



Carmela Spagnuolo, Stefania Moccia, Idolo Tedesco, Eva Adabbo, Carmen Cervellera, Ylenia Maria Penna, Gian Luigi Russo
Istituto di Scienze dell'Alimentazione, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 83100, Avellino
carmela.spagnuolo@cnr.it



Premesse. Le malattie neurodegenerative includono un gruppo eterogeneo di patologie croniche e incurabili che, in termini di sofferenza umana e costo economico per la società, rappresentano la più alta percentuale di malattie nei paesi ad alto reddito (1). L'assenza di cure efficaci spinge la ricerca ad investigare nuove possibili strategie utili a prevenire e/o trattare tali condizioni patologiche. Diversi studi mostrano come i polifenoli, componenti non nutrizionali presenti negli alimenti, possono esercitare effetti neuroprotettivi (2). Essi sono noti principalmente per le loro proprietà antiossidanti, tuttavia sono anche in grado di modulare numerosi processi biologici alla base dell'insorgenza delle malattie neurodegenerative (3).

Obiettivi. L'obiettivo della presente comunicazione è stato valutare il potenziale neuroprotettivo di un estratto metanolico ottenuto da bacche di *Sambucus nigra*.

Tabella 1. Determinazione in vitro del contenuto di polifenoli misurato con il metodo Folin-Ciocalteu e dell'attività antiossidante dell'estratto di *S. nigra* e di *R. procerus* con i metodi FRAP, ABTS e DPPH; i dati sono riferiti a 1 mg/ml (p/v) degli estratti e ottenuti da tre determinazioni indipendenti \pm ds

	FOLIN μ M eqQ	ANTOCIANINE mg/L eqC3-Glu	FLAVONOIDI μ M eqQ	FRAP μ M eqQ	ABTS % quenching	DPPH % quenching
<i>Sambucus nigra</i>	72.1 \pm 2.9	23.8 \pm 1.7	124.9 \pm 2.8	293.6 \pm 8.9	29.7 \pm 0.4	8.8 \pm 0.27
<i>Rubus procerus</i>	53.9 \pm 0.01	8.3 \pm 0.1	70.2 \pm 1.0	136.2 \pm 2.8	33.2 \pm 2.4	10.7 \pm 0.07

Metodi. Per riprodurre *in vitro* le caratteristiche dei processi neurodegenerativi, le cellule IMR-32, derivate da un neuroblastoma umano, sono state differenziate con bromodeossiridina e dibutilil-cAMP (IMR-32d) e trattate con il peptide beta-amiloide oligomerizzato ($A\beta$) o con il perossido di idrogeno (H_2O_2). Le IMR-32d sono state trattate con l'estratto metanolico di *S. nigra* (S) e con gli agenti neutossici come indicato nelle figure ed è stata valutata la vitalità cellulare, mediante saggio MTT e la modulazione dello stato redox (ROS, glutazione e PMRS).

Risultati.

L'estratto bioattivo di *S. nigra* è stato ottenuto mediante estrazione con metanolo acidificato (90% metanolo e 10% HCL 0.01N). Utilizzando il metodo di Folin-Ciocalteu è stato determinato il contenuto di polifenoli totali presenti in esso ed è stato confrontato con quello dell'estratto di *Rubus procerus*, uno dei frutti rossi più comuni e studiati (Tabella 1). Dai dati ottenuti appare evidente come nell'estratto di *S. nigra* il contenuto di polifenoli (circa 72 μ M di Quercetina equivalente, EqQ) sia maggiore rispetto a quello misurato nell'estratto di *R. procerus* (54 μ M EqQ). Lo stesso risultato è stato evidenziato relativamente alla misurazione del contenuto di antocianine e flavonoidi.

Al fine di determinare il potere antiossidanti in vitro degli estratti metanolici di *S. nigra* e *R. procerus*, sono stati eseguiti tre differenti saggi, FRAP, ABTS e DPPH. I risultati dei test effettuati hanno evidenziato che gli estratti posseggono una notevole capacità antiossidante, probabilmente correlata al contenuto polifenolico.

Il trattamento delle IMR-32 differenziate con concentrazioni crescenti (0.1–1 mg/ml, p/v) dell'estratto di *S. nigra* non influenza la vitalità cellulare rispetto al controllo (dati non mostrati). Per verificare il potenziale effetto neuroprotettivo dell'estratto in esame, le cellule differenziate sono state pre-trattate per 24 h con 0.5 mg/ml dell'estratto metanolico e, in seguito, sono state stimulate con 100 μ M di H_2O_2 e con 20 μ M di $A\beta$ per 24 h. Come mostrato in Fig. 1, il pre-trattamento protegge significativamente dalla tossicità indotta dal perossido di idrogeno e dall' $A\beta$. Tale dato appare ancora più interessante se confrontato al risultato ottenuto pre-trattando per 24 h le cellule con l'estratto di *R. procerus* il quale non evidenzia nessuna attività protettiva contro gli stimoli neurotossici.

Inoltre in questo modello sperimentale è stato evidenziato che *S. nigra* ripristina i livelli di ROS e glutazione alterati dal trattamento con le molecole neurotossiche (Fig.2 A e B). Tuttavia, di per sé provoca un incremento dei livelli di ROS intracellulari (15-20% rispetto al controllo, Fig. 2A) e una diminuzione del glutazione (15% rispetto al controllo, Fig. 2B). Pertanto è probabile che l'estratto di *S. nigra* attraverso una modesta attività pro-ossidante induca una risposta adattativa responsabile della protezione dall'azione delle molecole neurotossiche. L'estratto inoltre rafforza le difese antiossidanti anche aumentando l'attività del PMRS (Plasma Membrane Redox System), complesso enzimatico coinvolto nei processi neurodegenerativi (Fig.2C).

Conclusioni. Dall'analisi dei dati raccolti ipotizziamo che l'attività pro-ossidante dell'estratto metanolico di *S. nigra* possa esercitare una risposta adattativa responsabile della protezione contro l'azione esercitata dalle molecole neurotossiche. Gli studi futuri saranno dedicati ad approfondire questi dati preliminari, cercando di definire i dettagli molecolari e caratterizzare chimicamente i componenti bioattivi responsabili dell'attività biologica emersa.

Referenze.

- https://www.who.int/health-topics/brain-health#tab=tab_1;
- Mol. Nutr. Food Res. 2024, 68, 2300472;
- Curr Top Med Chem. 2016;16(17):1943-50

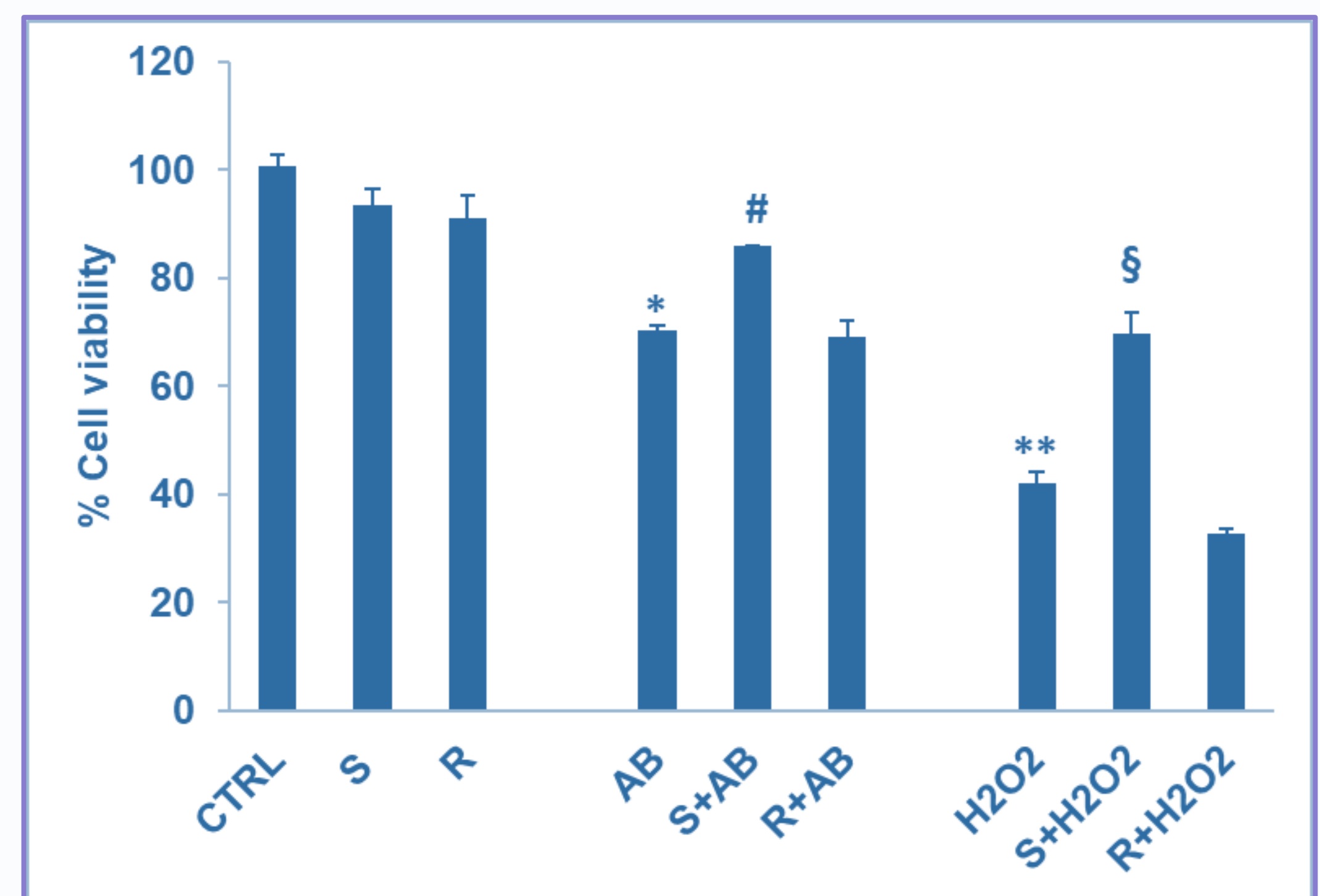


Fig.1 Effetto neuroprotettivo dell'estratto *S.nigra* (S 0.5 mg/ml, 24h di preincubazione) contro la tossicità indotta dall' $A\beta$ (20 μ M per 48 h) e H_2O_2 (100 μ M per 24 h). I risultati sono stati espressi in % rispetto al controllo, e le barre indicano la media di tre esperimenti \pm ds. I simboli indicano la significatività calcolata mediante il test-t di Student: # p<0.01 e ## p<0.001 rispetto al controllo, * p<0.005 rispetto all' $A\beta$, §p<0.005 rispetto all' H_2O_2 .

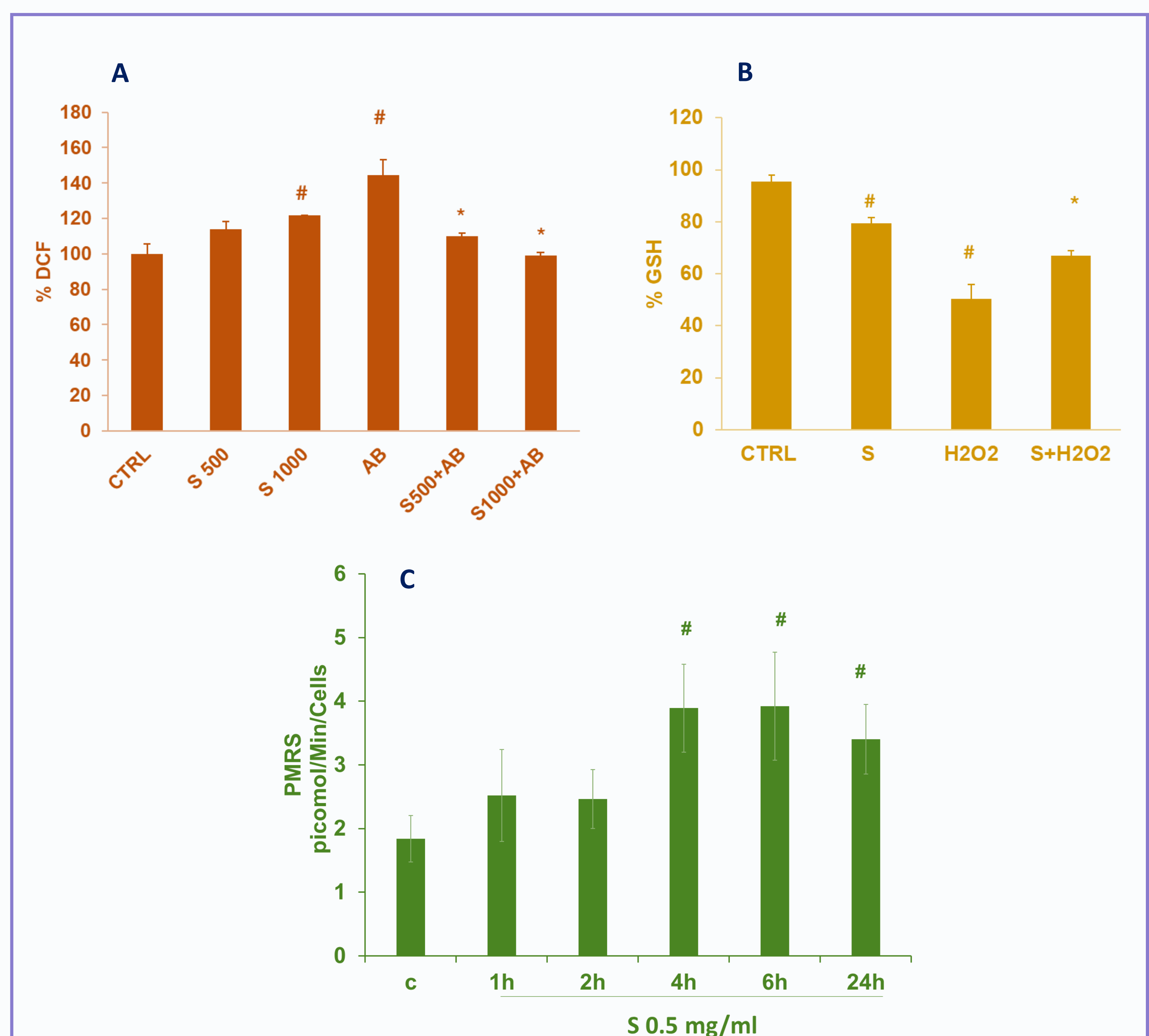


Fig.2 A. L'estratto di *S. nigra* (preincubazione 0.5 mg/ml per 24 h) riduce la formazione dei ROS intracellulari indotta dall' $A\beta$ (20 μ M per 2 h). I livelli di ROS sono espressi come fluorescenza di DCF (% controllo). **B.** L'estratto ripristina i livelli di GSH drasticamente ridotti dal trattamento con H_2O_2 (100 μ M per 2h). **C.** Incremento tempo dipendente dell'attività del PMRS in cellule IMR-32d trattate con 0.5 mg/ml di estratto. Le barre nel grafico indicano l'errore statistico, mentre i simboli indicano la significatività, calcolata mediante test-t di Student: # p<0.01, ## p<0.001 rispetto al controllo, * p<0.01, ** p<0.001 rispetto all' $A\beta$ o all' H_2O_2 .