetto al gruppo controllo ($p < 0,001$). Il pretrattamento con BSE ha ridotto significativamente questo aumento, pur senza un andamento dose-dipendente, con il maggiore effetto osservato alla concentrazione intermedia (riduzione di circa 3 volte rispetto al gruppo trattato con IL-1 β) (Figura 29A).

Per quanto riguarda TNF- α , la stimolazione con IL-1 β ne ha determinato un incremento significativo, pari a circa 1,9 volte rispetto al controllo ($p < 0,001$). Il pretrattamento con BSE ha attenuato tale induzione, sebbene senza una chiara dipendenza dalla dose. L'effetto più pronunciato è stato osservato alla concentrazione di 4 $\mu\text{g/ml}$, con una diminuzione di circa 1,4 volte rispetto al controllo trattato con IL-1 β ($p < 0,05$) (Figura 29B). Sebbene l'entità della riduzione risulti meno marcata rispetto a quanto rilevato per IL-6, i dati confermano un'azione inibitoria di BSE anche su questo asse infiammatorio, caratterizzata dal medesimo andamento non dose-dipendente.

Contrariamente, IL-8 non ha mostrato variazioni significative in risposta a IL-1 β , di conseguenza non è stata apprezzabile un'influenza da parte del BSE (Figura 29C).

Lo stress ossidativo è stato indotto mediante trattamento con 10 μM 2-metil-1,4-naftochinone (menadione) per 2 ore, e successiva analisi in luminescenza. Tale trattamento ha prodotto un incremento significativo dei livelli di ROS, pari a 8,9 volte rispetto al controllo ($p < 0,0001$). Il pretrattamento con BSE ha attenuato tale aumento, con l'effetto più marcato osservato alla dose intermedia, che ha determinato una riduzione di circa 1,4 volte rispetto al gruppo trattato con IL-1 β ($p < 0,001$) (Figura 30).

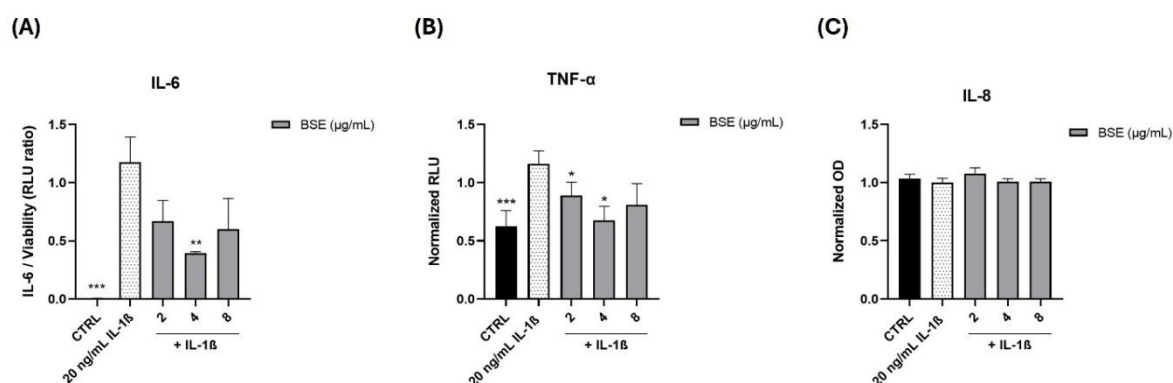


Figura 29. Effetti del pretrattamento con l'estratto di *Boswellia sacra* (BSE) sulla produzione di marcatori infiammatori indotti dal trattamento con IL-1 β nelle cellule HCH. Le cellule HCH sono state incubate in assenza di trattamenti aggiuntivi (CTRL), preincubate in assenza di trattamenti aggiuntivi e successivamente incubate per 24 ore con 20 ng/mL di IL-1 β , oppure preincubate per 24 ore in presenza di diversa concentrazione di BSE (2, 4 e 8 μ g/ml), e successivamente co-incubate per 24 ore con 20 ng/ml di IL-1 β . I livelli relativi di IL-6 (A), TNF- α (B) e IL-8 (C) sono stati determinati utilizzando kit commerciali specifici. I valori di assorbanza (OD) per IL-8 sono stati misurati a 450 nm e normalizzati rispetto al gruppo IL-1 β . I dati di luminescenza relativi a TNF- α sono stati espressi in unità di luminescenza relativa (RLU) e anch'essi normalizzati rispetto al gruppo IL-1 β . Tutti i valori per gruppo sono espressi come media ($\pm$ SD). L'analisi statistica è stata eseguita l'analisi della varianza a una via (ANOVA) con test post-hoc di Dunnett: * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ rispetto al gruppo IL-1 β .

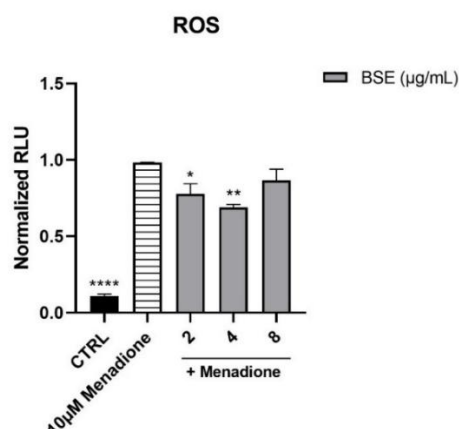


Figura 30. Effetti del pretrattamento con l'estratto di *Boswellia sacra* (BSE) sulla produzione di ROS indotta dal trattamento con il menadione nelle cellule HCH. Le cellule HCH sono state incubate in assenza di trattamenti aggiuntivi (CTRL), preincubate in assenza di trattamenti aggiuntivi e successivamente incubate per 2 ore con 10 μ M Menadione, oppure preincubate per 24 ore in presenza di diversa concentrazione di BSE (2, 4 e 8 μ g/ml), e successivamente co-incubate per 2 ore con 10 μ M Menadione. I livelli relativi di ROS intracellulari sono stati determinati utilizzando kit commerciale basato su luminescenza. I valori ottenuti sono stati espressi in unità di luminescenza relativa (RLU) e normalizzati rispetto al gruppo IL-1 β . Tutti i valori per gruppo sono espressi come media ($\pm$ SD). L'analisi statistica è stata eseguita l'analisi della varianza a una via (ANOVA) con test post-hoc di Dunnett: * $p < 0,05$, ** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ rispetto al gruppo controllo Menadione.

5.4.3.1 Effetto delle singole frazioni purificate dall'estratto di *B. sacra* sulla produzione di IL-6 nel modello di OA

Per approfondire l'attività antinfiammatoria di BSE, è stata valutata l'azione delle sue principali frazioni purificate sulla produzione di IL-6 indotta da IL-1 β . In particolare, sono state testate la

frazione contenente acidi boswellici (Boswellic Acid Extract, BAE) – anch'essa preparata e fornita da Abel Nutraceuticals – e l'estratto arricchito in cembreni (CE).

Le concentrazioni di BAE e di CE sono state calcolate in proporzione alla loro abbondanza relativa nell'estratto totale BSE, costituito per l'83% p/p da acidi boswellici triterpenici e per il 17% p/p da diterpeni cembrenici (Tabella 11, sezione Risultati del Capitolo 4). Le concentrazioni testate di ciascuna frazione corrispondono alle quantità presenti in 2, 4 e 8 µg/ml di BSE.

Nelle condizioni sperimentali adottate, la stimolazione con IL-1 β ha determinato un incremento dei livelli di IL-6, pari a circa 158 volte rispetto al gruppo controllo. La frazione CE non ha mostrato un effetto apprezzabile, mentre la frazione BAE ha mostrato una significativa attività inibitoria, con un effetto dose-dipendente: riduzione di circa 2 volte alla concentrazione di 1,7 µg/ml, 3,8 volte a 3,3 µg/ml e 8,8 volte a 6,6 µg/ml rispetto al controllo trattato con IL-1 β (Figura 31).

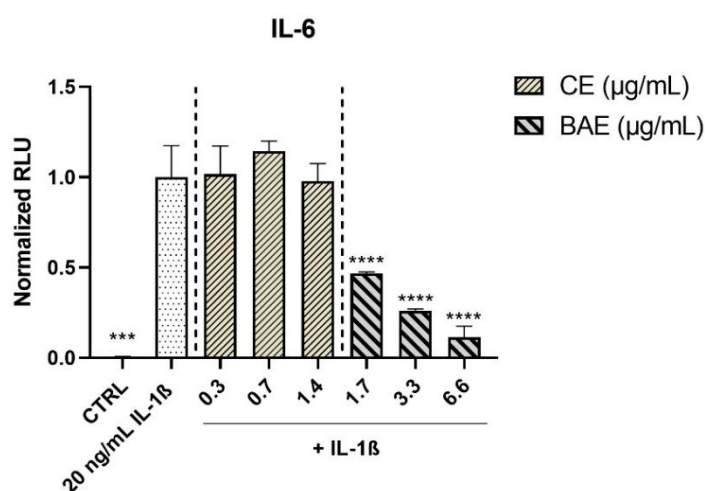


Figura 31. Effetti del pretrattamento con le singole frazioni purificate dall'estratto di *Boswellia sacra* sulla produzione di IL-6 indotta dal trattamento con IL-1 β nelle cellule HCH. Le cellule HCH sono state incubate in assenza di trattamenti aggiuntivi (CTRL), preincubate in assenza di trattamenti aggiuntivi e successivamente incubate per 24 ore con 20 ng/mL di IL-1 β , oppure preincubate per 24 ore in presenza di diversa concentrazione degli estratti e successivamente co-incubate per 24 ore con 20 ng/ml di IL-1 β . I livelli di IL-6 sono stati quantificati mediante saggi commerciali basati su luminescenza. I valori ottenuti sono stati espressi come unità di luminescenza relativa (RLU) e normalizzati rispetto al gruppo trattato con IL-1 β . I dati sono riportati come media $\pm$ deviazione standard (SD) per ciascun gruppo. L'analisi statistica è stata eseguita mediante ANOVA a una via, seguita da test post-hoc di Dunnett per il confronto con il gruppo IL-1 β : *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

5.4.4 Effetti di BSE sull'espressione delle metalloproteinasi nel modello di OA

Considerata la funzione cruciale delle MMP nella degradazione della cartilagine, sono stati valutati gli effetti di BSE sulle MMP-9 e MMP-13 nelle cellule HCH stimulate con IL-1 β ,

mediante saggio ELISA. La stimolazione con IL-1 β ha determinato un aumento significativo del segnale relativo alla MMP-13, corrispondente a un incremento di circa 3,6 volte rispetto al gruppo controllo ($p < 0,05$). Il pretrattamento con BSE ha ridotto i livelli di MMP-13 rispetto allo stimolo a tutte le concentrazioni testate, con una riduzione pari a 1,4, 1,8 e 1,5 volte rispettivamente alle concentrazioni di 2, 4 e 8 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 32A). Al contrario, l'induzione di MMP-9 da parte di IL-1 β è risultata assente e i relativi livelli osservati nei campioni trattati con BSE sono rimasti prossimi ai valori basali (Figura 32B).

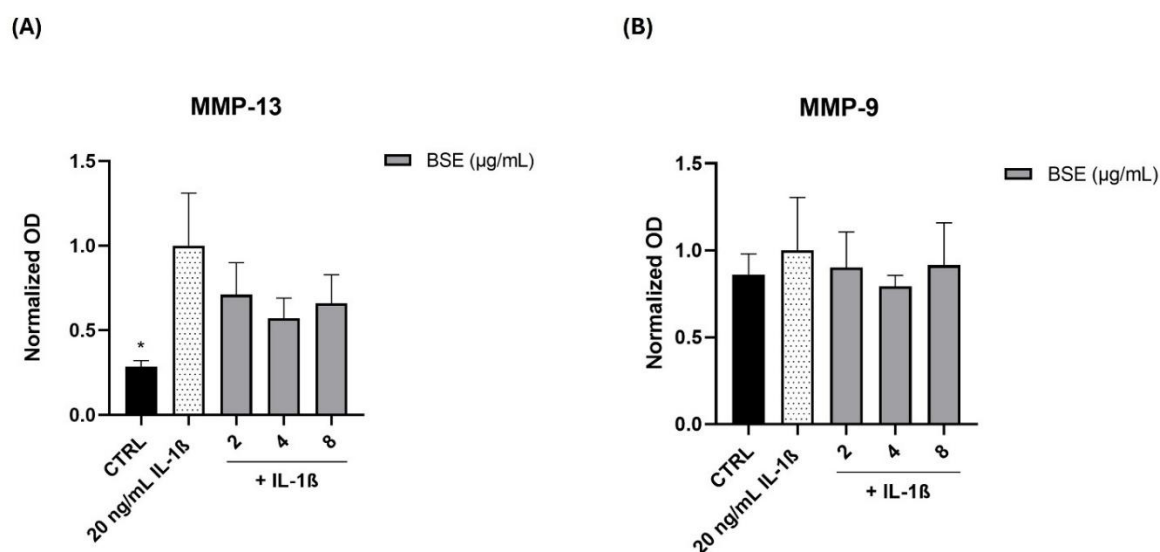


Figura 32. Effetti del pretrattamento con l'estratto di *Boswellia sacra* (BSE) sulla produzione di MMP-13 e MMP-9 indotti dal trattamento con IL-1 β nelle cellule HCH. Le cellule HCH sono state incubate in assenza di trattamenti aggiuntivi (CTRL), preincubate in assenza di trattamenti aggiuntivi e successivamente incubate per 24 ore con 20 ng/mL di IL-1 β , oppure preincubate per 24 ore in presenza di diversa concentrazione di BSE (2, 4 e 8 $\mu\text{g/ml}$), e successivamente co-incubate per 24 ore con 20 ng/ml di IL-1 β . La produzione di MMP-13 (A) e MMP-9 (B) nel surnatante cellulare è stata determinata mediante saggio ELISA. Tutti i valori per gruppo sono espressi come media ($\pm$ SEM), $n=2$. I valori di assorbanza (OD) sono stati misurati a 450 nm e normalizzati rispetto al gruppo IL-1 β . L'analisi statistica è stata eseguita mediante il test non parametrico di Kruskal-Wallis seguito da confronti multipli con il metodo di Dunn: * $p < 0,05$ rispetto al gruppo trattato con IL-1 β .

5.5 DISCUSSIONE

L'osteoartrite (OA) è una patologia degenerativa complessa, caratterizzata da un microambiente infiammatorio e ossidativo che promuove la progressiva degradazione della matrice cartilaginea. In condizioni fisiologiche, i condrociti mantengono un equilibrio dinamico tra la sintesi e la degradazione dei componenti della ECM [232]. L'OA si sviluppa quando questo equilibrio viene alterato, con conseguente iperproduzione di citochine pro-infiammatorie (es.

IL-1 β , TNF- α , IL-6), specie reattive dell'ossigeno e metalloproteinasi che accelerano la distruzione della cartilagine.

In questo quadro, l'obiettivo del presente studio mirava a valutare il potenziale effetto protettivo di estratti standardizzati di *Boswellia sacra*, in un modello *in vitro* di osteoartrite costituito da condrociti primari umani sottoposti a stimolazione infiammatoria con IL-1 β . In particolare, poiché la stretta interconnessione tra infiammazione e stress ossidativo concorre in maniera determinante alla degradazione cartilaginea, abbiamo analizzato la capacità di BSE e delle sue principali frazioni purificate, di modulare i mediatori infiammatori chiave coinvolti in questo processo, monitorando in parallelo la produzione di ROS.

Per supportare gli esperimenti biologici, sono state preparate due matrici derivate dalla resina di *Boswellia sacra*. La prima è un estratto di *Boswellia sacra* (BSE), contenente l'intero fitocomplesso della resina, costituito da acidi boswellici e cembreni. La seconda è un estratto arricchito in cembreni (CE), ottenuto attraverso una strategia di purificazione multistep che ha permesso l'eliminazione della componente acida. La caratterizzazione chimica ha confermato la presenza di serratolo, incensolo e iso-serratolo, con una netta predominanza di quest'ultimo; mentre gli acidi boswellici non sono stati rilevati, a conferma dell'efficacia del processo di purificazione adottato.

Nel modello sperimentale di OA, il trattamento con BSE a concentrazioni comprese tra 2 e 8 μ g/ml ha determinato un effetto protettivo sui condrociti umani sottoposti a stimolazione infiammatoria prolungata con IL-1 β , riducendo la perdita di vitalità cellulare, sebbene senza mostrare un chiaro effetto dose-dipendente. Questi risultati sono coerenti con precedenti studi su estratti standardizzati di *Boswellia serrata*, nei quali è stata osservata una modulazione significativa della proliferazione dei condrociti trattati con IL-1 β . [246].

Per quanto riguarda la risposta infiammatoria, considerato che la cinetica di produzione delle citochine infiammatorie mostra variazioni rilevabili già tra le 16-24 ore [247], [248], la scelta di misurare gli endpoint secretori dei mediatori infiammatori dopo 24 ore di trattamento con IL-1 β , ha permesso di intercettare la risposta trascrizionale precoce, minimizzando al contempo i possibili artefatti derivanti da esposizioni prolungate (quali, ad esempio, gli effetti citotossici). Il risultato più significativo promosso dal trattamento con BSE è rappresentato dalla diminuzione relativa del segnale ELISA per IL-6, un mediatore chiave della cascata infiammatoria. Per escludere che questo effetto fosse dovuto a una ridotta vitalità cellulare, i valori di IL-6 sono stati normalizzati rispetto ai corrispondenti valori di vitalità cellulare. Tale

analisi ha permesso di escludere che l'effetto osservato fosse conseguente a una riduzione della sopravvivenza cellulare, indicando invece una modulazione specifica della risposta infiammatoria. In particolare, l'effetto più importante è stato osservato alla dose intermedia, la quale ha ridotto i livelli di IL-6 di circa tre volte rispetto al controllo trattato con IL-1 β . Successivamente, è stato approfondito l'effetto di BSE su questa citochina, testando il contributo delle singole frazioni purificate della resina. La scelta di focalizzare l'analisi solo su IL-6, è stata motivata sia dal fatto che, in questo modello, tale marcatore ha mostrato le variazioni più consistenti in risposta a BSE, sia per il suo ruolo cruciale nella cascata infiammatoria dell'OA. I risultati ottenuti suggeriscono che l'effetto su IL-6 sia attribuibile principalmente agli acidi boswellici, piuttosto che alla frazione cembrenica. Tale ipotesi trova riscontro in un ampio *corpus* di evidenze in letteratura, che attribuiscono ad AKBA e KBA un ruolo chiave nella modulazione della risposta infiammatoria, inclusa l'inibizione della secrezione di citochine proinfiammatorie (IL-6 inclusa), in diversi modelli cellulari [87], [88], [236], [249]–[251]. A supporto di questa interpretazione, si evidenzia che nel nostro semilavorato di *B. sacra*, AKBA e KBA sono contenuti in concentrazioni rispettivamente pari a 9,14% e 1,40% p/p, come determinato tramite analisi HPLC.

Tuttavia, è importante sottolineare che tali risultati non consentono di attribuire esclusivamente alla frazione acida l'effetto di BSE. D'altronde, gli estratti botanici sono miscele complesse e, come spesso osservato, la loro attività biologica può emergere da azioni additive o sinergiche tra i diversi componenti. Studi sistematici su estratti vegetali dimostrano, infatti, che l'attività dell'estratto non frazionato può superare la somma degli effetti dei singoli costituenti, per motivi che vanno dall'interazione molecolare diretta alla modulazione congiunta di specifiche vie di segnalazione cellulare [252].

Alcuni diterpenoidi cembrenici, come l'incensolo e l'incensolo acetato, sono stati descritti come modulatori di canali ionici appartenenti alla famiglia dei recettori TRP (Transient Receptor Potential) e come potenziali regolatori della via di segnalazione del fattore di trascrizione STAT-3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3). Questi meccanismi, pur non essendo direttamente coinvolti nella regolazione della risposta infiammatoria mediata da IL-6, potrebbero contribuire alla modulazione della sua espressione [253], [254]. Pertanto, è plausibile che anche la frazione cembrenica sia coinvolta nell'effetto complessivo osservato con BSE, sebbene – in queste specifiche condizioni sperimentali – quando somministrata come frazione isolata, il suo contributo risulti quantitativamente trascurabile.

Coerentemente con quanto riportato in altri studi, abbiamo inoltre confermato l'effetto inibitorio di BSE sulla produzione di TNF- α [255]. In questo caso, l'induzione mediata da IL-1 β risulta meno pronunciata rispetto a quella rilevata per IL-6 e, di conseguenza, anche la riduzione del segnale ELISA indotta da BSE appare più contenuta; ciononostante, l'inibizione è significativa, in particolare alla concentrazione intermedia. Questo risultato è in linea con le evidenze secondo cui gli acidi acetil boswellici, come AKBA e A α BA, oltre che KBA sono in grado di sopprimere l'induzione di TNF- α in risposta a stimoli infiammatori tramite l'inibizione della via NF- κ B [256]–[258].

Invece, l'assenza di un incremento dei livelli relativi di IL-8 nei condrociti trattati con IL-1 β , potrebbe dipendere da una cinetica differente o dalla necessità di co-stimoli specifici (es. TNF- α , LPS), nelle condizioni sperimentali adottate. Inoltre, la risposta osservata nei condrociti primari potrebbe risultare attenuata rispetto a quanto sia possibile rilevare in linee cellulari immortalizzate o in modelli più complessi (come sistemi di co-cultura), in cui le interazioni cellulari e i segnali paracrini amplificano la risposta infiammatoria [259]–[262]. Questo, combinato alla sensibilità dell'analisi, può contribuire a spiegare l'assenza di un incremento misurabile per l'IL-8, nelle nostre condizioni sperimentali.

Poiché l'infiammazione articolare non è sostenuta unicamente da citochine infiammatorie, ma anche da un marcato squilibrio redox, è stato considerato fondamentale indagare anche il contributo dello stress ossidativo [263]. A tal riguardo, abbiamo impiegato il menadione come agente pro-ossidante, basandoci su consolidate evidenze che ne documentano la capacità di generare ROS in modo rapido e diretto, tramite meccanismi di “*redox cycling*” [264], [265]. Il menadione (o vitamina K), viene continuamente ridotto e ossidato nelle cellule, provocando la formazione di specie radicaliche e danni mitocondriali. Al contrario, l'IL-1 β agisce principalmente come citochina infiammatoria, stimolando indirettamente la produzione di ROS mediante l'attivazione di vie intracellulari e trascrizione di enzimi ossidativi. Tale effetto è quindi modulato da molteplici fattori intracellulari e richiede attivazioni trascrizionali più lente [266]. Nelle nostre condizioni sperimentali, l'incremento dei livelli di ROS indotto da menadione è stato attenuato dal pretrattamento con BSE, con l'effetto più marcato alla dose intermedia. Questo risultato conferma il potenziale degli estratti di *Boswellia* spp. e di AKBA nella modulazione dei meccanismi di stress redox, già documentato in letteratura e attribuito sia a meccanismi diretti di scavenging radicalico [84], sia a meccanismi indiretti di potenziamento delle difese cellulari endogene [267].

In ultimo, abbiamo valutato l'effetto di BSE sulle MMP, enzimi catabolici criticamente coinvolti nel processo di degradazione articolare.

Le MMP costituiscono una famiglia eterogenea di enzimi che differiscono per funzioni biologiche, origine cellulare e meccanismi di regolazione. Nelle articolazioni, l'espressione e l'attività delle MMP sono regolate da un network complesso che coinvolge sia le cellule residenti del tessuto articolare sia le cellule immunitarie infiltranti che migrano in risposta a stimoli infiammatori. Tra queste, macrofagi, linfociti T e B e monociti contribuiscono alla modulazione dell'espressione delle MMP e all'amplificazione del microambiente degradativo [268]. La MMP-13 è una delle principali collagenasi coinvolte nello sviluppo dell'OA. A causa della sua elevata espressione nella cartilagine umana affetta da OA e della sua ampia capacità proteolitica, svolge un ruolo diretto nella degradazione della matrice cartilaginea. L'enzima è costitutivamente espresso e secreto dai condrociti umani [269], [270]. Al contrario, la fonte principale della MMP-9 è costituita da cellule infiltranti, piuttosto che dai condrociti residenti [271], [272]. In particolare, *Dreier et al.* hanno mostrato che i condrociti isolati non la secernono, ma possono agire come fattori paracrini, favorendone l'attivazione tramite proteasi aggiuntive, tra cui MMP-3 e MMP-13 [272].

Nel nostro modello sperimentale, il trattamento con IL-1 β non induce un aumento dei livelli di MMP-9. Tale evidenza è coerente con il quadro riportato in letteratura e suggerisce che, nelle nostre condizioni sperimentali, la regolazione della MMP-9 non sia direttamente mediata dai condrociti. Al contrario, il marcato aumento del segnale ELISA relativo alla MMP-13, supporta il suo ruolo centrale nei processi catabolici indotti dai condrociti attivati. Il pretrattamento con BSE ne attenua l'aumento, sebbene senza una chiara dose-dipendenza. Tale effetto può essere in parte ricondotto all'AKBA, descritto come soppressore dell'espressione di MMP-13 e in grado di limitarne l'attività degradativa attraverso l'inibizione della via NF- κ B e l'attivazione di pathway antiossidanti, come quello mediato da Nrf2 [87], [88], [273].

L'assenza di una risposta strettamente dose-dipendente, osservata nei nostri esperimenti, non solo non indebolisce l'efficacia osservata, ma risulta coerente con un comportamento ormetico ampiamente descritto per diversi composti fitochimici, i quali a basse e intermedie concentrazioni sono in grado di attivare pathways adattativi protettivi (come la via Nrf2/HO-1) mentre, a dosi più elevate, possono perdere efficacia o persino esercitare effetti opposti, inclusi fenomeni pro-ossidanti [274], [275]. Questo profilo di risposta, ricorrente nella maggior parte dei saggi condotti, conferma il potenziale del BSE come regolatore dello stress cellulare, ma evidenzia al tempo stesso l'importanza di identificare con precisione il range di concentrazioni

in cui si osserva l'efficacia biologica, tenendo conto del contesto sperimentale. Ciò rende necessari ulteriori approfondimenti per una corretta valorizzazione del fitocomplesso. In aggiunta, sulla base dei dati raccolti, si ritiene opportuno estendere la valutazione degli effetti delle singole frazioni purificate anche sugli altri marker analizzati in questo studio, al fine di chiarire se, e in quale misura, la frazione cembrenica contribuisca alla modulazione della risposta antinfiammatoria e antiossidante. Un approfondimento in questa direzione sarebbe particolarmente utile per approfondire il profilo di bioattività dei cembreni.

5.6 CONCLUSIONI

Globalmente, i nostri risultati forniscono un razionale scientifico preliminare a sostegno del potenziale condroprotettivo dell'estratto di resina di *Boswellia sacra* in un modello sperimentale di osteoartrite. La capacità del fitocomplesso di *Boswellia sacra* di attenuare lo stress ossidativo e di modulare la produzione di mediatori chiave dell'infiammazione e della degradazione della matrice cartilaginea, tra cui IL-6, TNF- α e MMP-13, unitamente alla riduzione della produzione di ROS, sostiene il suo ruolo nel preservare l'omeostasi articolare. Questi risultati supportano l'impiego dell'estratto come ingrediente bioattivo in formulazioni nutraceutiche, sia come coadiuvante in strategie preventive, sia come supporto complementare alle terapie farmacologiche convenzionali per il trattamento di patologie articolari. L'approfondimento con studi meccanicistici e *in vivo* si ritiene fondamentale per validare questi dati preclinici e tradurli in prospettive cliniche concrete.

I risultati ottenuti da questo studio sono attualmente in fase di analisi e organizzazione ai fini della stesura di un manoscritto scientifico destinato alla pubblicazione, con il titolo:

- *‘Nutraceutical potential of Boswellia sacra extract in the management of osteoarthritic inflammation: in vitro evidence on human chondrocyte’*

La Rosa, L., Asteggiano, A., Occhipinti, A., Genova, T., Gentile, C.

Contestualmente, sono in corso indagini sperimentali complementari volte ad approfondire alcuni aspetti chiave emersi nella fase preliminare.

6. CONCLUSIONI GENERALI

Tenendo conto delle evidenze raccolte, il presente lavoro consente di delineare alcune considerazioni riguardo al potenziale nutraceutico delle matrici vegetali analizzate.

Nello specifico, l'analisi del profilo polifenolico della polvere dei semi di lampone rosso e dei frutti di sommacco, ha messo in luce la presenza di un'elevata concentrazione di composti fenolici ad azione antiossidante. La polvere dei semi di lampone si è distinta per l'elevato contenuto di quercetina, catechina e proantocianidine a basso peso molecolare, mentre il sommacco ha mostrato una predominanza di flavonoidi, in particolare flavan-3-oli, flavoni e flavononi. Di particolare rilevanza è la ricchezza del profilo polifenolico della polvere dei semi di lampone, trattandosi di una matrice di secondo scarto della filiera di trasformazione del frutto. A livello funzionale, entrambe le matrici hanno mostrato una significativa attività antiossidante, non solo in modelli in soluzione, ma anche in contesti cellulari di maggiore rilevanza biologica. Inoltre, è stata riscontrata una marcata attività antiproliferativa nei confronti di diverse linee cellulari epiteliali tumorali umane, nonché un'azione antimicrobica nei confronti dei principali ceppi batterici patogeni di origine alimentare. Tali proprietà ne suggeriscono dunque l'impiego come additivi naturali ad attività funzionale e antimicrobica. Inoltre, si ritiene che, grazie all'elevato contenuto in polifenoli, l'integrazione di ciascuna matrice, anche a dosaggi contenuti in formulazioni nutraceutiche, possa rappresentare una fonte rilevante di composti bioattivi, con possibili effetti positivi sulla salute.

In definitiva, questo studio conferma che la valorizzazione di matrici vegetali, siano esse piante selvatiche o sottoprodotti di scarto, rappresenta un approccio promettente per l'individuazione di nuovi prodotti ad alto valore aggiunto. Al contempo, contribuisce a delineare un modello virtuoso di ricerca applicata, in grado di integrare innovazione scientifica, promozione della salute e sostenibilità ambientale.

Per quanto riguarda lo studio condotto sulla resina di *Boswellia sacra*, l'analisi fitochimica ha confermato la predominanza degli acidi boswellici, triterpeni pentaciclici caratteristici delle resine appartenenti al genere *Boswellia*. Tra i triterpeni, si evidenzia una netta prevalenza delle forme acetilate, con l'AKBA come componente principale. Tale modificazione strutturale riveste particolare rilevanza, poiché conferisce maggiore lipofilia e stabilità, proprietà che ne favoriscono la biodisponibilità e l'efficacia biologica. Il profilo fitochimico è ulteriormente completato dalla presenza di un gruppo diterpeni della serie cembrenica, con l'iso-serratolo

presente in maggiori quantità. Rispetto agli acidi boswellici, per i quali esiste una letteratura consolidata riguardo le loro azione sui processi infiammatori, i cembreni risultano ad oggi meno caratterizzati dal punto di vista biologico. Nel fitocomplesso di *Boswellia sacra*, l'insieme di queste classi di composti terpenici suggerisce che l'attività biologica derivi da un effetto combinato e potenzialmente sinergico tra queste molecole. L'analisi integrata tra composizione fitochimica e risposta biologica consente dunque di interpretare in modo più completo gli effetti osservati nei modelli cellulari impiegati nello studio, nei quali l'estratto ha mostrato effetti protettivi coerenti con il suo profilo fitochimico.

Nel modello vascolare basato su cellule progenitrici endoteliali umane, il trattamento con l'estratto di *Boswellia sacra* ha promosso le funzioni rigenerative delle cellule, migliorandone la motilità, la capacità migratoria e il potenziale angiogenico, senza indurre un incremento dell'espressione dei principali marcatori di attivazione pro-infiammatoria endoteliale. Questi effetti funzionali potrebbero essere mediati, almeno in parte, da un aumento della produzione di ossido nitrico, molecola chiave nella regolazione della funzione vascolare.

Nel modello di astrociti murini, l'estratto ha mostrato una notevole attività citoprotettiva in condizioni di stress multifattoriale, indotto dalla combinazione di privazione di siero nel mezzo di coltura e insulti ossidativi. Il meccanismo d'azione, nel modello di stress ossidativo indotto dall'etanolo combinato allo stress nutrizionale, appare riconducibile all'attivazione coordinata di diverse vie di segnalazione cellulare, che coinvolgono la modulazione della via apoptotica e autofagica, l'induzione di sistemi antiossidanti e il controllo della risposta infiammatoria. In particolare, l'estratto di *Boswellia sacra* ha inibito la cascata apoptotica, come evidenziato dalla riduzione della forma attiva della caspasi-7 e dalla concomitante riduzione della frammentazione del DNA. Contestualmente, ha modulato il processo autofagico, promuovendone il flusso nelle fasi acute dello stress al fine di favorire l'eliminazione dei componenti cellulari danneggiati, mentre ne ha inibito l'attivazione prolungata nelle fasi tardive, prevenendo così potenziali effetti citotossici. In aggiunta, l'estratto ha promosso l'attivazione della via antiossidante mediata dal fattore di trascrizione Nrf2, unitamente alla soppressione dei pathway pro-infiammatori, quali NF- κ B e COX-2.

In ultimo, nel modello *in vitro* di osteoartrite costituito da condrociti umani, l'estratto ha modulato selettivamente alcuni mediatori chiave coinvolti nella degradazione della matrice cartilaginea, in particolare IL-6, TNF- α e MMP-13, oltre ad aver ridotto la produzione intracellulare di ROS.

In conclusione, se nel contesto articolare i risultati del presente lavoro confermano un ambito d'impiego consolidato, gli effetti neuroprotettivi ed endotelio-rigenerativi aprono prospettive applicative innovative. Nel loro insieme, queste evidenze sottolineano il valore della resina di *Boswellia sacra* come risorsa naturale di particolare interesse per lo sviluppo di formulazioni nutraceutiche, destinate sia alla prevenzione di patologie infiammatorie e degenerative, sia come complemento integrativo dei convenzionali trattamenti farmacologici.

BIGLIOGRAFIA

- [1] J. W. Erdman, "Health and nutrition beyond essential nutrients: The evolution of the bioactives concept for human health," *Mol. Aspects Med.*, vol. 89, no. August 2022, p. 101116, 2023, doi: 10.1016/j.mam.2022.101116.
- [2] B. Mollet and I. Rowland, "Functional foods: At the frontier between food and pharma," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 13, no. 5, pp. 483–485, 2002, doi: 10.1016/S0958-1669(02)00375-0.
- [3] C. Gentile, "Biological activities of plant food components: Implications in human health," *Foods*, vol. 10, no. 2. MDPI AG, pp. 1–2, Feb. 01, 2021, doi: 10.3390/foods10020456.
- [4] M. Simsek and K. Whitney, "Examination of Primary and Secondary Metabolites Associated with a Plant-Based Diet and Their Impact on Human Health," *Foods*, vol. 13, no. 7, pp. 1–20, 2024, doi: 10.3390/foods13071020.
- [5] Y. J. Zhang *et al.*, "Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases," *Molecules*, vol. 20, no. 12. MDPI AG, pp. 21138–21156, Nov. 27, 2015, doi: 10.3390/molecules201219753.
- [6] K. Wojciech, "Dietary polyphenols-important non-nutrients in the prevention of chronic noncommunicable diseases. A systematic review," *Nutrients*, vol. 11, no. 5, pp. 1–35, 2019, [Online]. Available: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L2002051255%0AU2%0A-%0AL2002051255>.
- [7] S. Patra *et al.*, "Chemical diversity of dietary phytochemicals and their mode of chemoprevention," *Biotechnol. Reports*, vol. 30, p. e00633, 2021, doi: 10.1016/j.btre.2021.e00633.
- [8] M. Ribeiro, T. de Sousa, P. Poeta, A. S. Bagulho, and G. Igrejas, "Review of structural features and binding capacity of polyphenols to gluten proteins and peptides in vitro: Relevance to celiac disease," *Antioxidants*, vol. 9, no. 6. MDPI AG, Jun. 01, 2020, doi: 10.3390/antiox9060463.
- [9] F. Caradonna, O. Consiglio, C. Luparello, and C. Gentile, "Science and healthy meals in the world: Nutritional epigenomics and nutrigenetics of the mediterranean diet," *Nutrients*, vol. 12, no. 6. MDPI AG, pp. 1–23, Jun. 01, 2020, doi: 10.3390/nu12061748.
- [10] G. Pizzino *et al.*, "Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/8416763.
- [11] S. B. Nimse and D. Pal, "Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 35, pp. 27986–28006, 2015, doi: 10.1039/c4ra13315c.
- [12] K. Jomova *et al.*, *Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging*, vol. 97, no. 10. Springer Berlin Heidelberg, 2023.
- [13] M. Ristow and K. Schmeisser, "Mitohormesis: Promoting health and lifespan by increased levels of reactive oxygen species (ROS)," *Dose-Response*, vol. 12, no. 2, pp. 288–341, 2014, doi: 10.2203/dose-response.13-035.Ristow.
- [14] A. M. Pisoschi, A. Pop, C. Cimpeanu, and G. Predoi, "Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2016. Hindawi Limited, 2016, doi: 10.1155/2016/9130976.
- [15] B. Halliwell and C. Sacramento, "Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role in Human Disease."
- [16] G. Mannino, A. Perrone, C. Campobenedetto, A. Schittone, C. Margherita Berteà, and C. Gentile, "Phytochemical profile and antioxidative properties of *Plinia trunciflora* fruits: A new source of nutraceuticals," *Food Chem.*, vol. 307, no. September 2019, 2020, doi: 140

10.1016/j.foodchem.2019.125515.

- [17] R. Masella, R. Di Benedetto, R. Vari, C. Filesi, and C. Giovannini, “Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes,” *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 16, no. 10, pp. 577–586, Oct. 2005, doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.05.013.
- [18] I. Rahman, S. K. Biswas, and P. A. Kirkham, “Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols,” vol. 72, pp. 1439–1452, 2006, doi: 10.1016/j.bcp.2006.07.004.
- [19] Y. Ranneh, F. Ali, A. M. Akim, H. A. Hamid, H. Khazaai, and A. Fadel, “Crosstalk between reactive oxygen species and pro-inflammatory markers in developing various chronic diseases: a review,” *Appl. Biol. Chem.*, vol. 60, no. 3, pp. 327–338, 2017, doi: 10.1007/s13765-017-0285-9.
- [20] M. J. Morgan and Z. G. Liu, “Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling,” *Cell Res.*, vol. 21, no. 1, pp. 103–115, 2011, doi: 10.1038/cr.2010.178.
- [21] V. Ngo and M. L. Duennwald, “Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease,” *Antioxidants*, vol. 11, no. 12, 2022, doi: 10.3390/antiox11122345.
- [22] J. D. Wardyn, A. H. Ponsford, and C. M. Sanderson, “Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 43, pp. 621–626, 2015, doi: 10.1042/BST20150014.
- [23] P. Hennig, M. Garstkiewicz, S. Grossi, M. Di Filippo, L. E. French, and H. D. Beer, “The crosstalk between Nrf2 and inflammasomes,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 2, 2018, doi: 10.3390/ijms19020562.
- [24] F. Sivandzade, S. Prasad, A. Bhalerao, and L. Cucullo, “NRF2 and NF- κ B interplay in cerebrovascular and neurodegenerative disorders: Molecular mechanisms and possible therapeutic approaches,” *Redox Biol.*, vol. 21, no. October 2018, p. 101059, 2019, doi: 10.1016/j.redox.2018.11.017.
- [25] B. S. Sailaja, R. Aita, S. Maledatu, D. Ribnicky, M. P. Verzi, and I. Raskin, “Moringa isothiocyanate-1 regulates Nrf2 and NF- κ B pathway in response to LPS-driven sepsis and inflammation,” *PLoS One*, vol. 16, no. 4 April, pp. 1–18, 2021, doi: 10.1371/journal.pone.0248691.
- [26] D. Ajit *et al.*, “Phytochemicals and botanical extracts regulate NF- κ B and Nrf2/ARE reporter activities in di TNC1 astrocytes,” *Neurochem. Int.*, vol. 97, pp. 49–56, 2016, doi: 10.1016/j.neuint.2016.05.004.
- [27] G. Wang *et al.*, “Resveratrol ameliorates rheumatoid arthritis via activation of SIRT1-Nrf2 signaling pathway,” *BioFactors*, vol. 46, no. 3, pp. 441–453, 2020, doi: 10.1002/biof.1599.
- [28] Ş. H. Roşian, I. Boarescu, and P. M. Boarescu, “Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Bioactive Compounds in Atherosclerosis,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 26, no. 3, 2025, doi: 10.3390/ijms26031379.
- [29] L. F. Laurindo *et al.*, “Effects of Medicinal Plants and Phytochemicals in Nrf2 Pathways during Inflammatory Bowel Diseases and Related Colorectal Cancer: A Comprehensive Review,” *Metabolites*, vol. 13, no. 2, 2023, doi: 10.3390/metabo13020243.
- [30] V. Krajka-Kuźniak and W. Baer-Dubowska, “Modulation of Nrf2 and NF- κ B signaling pathways by naturally occurring compounds in relation to cancer prevention and therapy. Are combinations better than single compounds?,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 15, 2021, doi: 10.3390/ijms22158223.
- [31] S. S. M. Sofiullah *et al.*, “Natural Bioactive Compounds Targeting NADPH Oxidase Pathway in

- Cardiovascular Diseases,” *Molecules*, vol. 28, no. 3, 2023, doi: 10.3390/molecules28031047.
- [32] S. Corrado and S. Sala, “Food waste accounting along global and European food supply chains: State of the art and outlook,” *Waste Management*, vol. 79. Elsevier Ltd, pp. 120–131, Sep. 01, 2018, doi: 10.1016/j.wasman.2018.07.032.
- [33] F. Fernandes, C. Delerue-Matos, and C. Grosso, *Unveiling the Potential of Agrifood By-products: a Comprehensive Review of Phytochemicals, Bioactivities and Industrial Applications*, vol. 16, no. 6. Springer Netherlands, 2025.
- [34] C. Gentile, M. Allegra, F. Angileri, A. M. Pintaudi, M. A. Livrea, and L. Tesoriere, “Polymeric proanthocyanidins from Sicilian pistachio (*Pistacia vera* L.) nut extract inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells,” *Eur. J. Nutr.*, vol. 51, no. 3, pp. 353–363, 2012, doi: 10.1007/s00394-011-0220-5.
- [35] S. Ojha, S. Bußler, and O. K. Schlüter, “Food waste valorisation and circular economy concepts in insect production and processing,” *Waste Management*, vol. 118. Elsevier Ltd, pp. 600–609, Dec. 01, 2020, doi: 10.1016/j.wasman.2020.09.010.
- [36] O. I. Tsiapali, E. Ayfantopoulou, A. Tzourouni, A. Ofrydopoulou, S. Letsiou, and A. Tsoupras, “Unveiling the Utilization of Grape and Winery By-Products in Cosmetics with Health Promoting Properties,” *Appl. Sci.*, vol. 15, no. 3, pp. 1–28, 2025, doi: 10.3390/app15031007.
- [37] S. M. Ferreira and L. Santos, “A potential Valorization Strategy of Wine Industry By-Products and Their Application in Cosmetics—Case study: Grape Pomace and Grapeseed,” *Molecules*, vol. 27, no. 3, 2022, doi: 10.3390/molecules27030969.
- [38] V. F. R. Martins, T. B. Ribeiro, A. I. Lopes, M. E. Pintado, R. M. S. C. Morais, and A. M. M. B. Morais, “Comparison among Different Green Extraction Methods of Polyphenolic Compounds from Exhausted Olive Oil Pomace and the Bioactivity of the Extracts,” *Molecules*, vol. 29, no. 9, 2024, doi: 10.3390/molecules29091935.
- [39] L. Gil-Martínez *et al.*, “Green Extraction of Phenolic Compounds from Artichoke By-Products: Pilot-Scale Comparison of Ultrasound, Microwave, and Combined Methods with Pectinase Pre-Treatment,” *Antioxidants*, vol. 14, no. 4, pp. 1–18, 2025, doi: 10.3390/antiox14040423.
- [40] A. Ispiryan, J. Viškelis, P. Viškelis, D. Urbonavičienė, and L. Raudonė, “Biochemical and Antioxidant Profiling of Raspberry Plant Parts for Sustainable Processing,” *Plants*, vol. 12, no. 13, pp. 1–15, 2023, doi: 10.3390/plants12132424.
- [41] A. Nowak, M. Sójka, E. Klewicka, L. Lipińska, R. Klewicki, and K. Kołodziejczyk, “Ellagitannins from *Rubus idaeus* L. Exert Geno- and Cytotoxic Effects against Human Colon Adenocarcinoma Cell Line Caco-2,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 65, no. 14, pp. 2947–2955, Apr. 2017, doi: 10.1021/acs.jafc.6b05387.
- [42] A. Ispiryan, J. Viškelis, and P. Viškelis, “Red raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil: A review,” *Plants*, vol. 10, no. 5. MDPI AG, May 01, 2021, doi: 10.3390/plants10050944.
- [43] A. Fazio, P. Plastina, J. Meijerink, R. F. Witkamp, and B. Gabriele, “Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy: Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts,” in *Food Chemistry*, Oct. 2013, vol. 140, no. 4, pp. 817–824, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.010.
- [44] H. Teng *et al.*, “Hepatoprotective effects of raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) seed oil and its major constituents,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 110, pp. 418–424, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.fct.2017.09.010.
- [45] D. Godevac, V. Tešević, V. Vajs, S. Milosavljević, and M. Stanković, “Antioxidant properties of raspberry seed extracts on micronucleus distribution in peripheral blood lymphocytes,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 47, no. 11, pp. 2853–2859, Nov. 2009, doi: 10.1016/j.fct.2009.09.006.

- [46] M. H. Choi, S. M. Shim, and G. H. Kim, "Protective effect of black raspberry seed containing anthocyanins against oxidative damage to DNA, protein, and lipid," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 53, no. 2, pp. 1214–1221, Feb. 2016, doi: 10.1007/s13197-015-2094-7.
- [47] J. H. Lee *et al.*, "Antiviral effects of black raspberry (*Rubus coreanus*) seed extract and its polyphenolic compounds on norovirus surrogates," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 80, no. 6, pp. 1196–1204, 2016, doi: 10.1080/09168451.2016.1151337.
- [48] H. Cho, H. Jung, H. Lee, H. C. Yi, H. K. Kwak, and K. T. Hwang, "Chemopreventive activity of ellagitannins and their derivatives from black raspberry seeds on HT-29 colon cancer cells," *Food Funct.*, vol. 6, no. 5, pp. 1675–1683, May 2015, doi: 10.1039/c5fo00274e.
- [49] N. R. Mihailović, V. B. Mihailović, A. R. Ćirić, N. Z. Srećković, M. R. Cvijović, and L. G. Joksović, "Analysis of Wild Raspberries (*Rubus idaeus* L.): Optimization of the Ultrasonic-Assisted Extraction of Phenolics and a New Insight in Phenolics Bioaccessibility," *Plant Foods Hum. Nutr.*, vol. 74, no. 3, pp. 399–404, Sep. 2019, doi: 10.1007/s11130-019-00756-4.
- [50] M. Majewski *et al.*, "The characterization of ground raspberry seeds and the physiological response to supplementation in hypertensive and normotensive rats," *Nutrients*, vol. 12, no. 6, Jun. 2020, doi: 10.3390/nu12061630.
- [51] H. J. Lee, H. Jung, H. Cho, K. Lee, and K. T. Hwang, "Black Raspberry Seed Oil Improves Lipid Metabolism by Inhibiting Lipogenesis and Promoting Fatty-Acid Oxidation in High-Fat Diet-Induced Obese Mice and db/db Mice," *Lipids*, vol. 53, no. 5, pp. 491–504, May 2018, doi: 10.1002/lipd.12050.
- [52] M. Kosmala *et al.*, "Chemical composition of defatted strawberry and raspberry seeds and the effect of these dietary ingredients on polyphenol metabolites, intestinal function, and selected serum parameters in rats," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 63, no. 11, pp. 2989–2996, 2015, doi: 10.1021/acs.jafc.5b00648.
- [53] I. Kang, J. C. Espín, T. P. Carr, F. A. Tomás-Barberán, and S. Chung, "Raspberry seed flour attenuates high-sucrose diet-mediated hepatic stress and adipose tissue inflammation," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 32, pp. 64–72, 2016, doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.02.006.
- [54] A. Calabrò *et al.*, "The Nutraceutical Properties of *Rhus coriaria* Linn: Potential Application on Human Health and Aging Biomedicine," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 7, 2023, doi: 10.3390/ijms24076206.
- [55] A. Shabbir, "Rhus coriaria Linn, a plant of medicinal, nutritional and industrial importance: A review," *J. Anim. Plant Sci.*, vol. 22, no. 2, pp. 505–512, 2012.
- [56] S. Rayne and G. Mazza, "Biological activities of extracts from sumac (*Rhus* spp.): A review," *Plant Foods Hum. Nutr.*, vol. 62, no. 4, pp. 165–175, 2007, doi: 10.1007/s11130-007-0058-4.
- [57] S. Wang and F. Zhu, "Chemical composition and biological activity of staghorn sumac (*Rhus typhina*)," *Food Chem.*, vol. 237, pp. 431–443, 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.05.111.
- [58] R. L. Sumac, H. Alsamri, K. Athamneh, G. Pintus, and A. H. Eid, "Pharmacological and Antioxidant Activities of," pp. 1–27, 2021.
- [59] E. Mazzara, A. Caprodossi, A. M. Mustafa, F. Maggi, and G. Caprioli, "Phytochemical Investigation of Sumac (*Rhus coriaria* L.) Fruits from Different Sicilian Accessions," *Foods*, vol. 12, no. 23, 2023, doi: 10.3390/foods12234359.
- [60] C. L. C. Almeida-Da-silva *et al.*, "Effects of Frankincense Compounds on Infection, Inflammation, and Oral Health," *Molecules*, vol. 27, no. 13, pp. 1–19, 2022, doi: 10.3390/molecules27134174.
- [61] T. Efferth and F. Oesch, "Anti-inflammatory and anti-cancer activities of frankincense: Targets, treatments and toxicities," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 80, no. September 2019, pp. 39–57, 2022,

doi: 10.1016/j.semcancer.2020.01.015.

- [62] A. Al-Harrasi, S. K. Avula, R. Csuk, and B. Das, “Cembranoids from *Boswellia* species,” *Phytochemistry*, vol. 191, no. May, 2021, doi: 10.1016/j.phytochem.2021.112897.
- [63] Y. Zhang *et al.*, “Triterpenoid resinous metabolites from the genus *Boswellia*: Pharmacological activities and potential species-identifying properties,” *Chem. Cent. J.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–16, 2013, doi: 10.1186/1752-153X-7-153.
- [64] D. Obiștioiu *et al.*, “*Boswellia* Essential Oil: Natural Antioxidant as an Effective Antimicrobial and Anti-Inflammatory Agent,” *Antioxidants*, vol. 12, no. 10, 2023, doi: 10.3390/antiox12101807.
- [65] M. Miran *et al.*, “Taxonomical Investigation, Chemical Composition, Traditional Use in Medicine, and Pharmacological Activities of *Boswellia sacra* Flueck,” *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2022, 2022, doi: 10.1155/2022/8779676.
- [66] I. G. Rodrigues, M. G. Miguel, and W. Mnif, “A brief review on new naturally occurring cembranoid diterpene derivatives from the soft corals of the genera *Sarcophyton*, *Sinularia*, and *Lobophytum* since 2016,” *Molecules*, vol. 24, no. 4, 2019, doi: 10.3390/molecules24040781.
- [67] H. P. T. Ammon, “Boswellic extracts and 11-keto- β -boswellic acids prevent type 1 and type 2 diabetes mellitus by suppressing the expression of proinflammatory cytokines,” *Phytomedicine*, vol. 63, no. June, p. 153002, 2019, doi: 10.1016/j.phymed.2019.153002.
- [68] A. Al-Saban, A. H. Maad, A. S. Al-Sham, and H. M. Saad, “Antimicrobial and antioxidant properties of *Boswellia sacra* resin: extraction, evaluation, and formulation into a topical cream for dermatological applications,” *Front. Med.*, vol. 12, no. August, 2025, doi: 10.3389/fmed.2025.1664265.
- [69] Y. C. Tsai *et al.*, “Evaluation of the Anti-Atopic Dermatitis Effects of α -Boswellic Acid on $\text{Tnf-}\alpha$ / $\text{Ifn-}\gamma$ -Stimulated HaCat Cells and DNCB-Induced BALB/c Mice,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 17, 2022, doi: 10.3390/ijms23179863.
- [70] M. Schmiech *et al.*, “11-Keto- α -Boswellic Acid , a Novel Triterpenoid from,” 2021.
- [71] E. R. Sailer, L. R. Subramanian, B. Rall, R. F. Hoernlein, H. P. T. Ammon, and H. Safayhi, “Acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA): Structure requirements for binding and 5-lipoxygenase inhibitory activity,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 117, no. 4, pp. 615–618, 1996, doi: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb15235.x.
- [72] A. G. Karra *et al.*, “Boswellic acids and their derivatives as potent regulators of glucocorticoid receptor actions,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 695, no. March, p. 108656, 2020, doi: 10.1016/j.abb.2020.108656.
- [73] C. Peng, Y. Yang, Y. Wang, B. Gong, X. Sun, and X. Yang, “From bench to bedside , boswellic acids in anti-in fl ammatory therapy — mechanistic insights , bioavailability challenges , and optimization approaches,” no. November, 2025, doi: 10.3389/fphar.2025.1692443.
- [74] A. Moussaieff *et al.*, “Incensole acetate: A novel neuroprotective agent isolated from *Boswellia carterii*,” *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 28, no. 7, pp. 1341–1352, 2008, doi: 10.1038/jcbfm.2008.28.
- [75] A. Al-Harrasi *et al.*, “Antiglycation and antioxidant activities and HPTLC analysis of *Boswellia sacra* Oleogum resin: The sacred frankincense,” *Trop. J. Pharm. Res.*, vol. 12, no. 4, pp. 597–602, 2013, doi: 10.4314/tjpr.v12i4.23.
- [76] P. V Bhosle and S. J. Wadher, “Neuroprotective effects of *Boswellia serrata* extract in Huntington ’ s disease : Antioxidant and anti - inflammatory mechanisms in Wistar rats,” vol. XXVI, pp. 3686–3699, 2025.
- [77] D. Catanzaro *et al.*, “*Boswellia serrata* preserves intestinal epithelial barrier from oxidative and

- inflammatory damage,” *PLoS One*, vol. 10, no. 5, pp. 1–15, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0125375.
- [78] F. Khaafi and B. Javadi, “Molecular Targets Underlying the Neuroprotective Effects of Boswellic Acid: A Systematic Review,” *Mini-Reviews Med. Chem.*, vol. 23, no. 19, pp. 1912–1925, 2023, doi: 10.2174/1389557523666230330113611.
 - [79] E. A. Mohamed, H. I. Ahmed, H. S. Zaky, and A. M. Badr, “Boswellic acids ameliorate neurodegeneration induced by AlCl₃: the implication of Wnt/ β -catenin pathway,” *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 29, no. 50, pp. 76135–76143, 2022, doi: 10.1007/s11356-022-20611-5.
 - [80] A. Afshin *et al.*, “Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017,” *Lancet*, vol. 393, no. 10184, pp. 1958–1972, May 2019, doi: 10.1016/S0140-6736(19)30041-8.
 - [81] L. Interdonato *et al.*, “Autophagy machinery plays an essential role in traumatic brain injury-induced apoptosis and its related behavioral abnormalities in mice: focus on *Boswellia Sacra* gum resin,” *Front. Physiol.*, vol. 14, no. January, pp. 1–13, 2023, doi: 10.3389/fphys.2023.1320960.
 - [82] M. Panahishokouh *et al.*, “Evaluation of the Effectiveness of an Herbal Formulation of *Boswellia sacra* Flueck. In Improving Cognitive and Behavioral Symptoms in Patients with Cognitive Impairment and Alzheimer’s Disease,” *J. Res. Pharm. Pract.*, vol. 11, no. 3, pp. 91–98, 2022, doi: 10.4103/jrpp.jrpp_73_22.
 - [83] Z. Pengzong *et al.*, “Wound Healing Potential of the Standardized Extract of *Boswellia serrata* on Experimental Diabetic Foot Ulcer via Inhibition of Inflammatory, Angiogenetic and Apoptotic Markers,” *Planta Med.*, vol. 85, no. 8, pp. 657–669, 2019, doi: 10.1055/a-0881-3000.
 - [84] D. Beghelli *et al.*, “Antioxidant and Ex Vivo Immune System Regulatory Properties of *Boswellia serrata* Extracts,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/7468064.
 - [85] M. Wang *et al.*, “Pretreatment with β -Boswellic Acid Improves Blood Stasis Induced Endothelial Dysfunction: Role of eNOS Activation,” *Sci. Rep.*, vol. 5, no. October, pp. 1–11, 2015, doi: 10.1038/srep15357.
 - [86] M. Majeed, K. Nagabhushanam, L. Lawrence, R. Nallathambi, V. Thiagarajan, and L. Mundkur, “*Boswellia serrata* Extract Containing 30% 3-Acetyl-11-Keto-Boswellic Acid Attenuates Inflammatory Mediators and Preserves Extracellular Matrix in Collagen-Induced Arthritis,” *Front. Physiol.*, vol. 12, no. September, 2021, doi: 10.3389/fphys.2021.735247.
 - [87] C. Sanchez *et al.*, “Curcuma longa and *Boswellia serrata* Extracts Modulate Different and Complementary Pathways on Human Chondrocytes In Vitro: Deciphering of a Transcriptomic Study,” *Front. Pharmacol.*, vol. 13, no. August, pp. 1–14, 2022, doi: 10.3389/fphar.2022.931914.
 - [88] E. Franco-Trepas *et al.*, “ β Boswellic Acid Blocks Articular Innate Immune Responses: An In Silico and In Vitro Approach to Traditional Medicine,” *Antioxidants*, vol. 12, no. 2, pp. 1–26, 2023, doi: 10.3390/antiox12020371.
 - [89] S. Cometa *et al.*, “Effectiveness of gellan gum scaffolds loaded with *Boswellia serrata* extract for in-situ modulation of pro-inflammatory pathways affecting cartilage healing,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 277, no. P1, p. 134079, 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.134079.
 - [90] Y. J. Choi, J. I. Jung, J. Bae, J. K. Lee, and E. J. Kim, “Evaluating the Anti-Osteoarthritis Potential of Standardized *Boswellia serrata* Gum Resin Extract in Alleviating Knee Joint Pathology and Inflammation in Osteoarthritis-Induced Models,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 25, no. 6, pp. 1–20, 2024, doi: 10.3390/ijms25063218.
 - [91] A. Majeed *et al.*, “A standardized *Boswellia serrata* extract shows improvements in knee osteoarthritis within five days-a double-blind, randomized, three-arm, parallel-group, multi-

- center, placebo-controlled trial,” *Front. Pharmacol.*, vol. 15, no. July, 2024, doi: 10.3389/fphar.2024.1428440.
- [92] K. D. Moudgil and S. H. Venkatesha, “The Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Activities of Natural Products to Control Autoimmune Inflammation,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 1, 2023, doi: 10.3390/ijms24010095.
- [93] J. Rumpf, R. Burger, and M. Schulze, “Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 233, no. February, 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123470.
- [94] G. Mannino, A. Occhipinti, and M. E. Maffei, “Quantitative determination of 3-O-Acetyl-11-Keto-Boswellic acid (AKBA) and other boswellic acids in boswellia sacra flueck (syn. B. Carteri Birdw) and Boswellia serrata roxb,” *Molecules*, vol. 21, no. 10, 2016, doi: 10.3390/molecules21101329.
- [95] R. P. Feliciano, M. P. Shea, D. Shanmuganayagam, C. G. Krueger, A. B. Howell, and J. D. Reed, “Comparison of isolated cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) proanthocyanidins to catechin and procyanidins A2 and B2 for use as standards in the 4-(dimethylamino)cinnamaldehyde assay,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, no. 18, pp. 4578–4585, 2012, doi: 10.1021/jf3007213.
- [96] T. G. Albuquerque, F. Santos, A. Sanches-Silva, M. Beatriz Oliveira, A. C. Bento, and H. S. Costa, “Nutritional and phytochemical composition of *Annona cherimola* Mill. fruits and by-products: Potential health benefits,” *Food Chem.*, vol. 193, pp. 187–195, 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.044.
- [97] E. Viola *et al.*, “Phytochemical profiling and investigation of antioxidant, anti-proliferative, and antibacterial properties in spontaneously grown Sicilian sumac (*Rhus coriaria* L.) fruits,” *Food Biosci.*, vol. 61, no. June, p. 104704, 2024, doi: 10.1016/j.fbio.2024.104704.
- [98] G. Mannino *et al.*, “Phytochemical Profile and Antioxidant, Antiproliferative, and Antimicrobial Properties of *Rubus idaeus* Seed Powder,” *Foods*, vol. 11, no. 17, p. 2605, 2022, doi: 10.3390/foods11172605.
- [99] I. Vigliante, G. Mannino, and M. E. Maffei, “OxiCyan®, a phytocomplex of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and spirulina (*Spirulina platensis*), exerts both direct antioxidant activity and modulation of ARE/Nrf2 pathway in HepG2 cells,” *J. Funct. Foods*, vol. 61, no. August, 2019, doi: 10.1016/j.jff.2019.103508.
- [100] N. J. Miller and C. A. Rice-Evans, “Spectrophotometric determination of antioxidant activity,” *Redox Rep.*, vol. 2, no. 3, pp. 161–171, 1996, doi: 10.1080/13510002.1996.11747044.
- [101] S. B. Kedare and R. P. Singh, “Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 48, no. 4, pp. 412–422, 2011, doi: 10.1007/s13197-011-0251-1.
- [102] Z. Ben Ahmed *et al.*, “Determination of optimal extraction conditions for phenolic compounds from: *Pistacia atlantica* leaves using the response surface methodology,” *Anal. Methods*, vol. 8, no. 31, pp. 6107–6114, Aug. 2016, doi: 10.1039/c6ay01739h.
- [103] K. L. Wolfe and H. L. Rui, “Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, no. 22, pp. 8896–8907, 2007, doi: 10.1021/jf0715166.
- [104] C. Gentile *et al.*, “Pomological Traits, Sensory Profile and Nutraceutical Properties of Nine Cultivars of Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) Fruits Grown in Mediterranean Area,” *Plant Foods Hum. Nutr.*, vol. 71, no. 3, pp. 330–338, 2016, doi: 10.1007/s11130-016-0564-3.
- [105] G. Mannino *et al.*, “Phytochemical Profile and Antioxidant, Antiproliferative, and Antimicrobial Properties of *Rubus idaeus* Seed Powder,” *Foods*, vol. 11, no. 17, p. 2605, 2022.
- [106] C. M. Messina *et al.*, “Microbiological profile and bioactive properties of insect powders used

- in food and feed formulations,” *Foods*, vol. 8, no. 9, pp. 1–16, 2019, doi: 10.3390/foods8090400.
- [107] E. Viola *et al.*, “A Functional End-Use of Avocado (cv. Hass) Waste through Traditional Semolina Sourdough Bread Production,” pp. 1–16, 2023.
- [108] M. Castrica, R. Rebucci, C. Giromini, M. Tretola, D. Cattaneo, and A. Baldi, “Total phenolic content and antioxidant capacity of agri-food waste and by-products,” *Ital. J. Anim. Sci.*, vol. 18, no. 1, pp. 336–341, 2019, doi: 10.1080/1828051X.2018.1529544.
- [109] D. D. Četojević-Simin *et al.*, “Bioactivity of Meeker and Willamette raspberry (*Rubus idaeus* L.) pomace extracts,” *Food Chem.*, vol. 166, pp. 407–413, 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.063.
- [110] A. Rojas-García, Á. Fernández-Ochoa, M. de la L. Cádiz-Gurrea, D. Arráez-Román, and A. Segura-Carretero, “Neuroprotective Effects of Agri-Food By-Products Rich in Phenolic Compounds,” *Nutrients*, vol. 15, no. 2, 2023, doi: 10.3390/nu15020449.
- [111] L. J. Valencia-Hernandez, J. E. Wong-Paz, J. A. Ascacio-Valdés, M. L. Chávez-González, J. C. Contreras-Esquivel, and C. N. Aguilar, “Procyanidins: From agro-industrial waste to food as bioactive molecules,” *Foods*, vol. 10, no. 12, pp. 1–33, 2021, doi: 10.3390/foods10123152.
- [112] G. Mannino, C. Gentile, A. Ertani, G. Serio, and C. M. Berteà, “Anthocyanins: Biosynthesis, distribution, ecological role, and use of biostimulants to increase their content in plant foods—a review,” *Agric.*, vol. 11, no. 3, pp. 1–25, 2021, doi: 10.3390/agriculture11030212.
- [113] C. Aneklaphakij *et al.*, “Diversity of Chemical Structures and Biosynthesis of Polyphenols in Nut-Bearing Species,” *Front. Plant Sci.*, vol. 12, no. April, pp. 1–15, 2021, doi: 10.3389/fpls.2021.642581.
- [114] A. Cheng, X. Han, Y. Wu, and H. Lou, “The Function and Catalysis of 2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases Involved in Plant Flavonoid Biosynthesis,” pp. 1080–1095, 2019, doi: 10.3390/ijms15011080.
- [115] A. M. Bakowska-Barczak, A. Schieber, and P. Kolodziejczyk, “Characterization of Canadian black currant (*Ribes nigrum* L.) seed oils and residues,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, no. 24, pp. 11528–11536, 2009, doi: 10.1021/jf902161k.
- [116] D. Helbig, V. Böhm, A. Wagner, R. Schubert, and G. Jahreis, “Berry seed press residues and their valuable ingredients with special regard to black currant seed press residues,” *Food Chem.*, vol. 111, no. 4, pp. 1043–1049, 2008, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.05.017.
- [117] N. Carvalho Gualberto *et al.*, “Bioactive compounds and antioxidant activities in the agro-industrial residues of acerola (*Malpighia emarginata* L.), guava (*Psidium guajava* L.), genipap (*Genipa americana* L.) and umbu (*Spondias tuberosa* L.) fruits assisted by ultrasonic or shaker extracti,” *Food Res. Int.*, vol. 147, no. March, 2021, doi: 10.1016/j.foodres.2021.110538.
- [118] B. S. Zuñiga-Martínez *et al.*, “Avocado paste from industrial byproducts as an unconventional source of bioactive compounds: characterization, in vitro digestion and in silico interactions of its main phenolics with cholesterol,” *J. Food Meas. Charact.*, vol. 15, no. 6, pp. 5460–5476, 2021, doi: 10.1007/s11694-021-01117-z.
- [119] K. L. Wolfe, X. Kang, X. He, M. Dong, Q. Zhang, and R. H. Liu, “Cellular antioxidant activity of common fruits,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 18, pp. 8418–8426, 2008, doi: 10.1021/jf801381y.
- [120] F. Li *et al.*, “Antiproliferative activity of peels, pulps and seeds of 61 fruits,” *J. Funct. Foods*, vol. 5, no. 3, pp. 1298–1309, 2013, doi: 10.1016/j.jff.2013.04.016.
- [121] A. Niedzwiecki, M. W. Roomi, T. Kalinovsky, and M. Rath, “Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations,” *Nutrients*, vol. 8, no. 9, 2016, doi: 10.3390/nu8090552.
- [122] A. Cossarizza *et al.*, “Quercetin and cancer chemoprevention,” *Evidence-based Complement.*

- [123] A. M. Ekström, M. Serafini, O. Nyrén, A. Wolk, C. Bosetti, and R. Bellocco, "Dietary quercetin intake and risk of gastric cancer: Results from a population-based study in Sweden," *Ann. Oncol.*, vol. 22, no. 2, pp. 438–443, 2011, doi: 10.1093/annonc/mdq390.
- [124] V. Nandakumar, T. Singh, and S. K. Katiyar, "Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins," *Cancer Lett.*, vol. 269, no. 2, pp. 378–387, 2008, doi: 10.1016/j.canlet.2008.03.049.
- [125] G. Mannino *et al.*, "Proanthocyanidins and where to find them: A meta-analytic approach to investigate their chemistry, biosynthesis, distribution and effect on human health," *Antioxidants*, vol. 10, no. 8. MDPI AG, Aug. 01, 2021, doi: 10.3390/antiox10081229.
- [126] M. Gajecka, J. Długaszewska, M. Ratajczak, and D. Kamin, "Are dietary supplements containing plant-derived ingredients safe microbiologically?," vol. 27, pp. 240–245, 2019, doi: 10.1016/j.jsps.2018.11.005.
- [127] A. Gribble, J. Mills, and G. Brightwell, "The spoilage characteristics of *Brochothrix thermosphacta* and two psychrotolerant *Enterobacteriaceae* in vacuum packed lamb and the comparison between high and low pH cuts," *MESC*, vol. 97, no. 1, pp. 83–92, 2014, doi: 10.1016/j.meatsci.2014.01.006.
- [128] L. Caldera, L. Franzetti, E. Van Coillie, P. De Vos, P. Stragier, and J. De Block, "Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods," *Food Microbiol.*, vol. 54, pp. 142–153, 2016, doi: 10.1016/j.fm.2015.10.004.
- [129] T. Bintsis, "Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics," *AIMS Microbiol.*, vol. 4, no. 4, pp. 665–684, 2018, doi: 10.3934/microbiol.2018.4.665.
- [130] M. C. Díaz-García, J. M. Obón, M. R. Castellar, J. Collado, and M. Alacid, "Quantification by UHPLC of total individual polyphenols in fruit juices," *Food Chem.*, vol. 138, no. 2–3, pp. 938–949, 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.061.
- [131] R. Gaglio *et al.*, "Effect of saffron addition on the microbiological, physicochemical, antioxidant and sensory characteristics of yoghurt," *Int. J. Dairy Technol.*, vol. 72, no. 2, pp. 208–217, 2019, doi: 10.1111/1471-0307.12569.
- [132] E. Viola *et al.*, "Phytochemical profiling and investigation of antioxidant, anti-proliferative, and antibacterial properties in spontaneously grown Sicilian sumac (*Rhus coriaria* L.) fruits," *Food Biosci.*, vol. 61, no. July, p. 104704, 2024, doi: 10.1016/j.fbio.2024.104704.
- [133] P. Zhang and J. Cui, "Neuroprotective Effect of Fisetin Against the Cerebral Ischemia-Reperfusion Damage via Suppression of Oxidative Stress and Inflammatory Parameters," *Inflammation*, vol. 44, no. 4, pp. 1490–1506, 2021, doi: 10.1007/s10753-021-01434-x.
- [134] S. Punia Bangar, P. Kajla, V. Chaudhary, N. Sharma, and F. Ozogul, "Luteolin: A flavone with myriads of bioactivities and food applications," *Food Biosci.*, vol. 52, no. October 2022, p. 102366, 2023, doi: 10.1016/j.fbio.2023.102366.
- [135] J. H. Yoon, M. Y. Kim, and J. Y. Cho, "Apigenin: A Therapeutic Agent for Treatment of Skin Inflammatory Diseases and Cancer," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 2, 2023, doi: 10.3390/ijms24021498.
- [136] K. Athamneh *et al.*, "Rhus coriaria increases protein ubiquitination, proteasomal degradation and triggers non-canonical Beclin-1-independent autophagy and apoptotic cell death in colon cancer cells," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–17, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-11202-3.
- [137] S. Mahdavi, "Antimicrobial and Antioxidant Activities of Iranian Sumac (*Rhus coriaria* L.) Fruit Ethanolic Extract," *J. Appl. Microbiol. Biochem.*, vol. 02, no. 02, pp. 1–5, 2018, doi:

- [138] S. M. Nasar-Abbas and A. K. Halkman, "Antimicrobial effect of water extract of sumac (*Rhus coriaria* L.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 97, no. 1, pp. 63–69, 2004, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.009.
- [139] M. Potente, H. Gerhardt, and P. Carmeliet, "Basic and therapeutic aspects of angiogenesis," *Cell*, vol. 146, no. 6, pp. 873–887, 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.08.039.
- [140] A. J. Donato, R. G. Morgan, A. E. Walker, and L. A. Lesniewski, "Cellular and molecular biology of aging endothelial cells," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 89, pp. 122–135, 2015, doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.01.021.
- [141] F. Fleissner and T. Thum, "Critical role of the nitric oxide/reactive oxygen species balance in endothelial progenitor dysfunction," *Antioxidants Redox Signal.*, vol. 15, no. 4, pp. 933–948, 2011, doi: 10.1089/ars.2010.3502.
- [142] T. Asahara *et al.*, "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis," *Science (80-.)*, vol. 275, no. 5302, pp. 964–967, 1997, doi: 10.1126/science.275.5302.964.
- [143] Y. Itoh, H. Toriumi, S. Yamada, H. Hoshino, and N. Suzuki, "Resident endothelial cells surrounding damaged arterial endothelium reendothelialize the lesion," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 30, no. 9, pp. 1725–1732, 2010, doi: 10.1161/ATVBAHA.110.207365.
- [144] H. W. Lee *et al.*, "Role of Venous Endothelial Cells in Developmental and Pathologic Angiogenesis," *Circulation*, vol. 144, no. 16, pp. 1308–1322, 2021, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.054071.
- [145] E. Miller-Kasprzak and P. P. Jagodziński, "Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair," *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, vol. 55, no. 4, pp. 247–259, 2007, doi: 10.1007/s00005-007-0027-5.
- [146] H. Chopra, M. K. Hung, D. L. Kwong, C. F. Zhang, and E. H. N. Pow, "Insights into endothelial progenitor cells: Origin, classification, potentials, and prospects," *Stem Cells Int.*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/9847015.
- [147] J. M. Hill *et al.*, "Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk," *Obstet. Gynecol. Surv.*, vol. 58, no. 7, pp. 467–468, 2003, doi: 10.1097/01.ogx.0000074096.62998.d7.
- [148] V. Altabas, K. Altabas, and L. Kirigin, "Endothelial progenitor cells (EPCs) in ageing and age-related diseases: How currently available treatment modalities affect EPC biology, atherosclerosis, and cardiovascular outcomes," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 159, pp. 49–62, 2016, doi: 10.1016/j.mad.2016.02.009.
- [149] C. L. O. Neill *et al.*, "Therapeutic revascularisation of ischaemic tissue : the opportunities and challenges for therapy using vascular stem / progenitor cells," pp. 1–7, 2012.
- [150] M. Vasa *et al.*, "Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease.," *Circ. Res.*, vol. 89, no. 1, pp. 1–7, 2001, doi: 10.1161/hh1301.093953.
- [151] K. Szöke, A. Reinisch, E. Østrup, F. P. Reinholt, and J. A. N. E. Brinckmann, "Autologous cell sources in therapeutic vasculogenesis : In vitro and in vivo comparison of endothelial colony – forming cells from peripheral blood and endothelial cells isolated from adipose tissue," vol. 18, no. 2, pp. 242–252, 2016, doi: 10.1016/j.jcyt.2015.10.009.
- [152] M. Corselli *et al.*, "Clinical scale ex vivo expansion of cord blood-derived outgrowth endothelial progenitor cells is associated with high incidence of karyotype aberrations," *Exp. Hematol.*, vol. 36, no. 3, pp. 340–349, 2008, doi: 10.1016/j.exphem.2007.10.008.
- [153] G. P. Fadini, D. Losordo, and S. Dimmeler, "Critical reevaluation of endothelial progenitor cell

- phenotypes for therapeutic and diagnostic use,” *Circ. Res.*, vol. 110, no. 4, pp. 624–637, 2012, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243386.
- [154] Q. T. Zhao, B. F. Li, and H. Kong, “Roles of Chinese medicine bioactive ingredients in the regulation of cellular function of endothelial progenitor cells,” *Chin. J. Nat. Med.*, vol. 12, no. 7, pp. 481–487, 2014, doi: 10.1016/S1875-5364(14)60075-3.
- [155] M. Bertocchi *et al.*, “Anti-inflammatory activity of *Boswellia serrata* extracts: An in vitro study on porcine aortic endothelial cells,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/2504305.
- [156] D. M. Smadja, J. M. Melero-Martin, J. Eikenboom, M. Bowman, F. Sabatier, and A. M. Randi, “Standardization of methods to quantify and culture endothelial colony-forming cells derived from peripheral blood: Position paper from the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC,” *J. Thromb. Haemost.*, vol. 17, no. 7, pp. 1190–1194, 2019, doi: 10.1111/jth.14462.
- [157] O. Guillevic, S. Ferratge, J. Pascaud, C. Driancourt, J. Boyer-Di-ponio, and G. Uzan, “A novel molecular and functional stemness signature assessing human cord blood-derived endothelial progenitor cell immaturity,” *PLoS One*, vol. 11, no. 4, pp. 1–20, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0152993.
- [158] E. R. Nuzzolo *et al.*, “Adult and cord blood endothelial progenitor cells have different gene expression profiles and immunogenic potential,” *Blood Transfus.*, vol. 12, no. SUPPL.1, 2014, doi: 10.2450/2013.0042-13.
- [159] A. Asteggiano, L. Curatolo, V. Schiavo, A. Occhipinti, and C. Medana, “Development, Validation, and Application of a Simple and Rugged HPLC Method for Boswellic Acids for a Comparative Study of Their Abundance in Different Species of *Boswellia* Gum Resins,” *Appl. Sci.*, vol. 13, no. 3, 2023, doi: 10.3390/app13031254.
- [160] S. Ben Fraj *et al.*, “Human Umbilical Cord Blood Endothelial Progenitor Cell-Derived Extracellular Vesicles Control Important Endothelial Cell Functions,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 12, 2023, doi: 10.3390/ijms24129866.
- [161] M. C. Yoder, “Human endothelial progenitor cells,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 2, no. 7, pp. 1–14, 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a006692.
- [162] F. T. et al. Orthoefer, “Rice Bran Oil Detection,” *Bailey’s Ind. Oil Fat Prod.*, pp. 393–409, 1996, doi: 10.1002/047167849X.bio015.pub2.
- [163] M. Schmiech, S. J. Lang, K. Werner, L. J. Rashan, T. Syrovets, and T. Simmet, “Comparative analysis of pentacyclic triterpenic acid compositions in oleogum resins of different *Boswellia* species and their in vitro cytotoxicity against treatment-resistant human breast cancer cells,” *Molecules*, vol. 24, no. 11, 2019, doi: 10.3390/molecules24112153.
- [164] S. Awoke, E. Dagne, R. Kumar Joshi, and C. Author, “Analysis of major components of essential oils of *Boswellia* species by GC-MS,” ~ 48 ~ *Am. J. Essent. Oils Nat. Prod.*, vol. 9, no. 1, pp. 48–54, 2021, [Online]. Available: www.essencejournal.com.
- [165] M. Nouri Barkestani *et al.*, “TNF α priming through its interaction with TNFR2 enhances endothelial progenitor cell immunosuppressive effect: new hope for their widespread clinical application,” *Cell Commun. Signal.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–16, 2021, doi: 10.1186/s12964-020-00683-x.
- [166] F. Dong, L. Zheng, and X. Zhang, “Alpha-boswellic acid accelerates acute wound healing via NF- κ B signaling pathway,” *PLoS One*, vol. 19, no. 9, p. e0308028, 2024, doi: 10.1371/journal.pone.0308028.
- [167] T. J. Ho *et al.*, “The in Vitro and in Vivo Wound Healing Properties of the Chinese Herbal Medicine ‘jinchuang Ointment,’” *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2016, 2016,

doi: 10.1155/2016/1654056.

- [168] X. W. Jiang, B. Q. Zhang, L. Qiao, L. Liu, X. W. Wang, and W. H. Yu, “Acetyl-11-keto- β -boswellic acid extracted from *Boswellia serrata* promotes Schwann cell proliferation and sciatic nerve function recovery,” *Neural Regen. Res.*, vol. 13, no. 3, pp. 484–491, 2018, doi: 10.4103/1673-5374.228732.
- [169] U. Förstermann and W. C. Sessa, “Nitric oxide synthases: Regulation and function,” *Eur. Heart J.*, vol. 33, no. 7, pp. 829–837, 2012, doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.
- [170] J. Stephenson, E. Nutma, P. van der Valk, and S. Amor, “Inflammation in CNS neurodegenerative diseases,” *Immunology*, vol. 154, no. 2, pp. 204–219, 2018, doi: 10.1111/imm.12922.
- [171] Y. Hou *et al.*, “Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease,” *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 15, no. 10, pp. 565–581, 2019, doi: 10.1038/s41582-019-0244-7.
- [172] E. Knight, T. Geetha, D. Burnett, and J. R. Babu, “The Role of Diet and Dietary Patterns in Parkinson’s Disease,” *Nutrients*, vol. 14, no. 21, pp. 1–20, 2022, doi: 10.3390/nu14214472.
- [173] D. W. Tsuang and T. D. Bird, “Genetic factors in neurodegenerative diseases,” *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.*, vol. 174, no. 1, pp. 3–4, 2017, doi: 10.1002/ajmg.b.32504.
- [174] S. Gandhi and A. Y. Abramov, “Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/428010.
- [175] H. S. Kwon and S. H. Koh, “Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes,” *Transl. Neurodegener.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–12, 2020, doi: 10.1186/s40035-020-00221-2.
- [176] A. N. Brandebura, A. Paumier, T. S. Onur, and N. J. Allen, “Astrocyte contribution to dysfunction, risk and progression in neurodegenerative disorders,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 24, no. 1, pp. 23–39, 2023, doi: 10.1038/s41583-022-00641-1.
- [177] M. V. Sofroniew and H. V. Vinters, “Astrocytes: Biology and pathology,” *Acta Neuropathol.*, vol. 119, no. 1, pp. 7–35, 2010, doi: 10.1007/s00401-009-0619-8.
- [178] G. Schiera, C. M. Di Liegro, G. Schirò, G. Sorbello, and I. Di Liegro, “Involvement of Astrocytes in the Formation, Maintenance, and Function of the Blood–Brain Barrier,” *Cells*, vol. 13, no. 2, pp. 1–23, 2024, doi: 10.3390/cells13020150.
- [179] A. Bhusal, R. Afridi, W.-H. Lee, and K. Suk, “Bidirectional Communication Between Microglia and Astrocytes in Neuroinflammation,” *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 21, no. 10, pp. 2020–2029, 2022, doi: 10.2174/1570159x21666221129121715.
- [180] A. Kumar, I. C. Fontana, and A. Nordberg, “Reactive astrogliosis: A friend or foe in the pathogenesis of Alzheimer’s disease,” *J. Neurochem.*, vol. 164, no. 3, pp. 309–324, 2023, doi: 10.1111/jnc.15565.
- [181] M. Linnerbauer and V. Rothhammer, “Protective Functions of Reactive Astrocytes Following Central Nervous System Insult,” *Front. Immunol.*, vol. 11, no. September, pp. 1–18, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.573256.
- [182] Y. Li, Z. Liu, H. Xin, and M. Chopp, “The role of astrocytes in mediating exogenous cell-based restorative therapy for stroke,” *Glia*, vol. 62, no. 1, pp. 1–16, 2014, doi: 10.1002/glia.22585.
- [183] S. Desagher, J. Glowinski, and J. Premont, “Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity,” *J. Neurosci.*, vol. 16, no. 8, pp. 2553–2562, 1996, doi: 10.1523/jneurosci.16-08-02553.1996.
- [184] J. Tanaka, K. Toku, B. Zhang, K. Ishihara, M. Sakanaka, and N. Maeda, “Astrocytes prevent neuronal death induced by reactive oxygen and nitrogen species,” *Glia*, vol. 28, no. 2, pp. 85–

- 96, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1098-1136(199911)28:2<85::AID-GLIA1>3.0.CO;2-Y.
- [185] Z. Liu and M. Chopp, “Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke,” *Prog. Neurobiol.*, vol. 144, pp. 103–120, 2016, doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.09.008.
 - [186] F. Caradonna *et al.*, “Establishment and preliminary characterization of three astrocytic cell lines obtained from primary rat astrocytes by sub-cloning,” *Genes (Basel)*, vol. 11, no. 12, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3390/genes11121502.
 - [187] A. Russo, M. Palumbo, C. Scifo, V. Cardile, M. L. Barcellona, and M. Renis, “Ethanol-induced oxidative stress in rat astrocytes: Role of HSP70,” *Cell Biol. Toxicol.*, vol. 17, no. 3, pp. 153–168, 2001, doi: 10.1023/A:1011936313510.
 - [188] J. Haorah, S. H. Ramirez, N. Floreani, S. Gorantla, B. Morsey, and Y. Persidsky, “Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 45, no. 11, pp. 1542–1550, 2008, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.030.
 - [189] M. I. Naseer *et al.*, “Neuroprotective effect of osmotin against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain,” *Cell Death Dis.*, vol. 5, no. 3, pp. 1–13, 2014, doi: 10.1038/cddis.2014.53.
 - [190] S. Leisz, S. Simmermacher, J. Prell, C. Strauss, and C. Scheller, “Nimodipine-dependent protection of schwann cells, astrocytes and neuronal cells from osmotic, oxidative and heat stress is associated with the activation of AKT and CREB,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 18, 2019, doi: 10.3390/ijms20184578.
 - [191] C. Y. Lu *et al.*, “Calycosin alleviates H₂O₂-induced astrocyte injury by restricting oxidative stress through the Akt/Nrf2/HO-1 signaling pathway,” *Environ. Toxicol.*, vol. 37, no. 4, pp. 858–867, 2022, doi: 10.1002/tox.23449.
 - [192] F. Willermain *et al.*, “Osmotic stress decreases aquaporin-4 expression in the human retinal pigment epithelial cell line, ARPE-19,” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 34, no. 2, pp. 533–538, 2014, doi: 10.3892/ijmm.2014.1791.
 - [193] P. Ravanan, I. F. Srikumar, and P. Talwar, “Autophagy: The spotlight for cellular stress responses,” *Life Sci.*, vol. 188, no. September, pp. 53–67, 2017, doi: 10.1016/j.lfs.2017.08.029.
 - [194] C. Giannasi, S. Niada, E. Della Morte, S. R. Casati, C. De Palma, and A. T. Brini, “Serum starvation affects mitochondrial metabolism of adipose-derived stem/stromal cells,” *Cytotherapy*, vol. 25, no. 7, pp. 704–711, 2023, doi: 10.1016/j.jcyt.2023.03.004.
 - [195] R. Chiarelli, C. Martino, M. C. Roccheri, and P. Cancemi, “Toxic effects induced by vanadium on sea urchin embryos,” *Chemosphere*, vol. 274, p. 129843, 2021, doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.129843.
 - [196] F. Naselli *et al.*, “An alternative approach of TUNEL assay to specifically characterize DNA fragmentation in cell model systems,” *Histochem. Cell Biol.*, vol. 162, no. 5, pp. 429–442, 2024, doi: 10.1007/s00418-024-02306-9.
 - [197] A. Meyiah, S. K. Avula, A. Al-Harrasi, and E. Elkord, “Effects of 1H-1,2,3-Triazole Derivatives of 3-O-Acetyl-11-Keto-Beta-Boswellic Acid from Boswellia sacra Resin on T-Cell Proliferation and Activation,” *Pharmaceuticals*, vol. 17, no. 12, pp. 1–14, 2024, doi: 10.3390/ph17121650.
 - [198] P. Shang *et al.*, “Acetyl-11-Keto- β -Boswellic Acid Attenuates Prooxidant and Profibrotic Mechanisms Involving Transforming Growth Factor- β 1 , and Improves Vascular Remodeling in Spontaneously Hypertensive Rats,” *Nat. Publ. Gr.*, no. December, pp. 1–12, 2016, doi: 10.1038/srep39809.
 - [199] H. R. Sadeghnia, F. Arjmand, and A. Ghorbani, “NEUROPROTECTIVE EFFECT OF BOSWELLIA SERRATA AND ITS ACTIVE CONSTITUENT ACETYL 11-KETO- β -

BOSWELLIC ACID AGAINST OXYGEN-GLUCOSE-SERUM DEPRIVATION-INDUCED CELL INJURY,” vol. 74, no. 3, pp. 911–920, 2017.

- [200] S. K. Biswas, “Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox?,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2016, pp. 17–19, 2016, doi: 10.1155/2016/5698931.
- [201] G. S. Hotamisligil, “Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders,” *Nature*, vol. 542, no. 7640, pp. 177–185, 2017, doi: 10.1038/nature21363.
- [202] G. Mariño, M. Niso-Santano, E. H. Baehrecke, and G. Kroemer, “Self-consumption: The interplay of autophagy and apoptosis,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 2, pp. 81–94, 2014, doi: 10.1038/nrm3735.
- [203] Y. Lei and D. J. Klionsky, “The emerging roles of autophagy in human diseases,” *Biomedicines*, vol. 9, no. 11, pp. 1–43, 2021, doi: 10.3390/biomedicines9111651.
- [204] N. Üremiş and M. M. Üremiş, “Oxidative/Nitrosative Stress, Apoptosis, and Redox Signaling: Key Players in Neurodegenerative Diseases,” *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, vol. 39, no. 1, 2025, doi: 10.1002/jbt.70133.
- [205] L. Galluzzi, J. M. Bravo-San Pedro, O. Kepp, and G. Kroemer, “Regulated cell death and adaptive stress responses,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 73, no. 11–12, pp. 2405–2410, 2016, doi: 10.1007/s00018-016-2209-y.
- [206] S. McComb *et al.*, “Efficient apoptosis requires feedback amplification of upstream apoptotic signals by effector caspase-3 or -7,” *Sci. Adv.*, vol. 5, no. 7, pp. 1–11, 2019, doi: 10.1126/sciadv.aau9433.
- [207] T. Yang *et al.*, “Acetyl-11-Keto-Beta Boswellic Acid (AKBA) Protects Lens Epithelial Cells Against H₂O₂-Induced Oxidative Injury and Attenuates Cataract Progression by Activating Keap1/Nrf2/HO-1 Signaling,” *Front. Pharmacol.*, vol. 13, no. July, pp. 1–14, 2022, doi: 10.3389/fphar.2022.927871.
- [208] W. J. Liu *et al.*, “P62 Links the Autophagy Pathway and the Ubiquitin-Proteasome System Upon Ubiquitinated Protein Degradation,” *Cell. Mol. Biol. Lett.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–14, 2016, doi: 10.1186/s11658-016-0031-z.
- [209] N. Mizushima and T. Yoshimori, “How to interpret LC3 immunoblotting,” *Autophagy*, vol. 3, no. 6, pp. 542–545, 2007, doi: 10.4161/auto.4600.
- [210] N. P. Qomaladewi, M. Y. Kim, and J. Y. Cho, “Autophagy and its regulation by ginseng components,” *J. Ginseng Res.*, vol. 43, no. 3, pp. 349–353, 2019, doi: 10.1016/j.jgr.2018.12.011.
- [211] N. Pineda-Ramírez, I. Alquisiras-Burgos, A. Ortiz-Plata, M. E. Ruiz-Tachiquín, M. Espinoza-Rojo, and P. Aguilera, “Resveratrol Activates Neuronal Autophagy Through AMPK in the Ischemic Brain,” *Mol. Neurobiol.*, vol. 57, no. 2, pp. 1055–1069, 2020, doi: 10.1007/s12035-019-01803-6.
- [212] L. K. Wu *et al.*, “Artemisia Leaf Extract protects against neuron toxicity by TRPML1 activation and promoting autophagy/mitophagy clearance in both in vitro and in vivo models of MPP+/MPTP-induced Parkinson’s disease,” *Phytomedicine*, vol. 104, no. June, p. 154250, 2022, doi: 10.1016/j.phymed.2022.154250.
- [213] G. Abruscato *et al.*, “In Vitro Cytotoxic Effect of Aqueous Extracts from Leaves and Rhizomes of the Seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile on HepG2 Liver Cancer Cells: Focus on Autophagy and Apoptosis,” *Biology (Basel)*, vol. 12, no. 4, 2023, doi: 10.3390/biology12040616.
- [214] Y. Y. Li, Z. H. Qin, and R. Sheng, “The Multiple Roles of Autophagy in Neural Function and Diseases,” *Neurosci. Bull.*, vol. 40, no. 3, pp. 363–382, 2024, doi: 10.1007/s12264-023-01120-

y.

- [215] W. Li, L. Ren, X. Zheng, and J. Liu, “3- O -Acetyl-11-keto- b -boswellic acid ameliorated aberrant metabolic landscape and inhibited autophagy in glioblastoma,” *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 10, no. 2, pp. 301–312, 2020, doi: 10.1016/j.apsb.2019.12.012.
- [216] Y. Takada, H. Ichikawa, V. Badmaev, and B. B. Aggarwal, “Acetyl-11-Keto- β -Boswellic Acid Potentiates Apoptosis, Inhibits Invasion, and Abolishes Osteoclastogenesis by Suppressing NF- κ B and NF- κ B-Regulated Gene Expression,” *J. Immunol.*, vol. 176, no. 5, pp. 3127–3140, 2006, doi: 10.4049/jimmunol.176.5.3127.
- [217] C. Cuaz-Pérolin *et al.*, “Antiinflammatory and antiatherogenic effects of the NF- κ B inhibitor acetyl-11-Keto- β -boswellic acid in LPS-challenged ApoE^{-/-} mice,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 28, no. 2, pp. 272–277, 2008, doi: 10.1161/ATVBAHA.107.155606.
- [218] B. S. Taylor *et al.*, “Multiple NF- κ B enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene,” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 24, pp. 15148–15156, 1998, doi: 10.1074/jbc.273.24.15148.
- [219] M. R. Turner, Freeman, M. R. Turner, and Freeman, “乳鼠心肌提取 HHS Public Access,” *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 1, pp. 139–148, 2018, doi: 10.1002/med.21599.Inducible.
- [220] A. J. P. O. De Almeida *et al.*, “ROS: Basic Concepts, Sources, Cellular Signaling, and its Implications in Aging Pathways,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2022, 2022, doi: 10.1155/2022/1225578.
- [221] I. Belenichev, O. Popazova, N. Bukhtiyarova, D. Savchenko, V. Oksenysh, and O. Kamyshnyi, “Modulating Nitric Oxide: Implications for Cytotoxicity and Cytoprotection,” *Antioxidants*, vol. 13, no. 5, 2024, doi: 10.3390/antiox13050504.
- [222] K. Katsuyama, M. Shichiri, F. Marumo, and Y. Hirata, “NO inhibits cytokine-induced iNOS expression and NF- κ B activation by interfering with phosphorylation and degradation of I κ B- α ,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 18, no. 11, pp. 1796–1802, 1998, doi: 10.1161/01.ATV.18.11.1796.
- [223] asmaa gamal, rania eed, and amira hamdy, “Frankincense (*Boswellia serrata*) exhibits antioxidant, scavenging and anti-inflammatory effects: Application on rheumatoid arthritis in rat model,” *□□□□□□□□ □□□□□□ - □□□□□□□□ □□□□□□□□ □□□□ □□□□*, vol. 27, no. 27, pp. 0–0, 2025, doi: 10.21608/pssrj.2025.342926.1327.
- [224] I. Bellezza, I. Giambanco, A. Minelli, and R. Donato, “Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1865, no. 5, pp. 721–733, 2018, doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.02.010.
- [225] Y. Ding, M. C. Chen, M. M. Wang, Y. W. Li, and A. D. Wen, “Posttreatment with 11-Keto- β -Boswellic Acid Ameliorates Cerebral Ischemia–Reperfusion Injury: Nrf2/HO-1 Pathway as a Potential Mechanism,” *Mol. Neurobiol.*, vol. 52, no. 3, pp. 1430–1439, 2015, doi: 10.1007/s12035-014-8929-9.
- [226] Y. Ding *et al.*, “Neuroprotection by acetyl-11-keto- β -boswellic acid, in ischemic brain injury involves the Nrf2/HO-1 defense pathway,” *Sci. Rep.*, vol. 4, pp. 1–9, 2014, doi: 10.1038/srep07002.
- [227] R. D’Amico *et al.*, “Modulation of NRF-2 Pathway Contributes to the Therapeutic Effects of *Boswellia serrata* Gum Resin Extract in a Model of Experimental Autoimmune Myocarditis,” *Antioxidants*, vol. 11, no. 11, 2022, doi: 10.3390/antiox11112129.
- [228] J. M. Hootman, C. G. Helmick, K. E. Barbour, K. A. Theis, and M. A. Boring, “Updated Projected Prevalence of Self-Reported Doctor-Diagnosed Arthritis and Arthritis-Attributable Activity Limitation Among US Adults, 2015–2040,” *Arthritis Rheumatol.*, vol. 68, no. 7, pp. 1582–1587, 2016, doi: 10.1002/art.39692.

- [229] A. Maglaviceanu, B. Wu, and M. Kapoor, "Fibroblast-like synoviocytes: Role in synovial fibrosis associated with osteoarthritis," *Wound Repair Regen.*, vol. 29, no. 4, pp. 642–649, 2021, doi: 10.1111/wrr.12939.
- [230] M. B. Goldring and K. B. Marcu, "Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 11, no. 3, 2009, doi: 10.1186/ar2592.
- [231] J. G. Quicke, P. G. Conaghan, N. Corp, and G. Peat, "Osteoarthritis year in review 2021: epidemiology & therapy," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 30, no. 2, pp. 196–206, 2022, doi: 10.1016/j.joca.2021.10.003.
- [232] A. Lee *et al.*, "Pathology – Research and Practice Exercise modulates the expression of IL-1 α and IL-10 in the articular cartilage of normal and osteoarthritis-induced rats," *Pathol. -- Res. Pract.*, vol. 527, no. 2, pp. 435–443, 2014, doi: 10.1016/j.gene.2013.05.069.A.
- [233] V. Molnar *et al.*, "Cytokines and Chemokines involved in osteoarthritis pathogenesis," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 17, pp. 1–23, 2021, doi: 10.3390/ijms22179208.
- [234] A. J. Schuerwegh, E. J. Dombrecht, W. J. Stevens, J. F. Van Offel, C. H. Bridts, and L. S. De Clerck, "Influence of pro-inflammatory (IL-1 α , IL-6, TNF- α , IFN- γ) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 11, no. 9, pp. 681–687, 2003, doi: 10.1016/S1063-4584(03)00156-0.
- [235] E. Horváth, Á. Sólyom, J. Székely, E. E. Nagy, and H. Popoviciu, "Inflammatory and Metabolic Signaling Interfaces of the Hypertrophic and Senescent Chondrocyte Phenotypes Associated with Osteoarthritis," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 22, pp. 1–26, 2023, doi: 10.3390/ijms242216468.
- [236] S. Liu *et al.*, "Cartilage tissue engineering: From proinflammatory and anti-inflammatory cytokines to osteoarthritis treatments (Review)," *Mol. Med. Rep.*, vol. 25, no. 3, pp. 1–15, 2022, doi: 10.3892/MMR.2022.12615.
- [237] X. Chen, C. Zhang, X. Wang, and S. Huo, "Juglanin inhibits IL-1 β -induced inflammation in human chondrocytes," *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 47, no. 1, pp. 3614–3620, 2019, doi: 10.1080/21691401.2019.1657877.
- [238] M. J. Richard, J. B. Driban, and T. E. McAlindon, "Pharmaceutical treatment of osteoarthritis," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 31, no. 4, pp. 458–466, 2023, doi: 10.1016/j.joca.2022.11.005.
- [239] J. M. LaForge *et al.*, "Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs: Clinical Implications, Renal Impairment Risks, and AKI," *Adv. Ther.*, vol. 40, no. 5, pp. 2082–2096, 2023, doi: 10.1007/s12325-023-02481-6.
- [240] A. Colletti and A. F. G. Cicero, "Nutraceutical approach to chronic osteoarthritis: From molecular research to clinical evidence," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 23, 2021, doi: 10.3390/ijms222312920.
- [241] P. J. Gregory, M. Sperry, and A. F. Wilson, "Dietary supplements for osteoarthritis," *Am. Fam. Physician*, vol. 77, no. 2, pp. 177–184, 2008.
- [242] D. Aghamohammadi, N. Dolatkah, F. Bakhtiari, F. Eslamian, and M. Hashemian, "Nutraceutical supplements in management of pain and disability in osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–28, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-78075-x.
- [243] D. J. Leong, M. Choudhury, D. M. Hirsh, J. A. Hardin, N. J. Cobelli, and H. B. Sun, "Nutraceuticals: Potential for chondroprotection and molecular targeting of osteoarthritis," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 11, pp. 23063–23085, 2013, doi: 10.3390/ijms141123063.
- [244] V. Dubey, D. Kheni, and V. Sureja, "Efficacy evaluation of standardized *Boswellia serrata* extract (Aflapin®) in osteoarthritis: A systematic review and sub-group meta-analysis study,"

Explore, vol. 20, no. 5, p. 102983, 2024, doi: 10.1016/j.explore.2024.02.001.

- [245] K. Sengupta *et al.*, “Comparative efficacy and tolerability of 5-loxinspi® and aflapinspi® against osteoarthritis of the knee: A double blind, randomized, placebo controlled clinical study,” *Int. J. Med. Sci.*, vol. 7, no. 6, pp. 366–377, 2010, doi: 10.7150/ijms.7.366.
- [246] K. Sengupta *et al.*, “Cellular and molecular mechanisms of anti-inflammatory effect of Aflapin: A novel *Boswellia serrata* extract,” *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 354, no. 1–2, pp. 189–197, 2011, doi: 10.1007/s11010-011-0818-1.
- [247] G. K. Wollenberg, L. E. DeForge, G. Bolgos, and D. G. Remick, “Differential expression of tumor necrosis factor and interleukin-6 by peritoneal macrophages in vivo and in culture,” *Am. J. Pathol.*, vol. 143, no. 4, pp. 1121–1130, 1993.
- [248] E. Confalone, G. D’Alessio, and A. Furia, “IL-6 Induction by TNF α and IL-1 β in an Osteoblast-Like Cell Line,” *Int. J. Biomed. Sci.*, vol. 6, no. 2, pp. 135–140, 2010, doi: 10.59566/ijbs.2010.6135.
- [249] S. Schweizer, A. F. W. Von Brocke, S. E. Boden, E. Bayer, H. P. T. Ammon, and H. Safayhi, “Workup-dependent formation of 5-lipoxygenase inhibitory boswellic acid analogues,” *J. Nat. Prod.*, vol. 63, no. 8, pp. 1058–1061, 2000, doi: 10.1021/np000069k.
- [250] N. K. Roy *et al.*, “An update on pharmacological potential of boswellic acids against chronic diseases,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 17, 2019, doi: 10.3390/ijms20174101.
- [251] S. Shenvi, K. R. Kiran, K. Kumar, L. Diwakar, and G. C. Reddy, “Synthesis and biological evaluation of boswellic acid-NSAID hybrid molecules as anti-inflammatory and anti-arthritic agents,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 98, pp. 170–178, 2015, doi: 10.1016/j.ejmech.2015.05.001.
- [252] L. K. Caesar and N. B. Cech, “Synergy and antagonism in natural product extracts: When 1 + 1 does not equal 2,” *Nat. Prod. Rep.*, vol. 36, no. 6, pp. 869–888, 2019, doi: 10.1039/c9np00011a.
- [253] A. Moussaieff *et al.*, “Incensole acetate, an incense component, elicits psychoactivity by activating TRPV3 channels in the brain,” *FASEB J.*, vol. 22, no. 8, pp. 3024–3034, 2008, doi: 10.1096/fj.07-101865.
- [254] F. Pollastro *et al.*, “Neuroactive and Anti-inflammatory Frankincense Cembranes: A Structure-Activity Study,” *J. Nat. Prod.*, vol. 79, no. 7, pp. 1762–1768, 2016, doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b00141.
- [255] A. Maouche, K. Boumediene, and C. Baugé, “Bioactive Compounds in Osteoarthritis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Roles,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 25, no. 21, 2024, doi: 10.3390/ijms252111656.
- [256] V. K. Alluri, S. Kundimi, K. Sengupta, T. Golakoti, and E. K. Kilari, “An Anti-Inflammatory Composition of *Boswellia serrata* Resin Extracts Alleviates Pain and Protects Cartilage in Monoiodoacetate-Induced Osteoarthritis in Rats,” vol. 2020, 2020.
- [257] I. B. Cole, J. Cao, A. R. Alan, P. K. Saxena, and S. J. Murch, “Comparisons of *Scutellaria baicalensis*, *Scutellaria lateriflora* and *Scutellaria racemosa*: Genome size, antioxidant potential and phytochemistry,” *Planta Med.*, vol. 74, no. 4, pp. 474–481, 2008, doi: 10.1055/s-2008-1034358.
- [258] T. Syrovets *et al.*, “Acetyl-Boswellic Acids Inhibit Lipopolysaccharide-Mediated TNF- α Induction in Monocytes by Direct Interaction with I κ B Kinases,” 2015, doi: 10.4049/jimmunol.174.1.498.
- [259] K. Knab, D. Chambers, and G. Krönke, “Synovial Macrophage and Fibroblast Heterogeneity in Joint Homeostasis and Inflammation,” *Front. Med.*, vol. 9, no. April, pp. 1–11, 2022, doi: 10.3389/fmed.2022.862161.
- [260] M. K. Kaneva, M. J. P. Kerrigan, P. Grieco, G. P. Curley, I. C. Locke, and S. J. Getting,

- “Chondroprotective and anti-inflammatory role of melanocortin peptides in TNF- α activated human C-20/A4 chondrocytes,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 167, no. 1, pp. 67–79, 2012, doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01968.x.
- [261] E. Gremese, B. Tolusso, D. Bruno, S. Perniola, G. Ferraccioli, and S. Alivernini, “The forgotten key players in rheumatoid arthritis: IL-8 and IL-17 – Unmet needs and therapeutic perspectives,” *Front. Med.*, vol. 10, no. March, pp. 1–10, 2023, doi: 10.3389/fmed.2023.956127.
- [262] M. P. Vincenti and C. E. Brinckerhoff, “Early response genes induced in chondrocytes stimulated with the inflammatory cytokine interleukin-1 β ,” 2001.
- [263] M. Y. Ansari, N. Ahmad, and T. M. Haqqi, “Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 129, no. June, 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110452.
- [264] J. Sun, Y. Tsuang, W. Huang, L. Chen, Y. Hang, and F. Lu, “Menadione-induced cytotoxicity to rat osteoblasts,” vol. 53, pp. 967–976, 1997.
- [265] E. L. Taylor, J. A. Collins, P. Gopalakrishnan, S. Chubinskaya, and R. F. Loeser, “Age and oxidative stress regulate Nrf2 homeostasis in human articular chondrocytes,” vol. 31, no. 9, pp. 1214–1223, 2024, doi: 10.1016/j.joca.2023.05.004.Age.
- [266] F. Rousset *et al.*, “IL-1 β mediates MMP secretion and IL-1 β neosynthesis via upregulation of p22phox and NOX4 activity in human articular chondrocytes,” *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 23, no. 11, pp. 1972–1980, 2015, doi: 10.1016/j.joca.2015.02.167.
- [267] F. Forouzanfar, H. Hosseinzadeh, A. E. Bideskan, and H. R. Sadeghnia, “Aqueous and Ethanolic Extracts of *Boswellia serrata* Protect Against Focal Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury in Rats,” vol. 1967, no. July, pp. 1954–1967, 2016.
- [268] Y. Bian *et al.*, “Immunomodulatory roles of metalloproteinases in rheumatoid arthritis,” no. November, pp. 1–14, 2023, doi: 10.3389/fphar.2023.1285455.
- [269] Q. Hu and M. Ecker, “Overview of MMP-13 as a promising target for the treatment of osteoarthritis,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 4, pp. 1–22, 2021, doi: 10.3390/ijms22041742.
- [270] K. Yamamoto, H. Okano, W. Miyagawa, and R. Visse, “MMP-13 is constitutively produced in human chondrocytes and co- endocytosed with ADAMTS-5 and TIMP-3 by the endocytic receptor,” *Matrix Biol.*, vol. 56, pp. 57–73, 2016, doi: 10.1016/j.matbio.2016.03.007.
- [271] K. Zhao, J. Ruan, L. Nie, X. Ye, and J. Li, “Effects of synovial macrophages in osteoarthritis,” *Front. Immunol.*, vol. 14, no. July, pp. 1–14, 2023, doi: 10.3389/fimmu.2023.1164137.
- [272] R. Dreier, S. Wallace, S. Fuchs, P. Bruckner, and S. Grässel, “Paracrine interactions of chondrocytes and macrophages in cartilage degradation : articular chondrocytes provide factors that activate macrophage-derived pro-gelatinase B (pro-MMP-9),” 2001.
- [273] J. Zhou *et al.*, “Acetyl-11-keto- β -boswellic acid restrains the progression of synovitis in osteoarthritis via the Nrf2/HO-1 pathway,” *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).*, vol. 56, no. 11, pp. 1644–1658, 2024, doi: 10.3724/abbs.2024102.
- [274] E. J. Calabrese, G. Dhawan, R. Kapoor, M. P. Mattson, and S. I. Rattan, “Curcumin and hormesis with particular emphasis on neural cells,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 129, no. April, pp. 399–404, 2019, doi: 10.1016/j.fct.2019.04.053.
- [275] A. Murakami, “Impact of hormesis to deepen our understanding of the mechanisms underlying the bioactivities of polyphenols,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 86, no. Figure 1, p. 103074, 2024, doi: 10.1016/j.copbio.2024.103074.