

# Forum

## **Agricoltura, Alimentazione e Salute**

*Bologna, 21 Febbraio 2013*

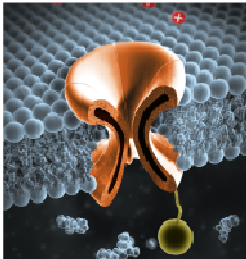
### **Metodologie analitiche di screening per la valutazione della sicurezza e dell'attività nutraceutica di matrici alimentari**

**Mara Mirasoli, Massimo Guardigli, Elisa Michelini, Aldo Roda**  
*Dipartimento di Chimica "G. Ciamician", Università di Bologna*

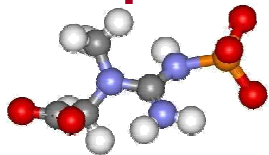
**Patrizia Simoni**  
*Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Bologna*

# Nutraceutici: perché i test di screening?

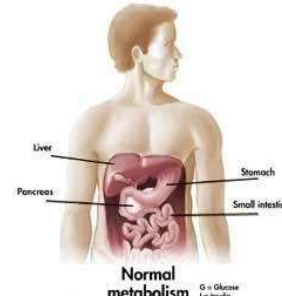
**Comprendere il meccanismo d'azione**



**Scoprire nuovi principi attivi**



**Conoscere la farmacocinetica e il metabolismo**



**Conoscere e quindi minimizzare gli effetti avversi**



**Valutare l'effettiva efficacia**



# Nutraceutici: test di screening



## II livello

Test su sistemi cellulari



## R R R

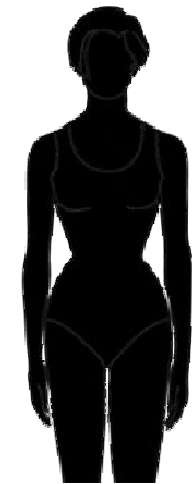
## III livello

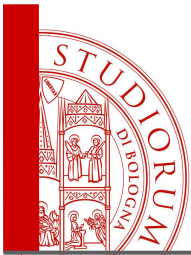
Test in vivo



## I livello

Test biochimici in vitro su recettori o enzimi isolati





# Test di screening di primo livello: test di attività o di tossicità

Nutraceutico

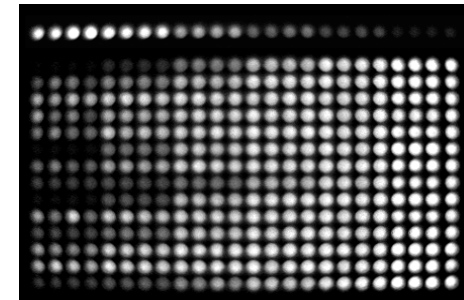


- Legame alla proteina o al recettore
- Inibizione attività enzimatica
- Attività antiossidante



## I livello

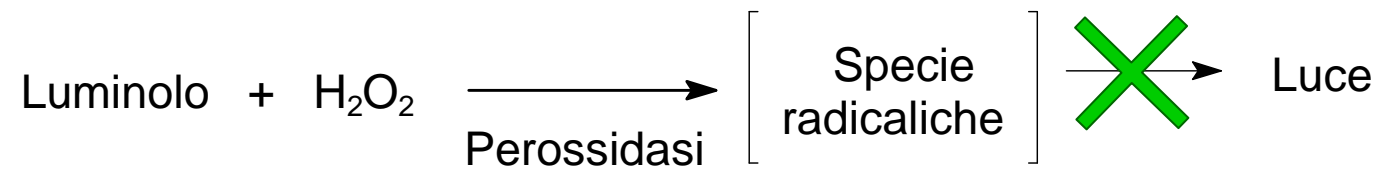
Test biochimici in vitro su recettori o enzimi isolati





# Misura dell'attività antiossidante mediante misure di chemiluminescenza

**Attività antiossidante** → capacità di interagire, disattivandoli, con i radicali liberi prodotti da fenomeni di ossidazione, radiazione UV, ecc.

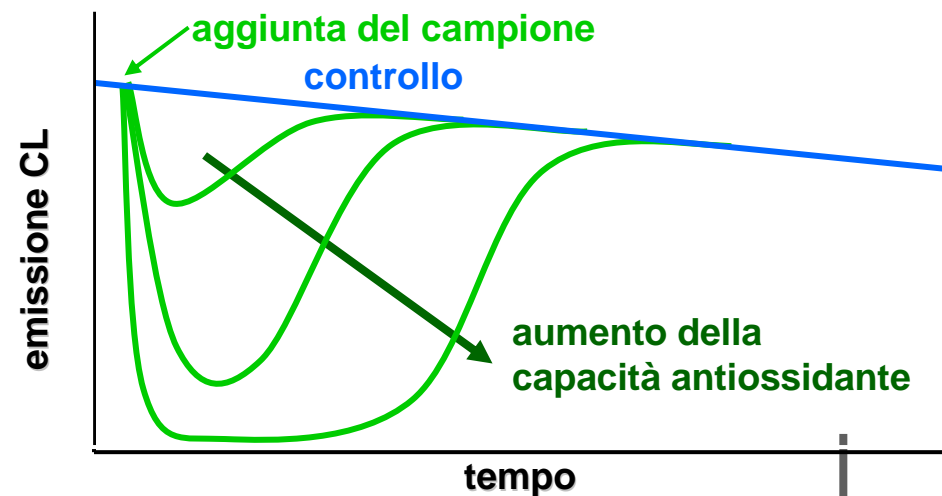


Reazione chimica che porta alla produzione di luce.

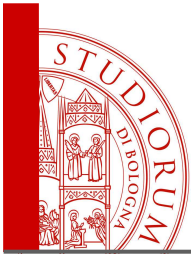


La durata dello spegnimento dell'emissione chemiluminescente è funzione dell'attività antiossidante del campione.

**Scavenger di radicali**







# Misura dell'attività antiossidante di estratti di uva

La misura di attività antiossidante è stata effettuata su estratti acquosi ed alcolici di mosti ottenuti dalla spremitura di due tipi di uve.

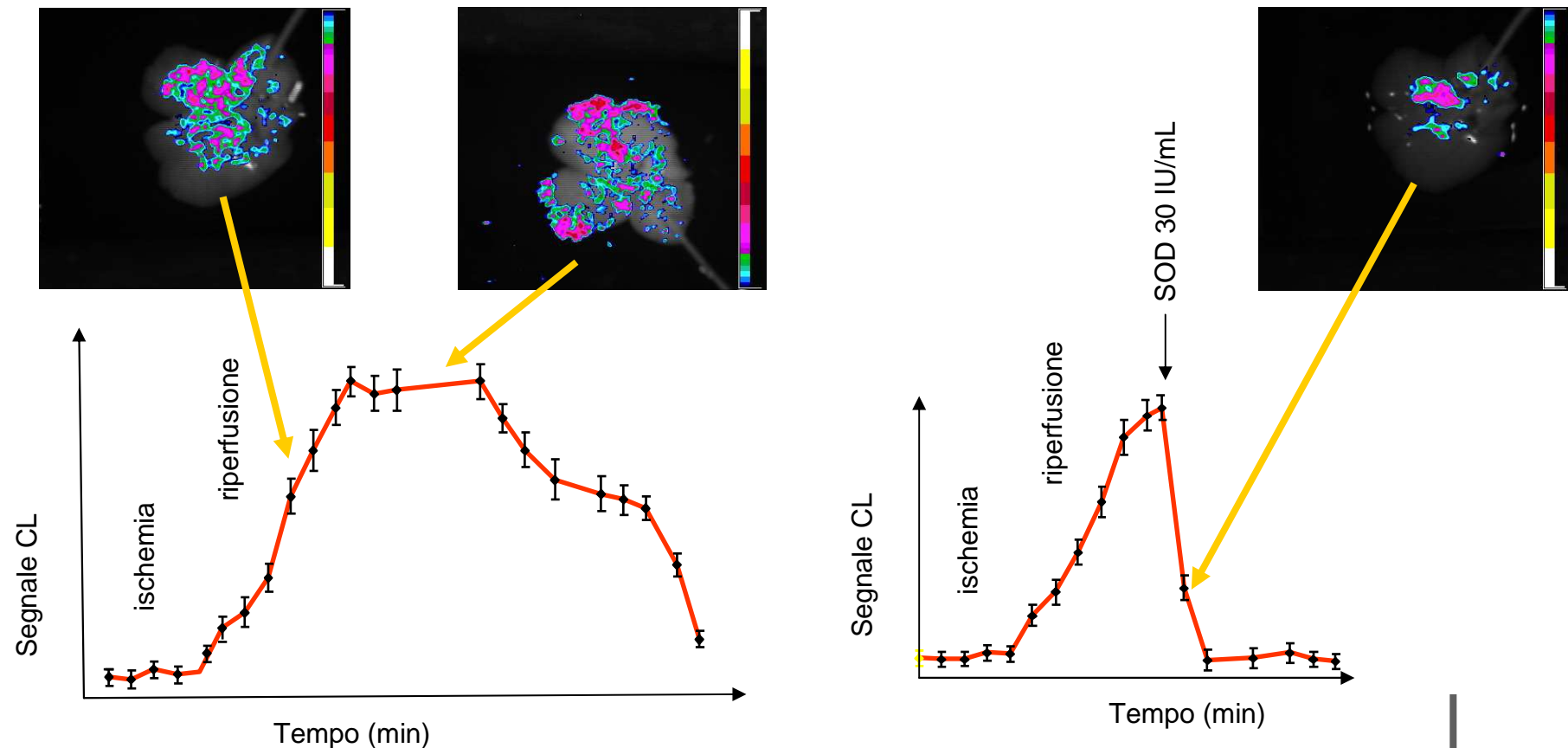
- **Uva 1** : estratto acquoso (**estratto 1A**) ed estratto alcolico (**estratto 1B**)
- **Uva 2** : estratto acquoso (**estratto 2A**) ed estratto alcolico (**estratto 2B**)

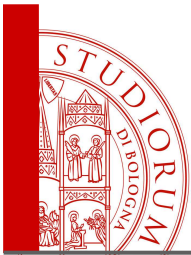
Gli estratti sono stati analizzati dopo diluizione per ottimizzare le condizioni di analisi e ridurre l'interferenza dell'alcol etilico.

<b><i>Estratto</i></b>	<b><i>Attività antiossidante complessiva (espressa in <math>\mu\text{M}</math> di acido ascorbico)</i></b>
<b><i>Estratto 1A</i></b>	$72 \pm 15 \mu\text{M}$
<b><i>Estratto 1B</i></b>	$300 \pm 70 \mu\text{M}$
<b><i>Estratto 2A</i></b>	$82 \pm 20 \mu\text{M}$
<b><i>Estratto 2B</i></b>	$460 \pm 100 \mu\text{M}$

# Misura dell'attività antiossidante su organi isolati e riperfusi

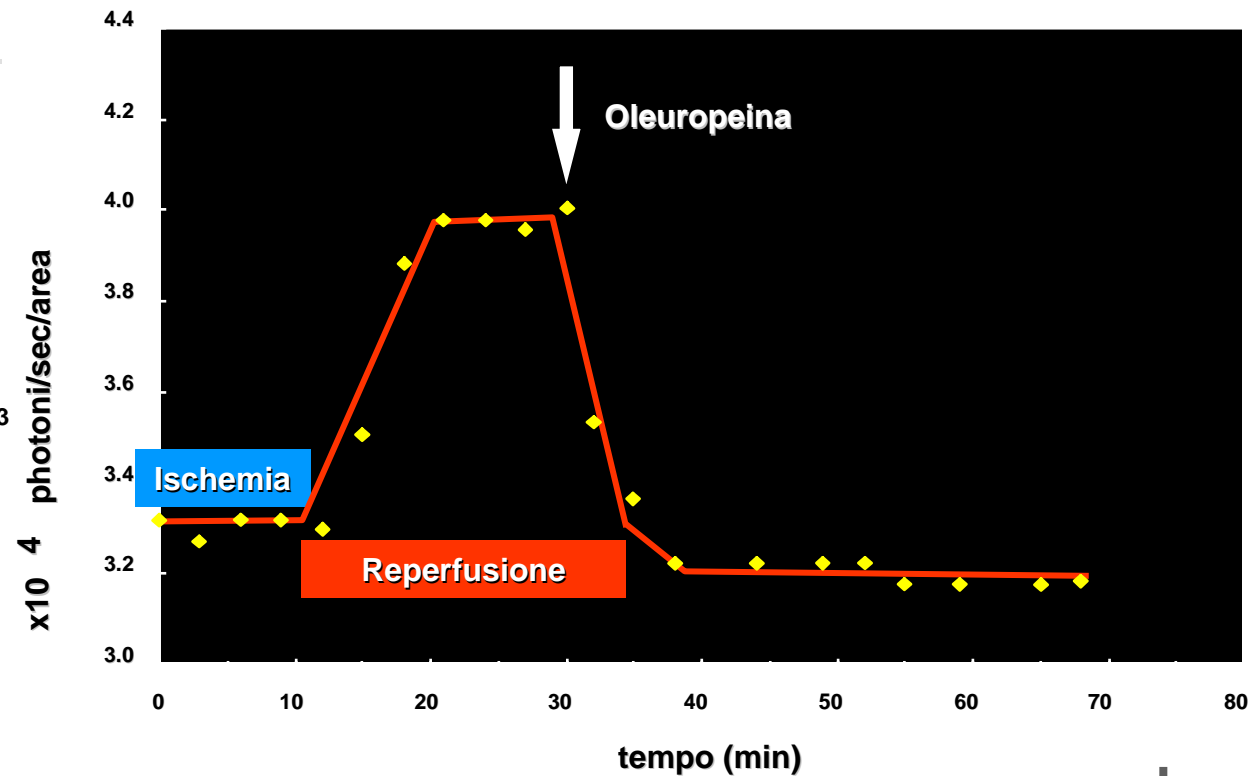
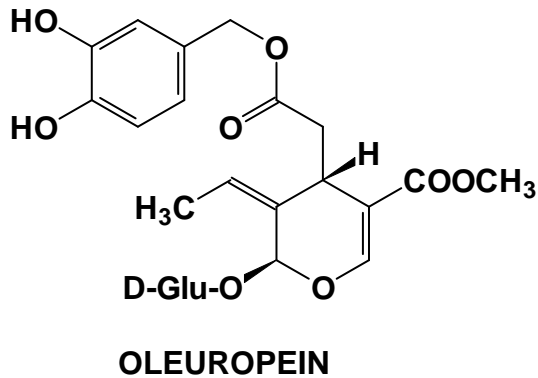
**Fegato di ratto espiantato.** La riperfusione con soluzione ossigenata causa produzione di *radicali liberi dell'ossigeno* (ROS), che possono essere visualizzati aggiungendo lucigenina (una specie CL che reagisce con lo ione  $O_2^{\bullet-}$ ) al liquido di riperfusione.





# Misura dell'attività antiossidante su organi isolati e riperfusi

Questo modello può essere usato per la valutazione del potere antiossidante in un organo.





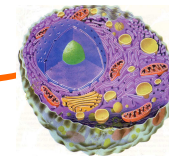
# Test di screening su sistemi cellulari: test di attività o di tossicità



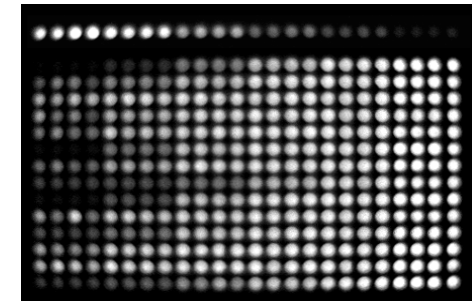
## Il livello

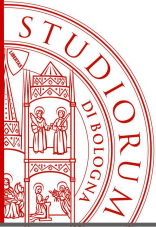
Test su sistemi cellulari

Nutraceutico



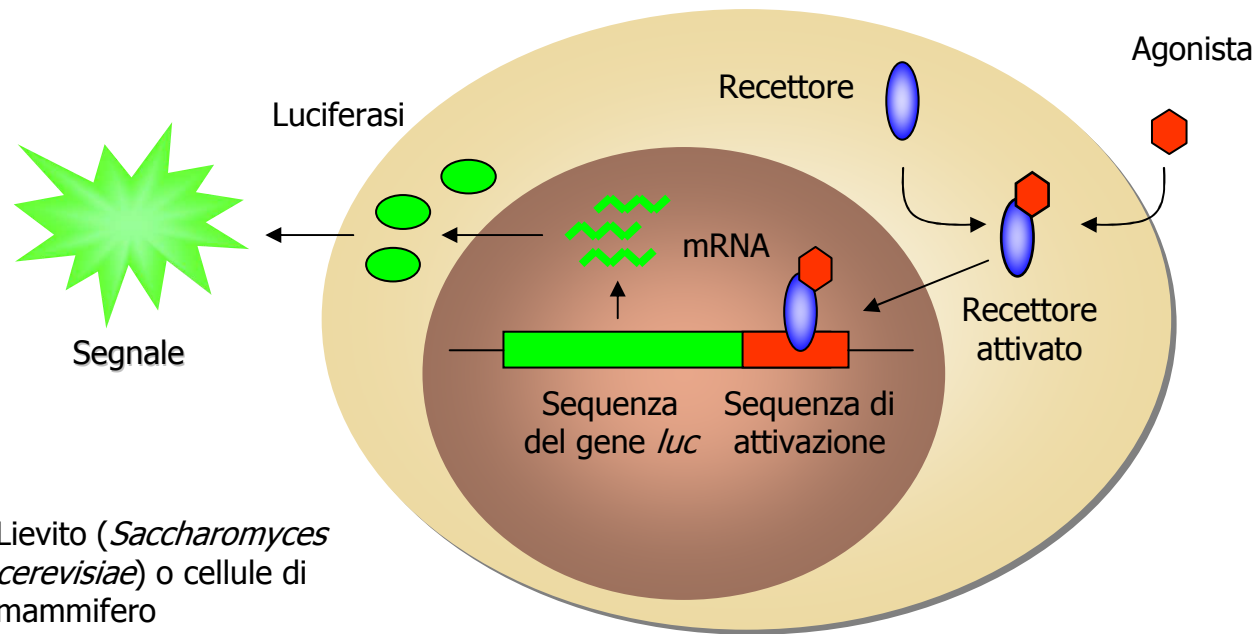
Risposta  
misurabile





# Biosensori cellulari bioluminescenti: gene reporter technology

Valutazione dell'attività di agonista o antagonista ad un recettore di interesse. Una cellula viene modificata geneticamente introducendo un **gene reporter bioluminescente** la cui espressione è regolata da un recettore coinvolto nel processo che si vuole studiare: quando il recettore viene attivato dalla sostanza in esame, esso induce l'espressione del gene reporter e la **sintesi della proteina reporter**, rivelabile mediante bioluminescenza.

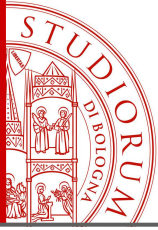


**Test funzionale**  
(attivazione di un  
recettore e "signalling")

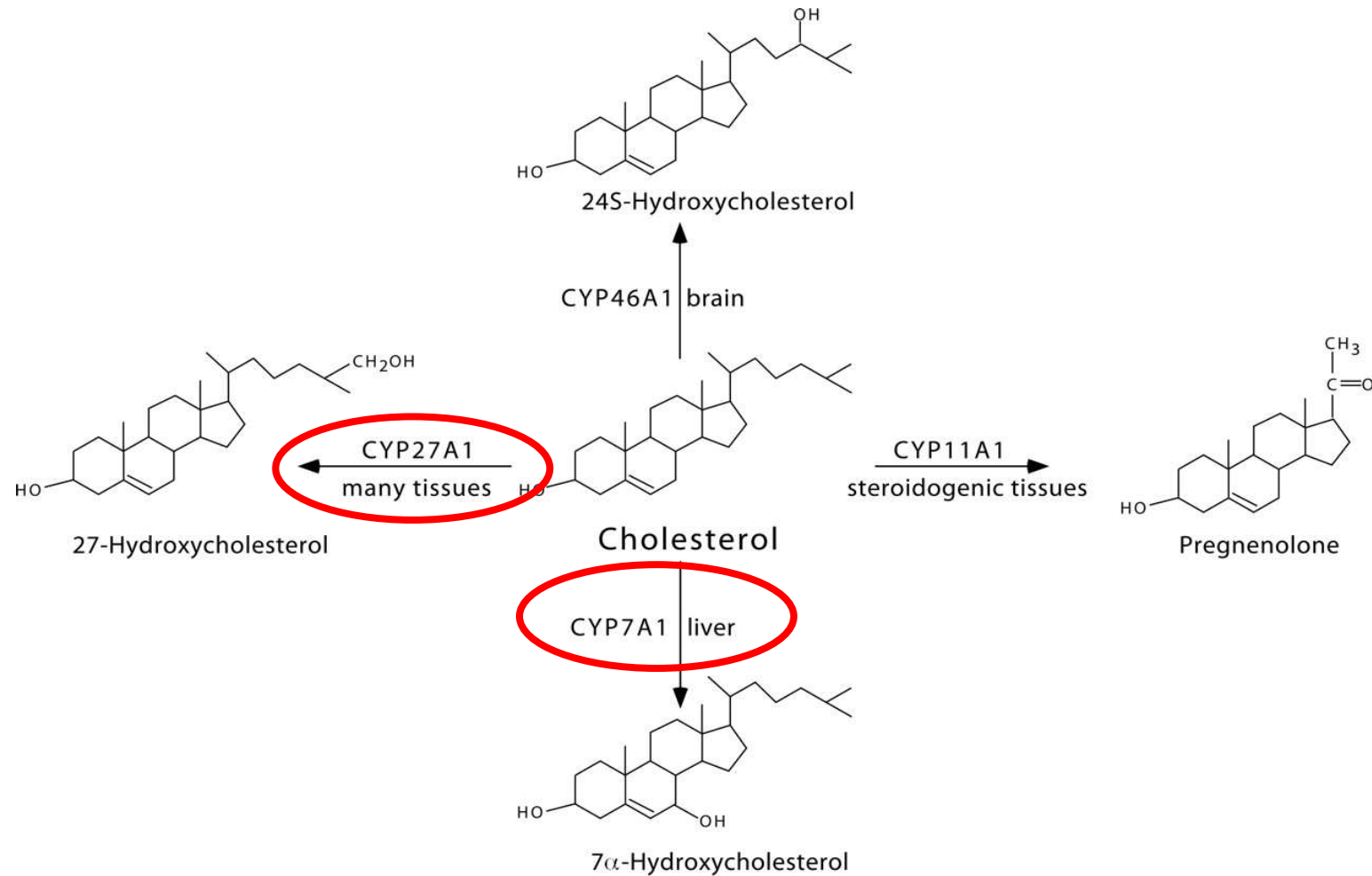
Uso di **proteine o  
recettori umani**

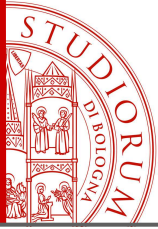
Alta produttività,  
riproducibilità e  
standardizzabilità

Valutazione dell'attività  
biologica e della  
biodisponibilità



# Studio dell'effetto di estratti d'uva sulla regolazione dei principali enzimi coinvolti nel CATABOLISMO DEL COLESTEROLO



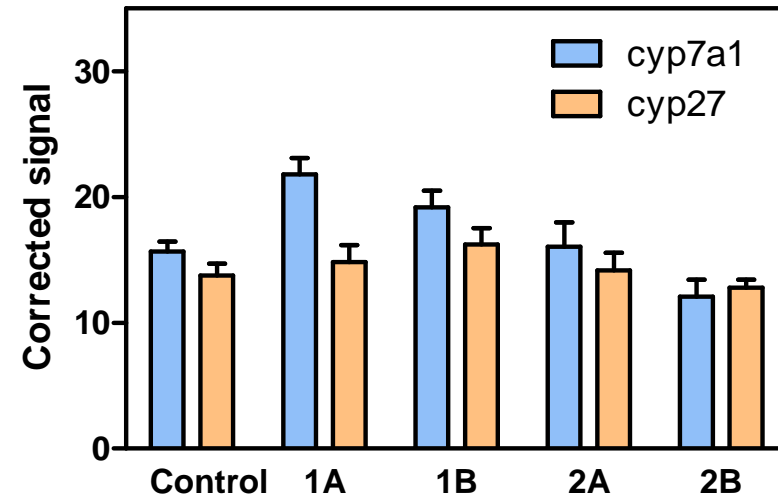


# Risultati preliminari

## Effetto dei campioni su cyp7a1 e cyp27

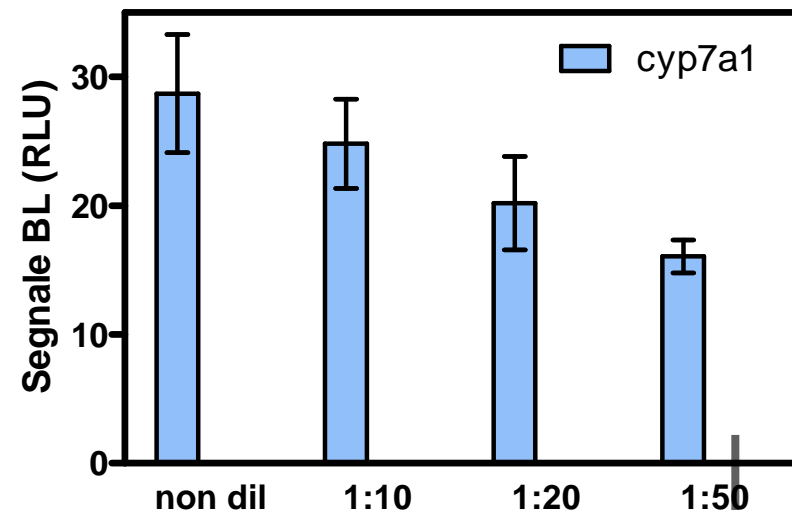
L'estratto 1 induce l'attività trascrizionale di cyp7a1, il principale enzima responsabile dell'eliminazione del colesterolo dall'organismo.

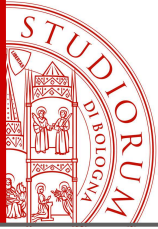
Entrambi gli estratti non hanno mostrato effetti significativi sul promotore di cyp27.



## RISPOSTA DOSE-DIPENDENTE:

Cellule trattate con diluizioni dell'estratto 1 mostrano una risposta dose-dipendente sulla regolazione del promotore di cyp7a1.





# Test in vivo su animali da esperimento: test di attività o tossicità

**Nutraceutico**



**Risposta  
misurabile**



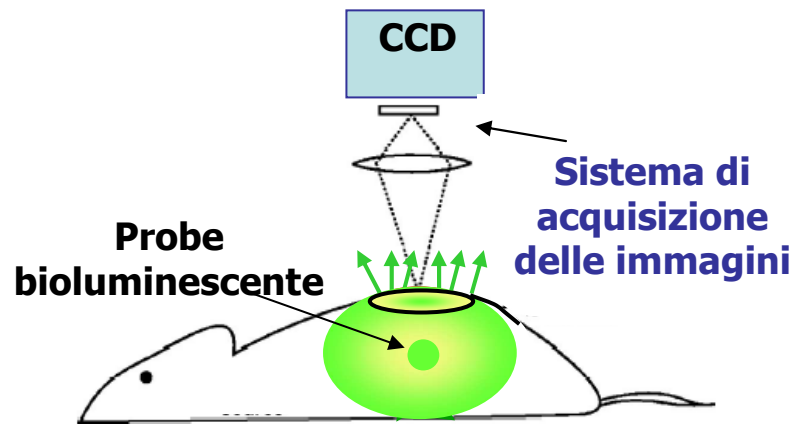
**R R R**

**III livello**  
Test in vivo



# Imaging in vivo in bioluminescenza

Metodo non invasivo per seguire un evento fisio-patologico attraverso la misura spazio-temporale della luce emessa da un probe bioluminescente in piccoli animali.



La luce passa attraverso i tessuti

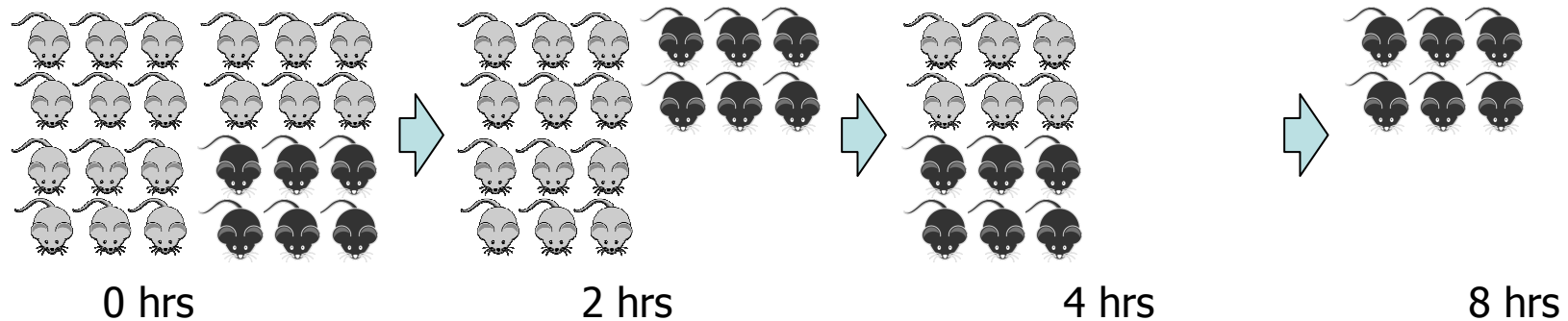


L'imaging in bioluminescenza utilizza la luciferasi come sorgente biologica di luce, che può essere geneticamente progettata in modo da riportare in maniera non invasiva la presenza o l'attivazione di uno specifico evento biologico.

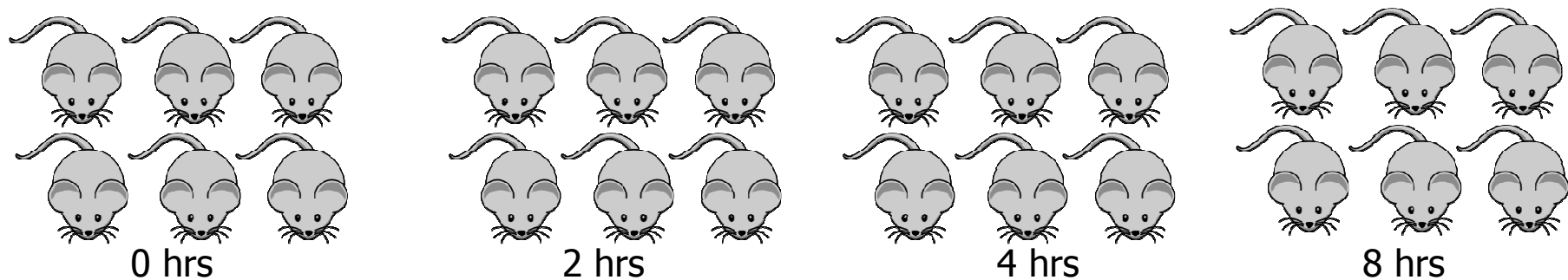


# Imaging in vivo in bioluminescenza

**Metodi tradizionali: gruppi di animali sacrificati a tempi differenti**



**Imaging ottico in vivo: gli stessi animali sono seguiti nel tempo**

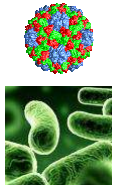


**Monitoraggio continuo**

**Ridotta variabilità**

**3R**

# Imaging in vivo in bioluminescenza

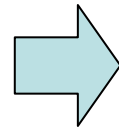


**1a.** Somministrazione di cellule transgeniche bioluminescenti

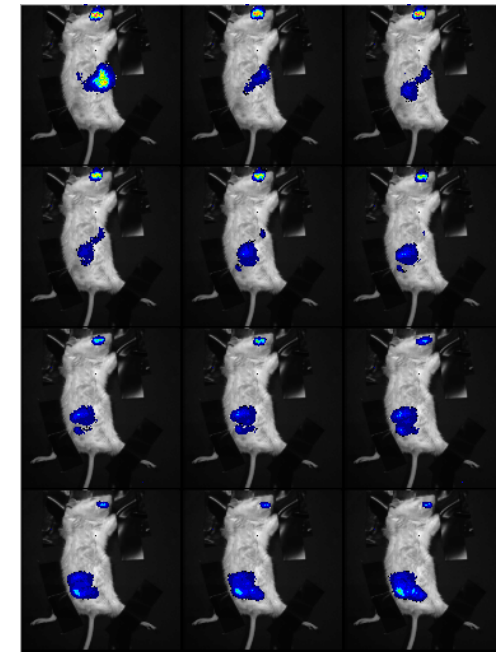
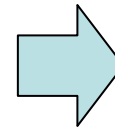
**oppure**



**1b.** Produzione di animali transgenici



**2.** Somministrazione della sostanza da analizzare

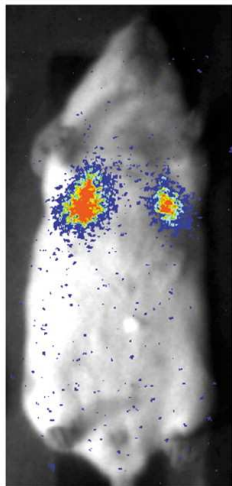


**3.** Il processo fisiopatologico di interesse viene seguito nel tempo nello stesso animale

# Imaging in vivo in bioluminescenza

Sono stati sviluppati numerosi modelli per imaging BL in vivo, inoculando cellule geneticamente modificate o creando animali transgenici. Alcuni esempi ...

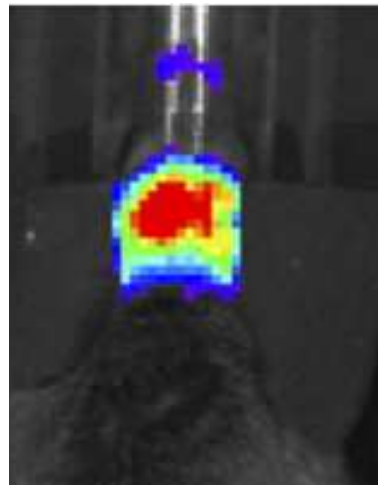
## Infezioni batteriche



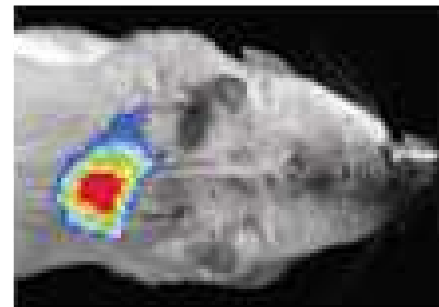
**Inflammation:  
attività  
mieloperossidasi**



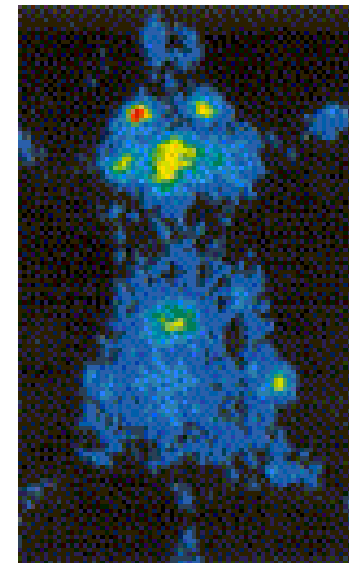
## Accumulo di placche amiloidi

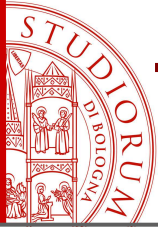


**Progressione  
tumorale**



## Fattori di trascrizione (es. NF- $\kappa$ B, AP-1)

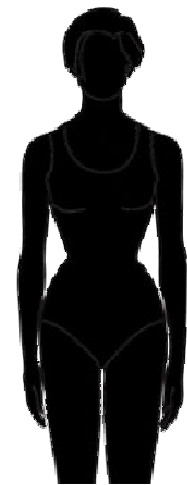




# Test in vivo: biodisponibilità e metabolismo



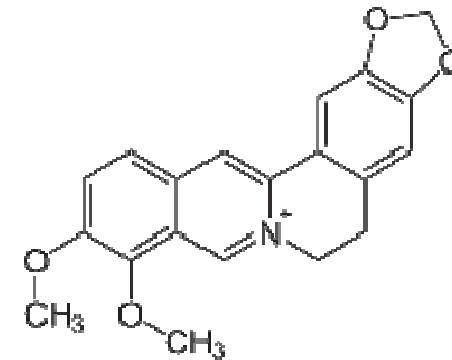
**III livello**  
Test in vivo



# Studio della farmacocinetica e del metabolismo di berberina



Presente nelle radici, nei rizomi, nelle cortecce e nei fusti di numerose varietà di piante dei generi: *Berberis*, *Hydrastis*, *Coptis*, *Mahonia*, *Adonis*, *Xanthorrhiza* e *Thalictrum*.



BERBERINA

Alcaloide  
tetraidroisochinolinico

## PROPRIETA'

- Antisettico, antibatterico
- Ipolipidemizzante

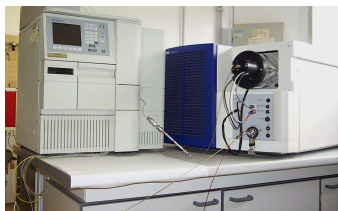
# Farmacocinetica della berberina dopo somministrazione all'uomo



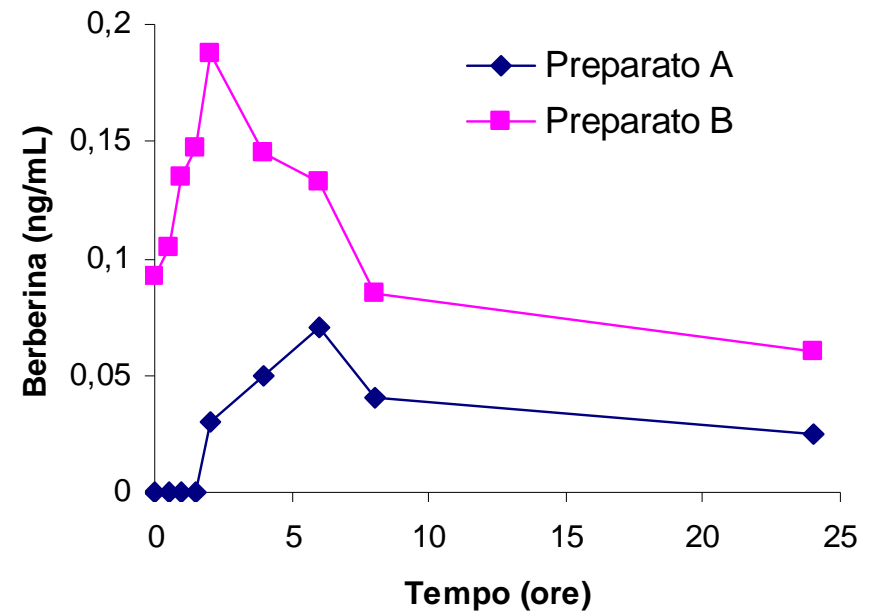
1. Somministrazione di preparato a base di berberina (500 mg)



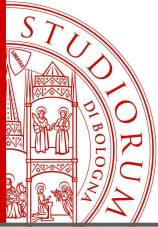
2. Prelievo di campioni di sangue ad intervalli di tempo



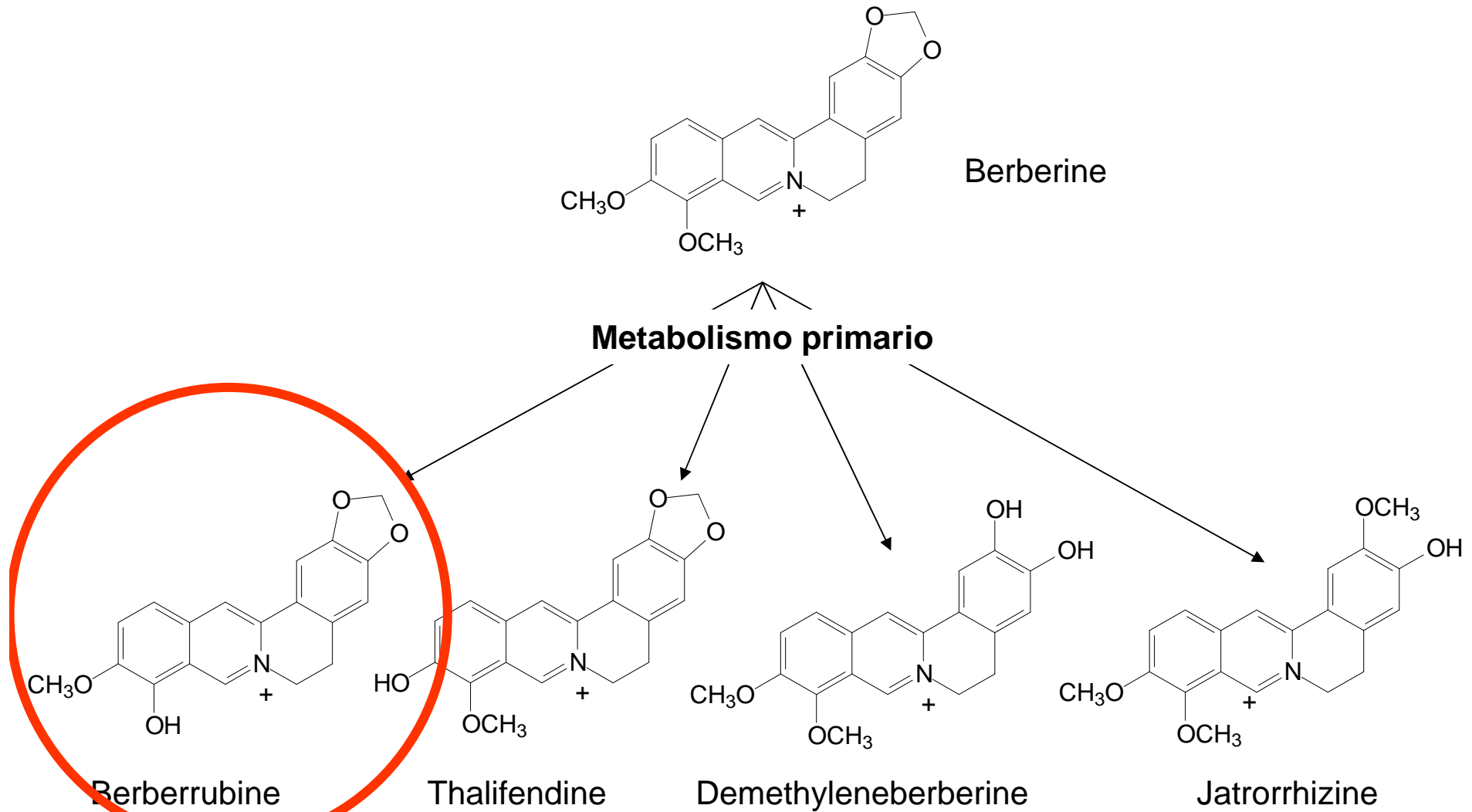
3. Analisi mediante cromatografia accoppiata con spettrometria di massa







# Metabolismo della berberina nell'uomo e studio delle proprietà chimico-fisiche



## I nutraceutici ...






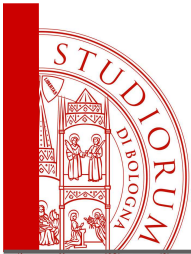
ieri ...



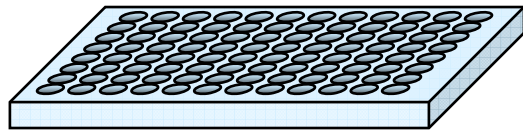
... da oggi in poi

# Test di screening

	 Test bio- chimici	 Test cellulari	 Test in vivo
Rapidità, basso costo	✓	✓ - X	X
Risultati indipendenti da variabilità biologica individuale	✓	✓	X
Informazioni su capacità di agire a livello cellulare	X	✓	✓
Informazioni su assorbimento e distribuzione	X	X	✓
Informazioni sul target molecolare	✓	✓	X



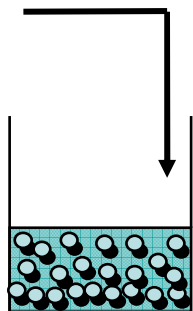
# Biosensori cellulari bioluminescenti: gene reporter technology



Il metodo si esegue su piastre microtiter a 96 pozzetti.

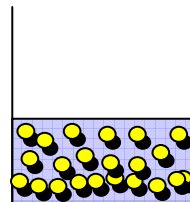


Campione



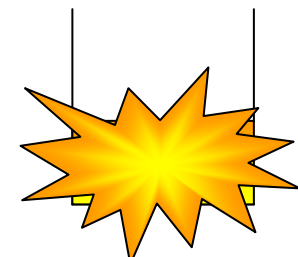
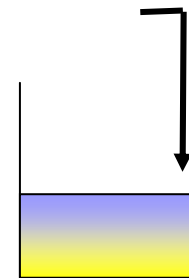
Linea cellulare

3-12 h



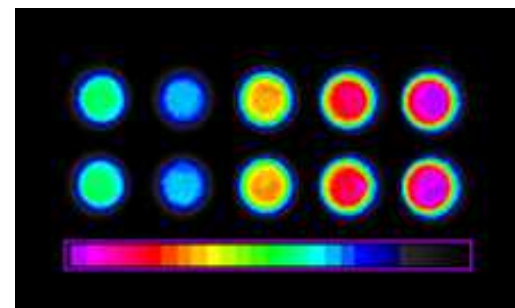
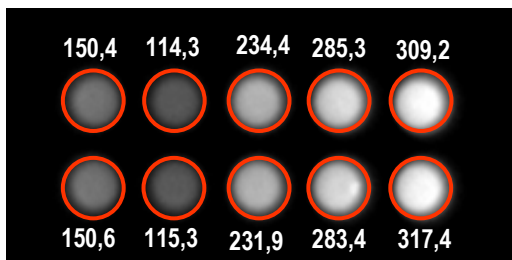
Le cellule esprimono la proteina reporter BL

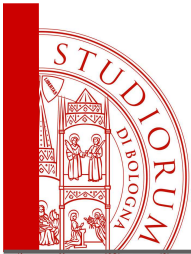
Substrato BL



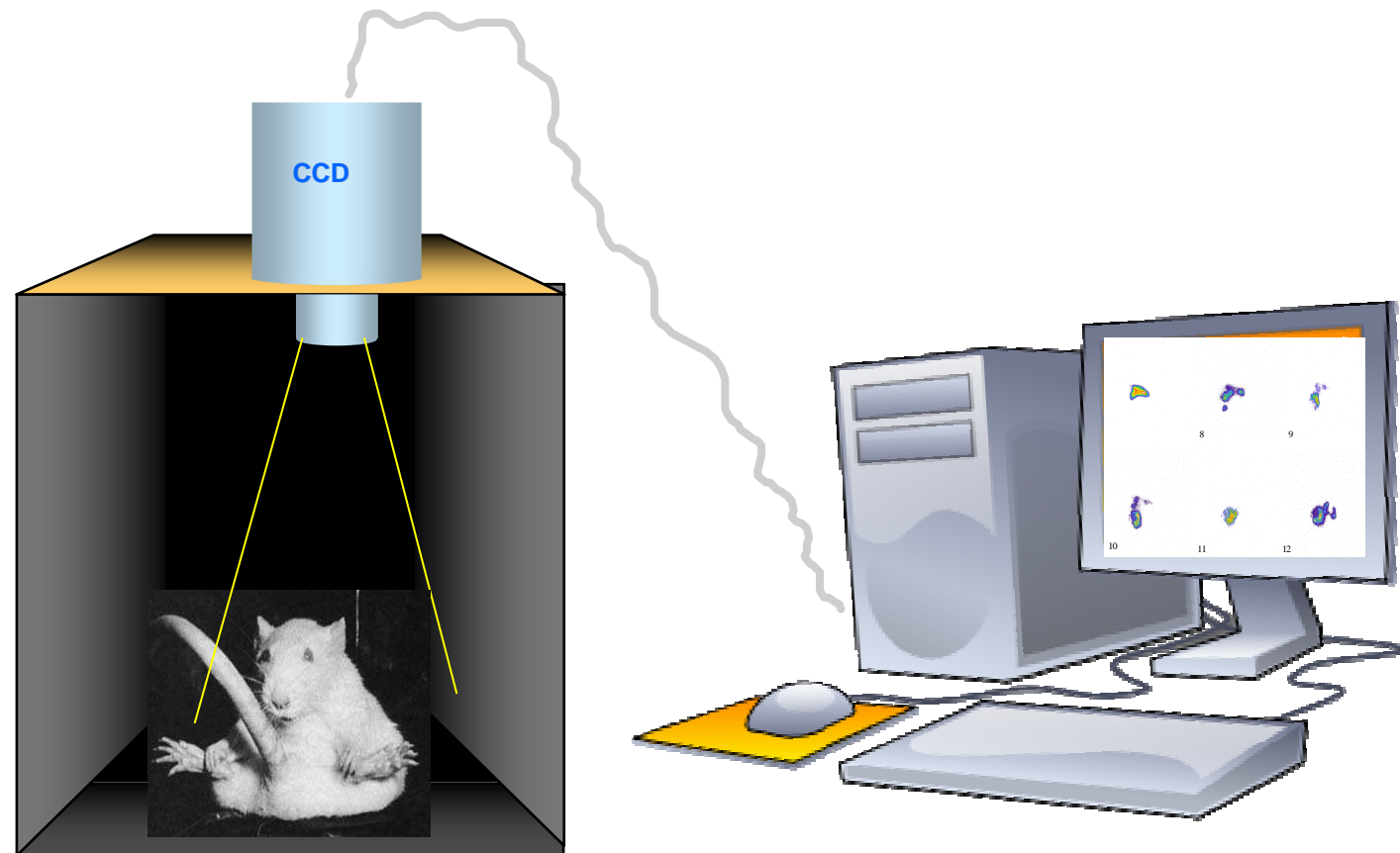
Misura della luce emessa

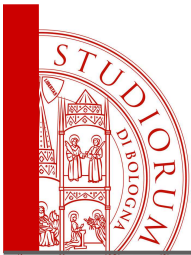
Relative light units





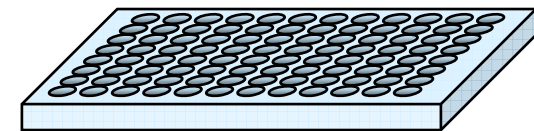
# Imaging in vivo in bioluminescenza



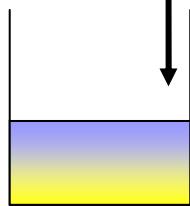


# Misura dell'attività antiossidante mediante misure di chemiluminescenza

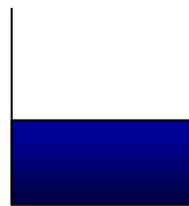
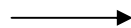
Il metodo si esegue su piastre microtiter a 96 pozzetti.



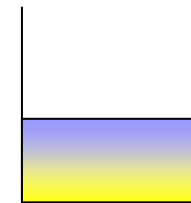
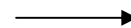
Campione contenente antiossidanti



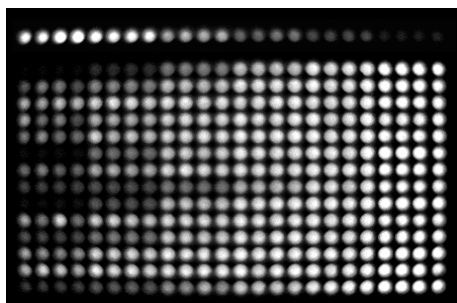
Sistema CL



Gli antiossidanti causano spegnimento



Si misura il tempo necessario per ottenere nuovamente emissione di luce

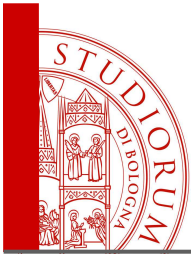


Segnale CL



Tempo





# Studio della farmacocinetica e del metabolismo di berberina



## IN BASE A TEST SU ANIMALI DA ESPERIMENTO

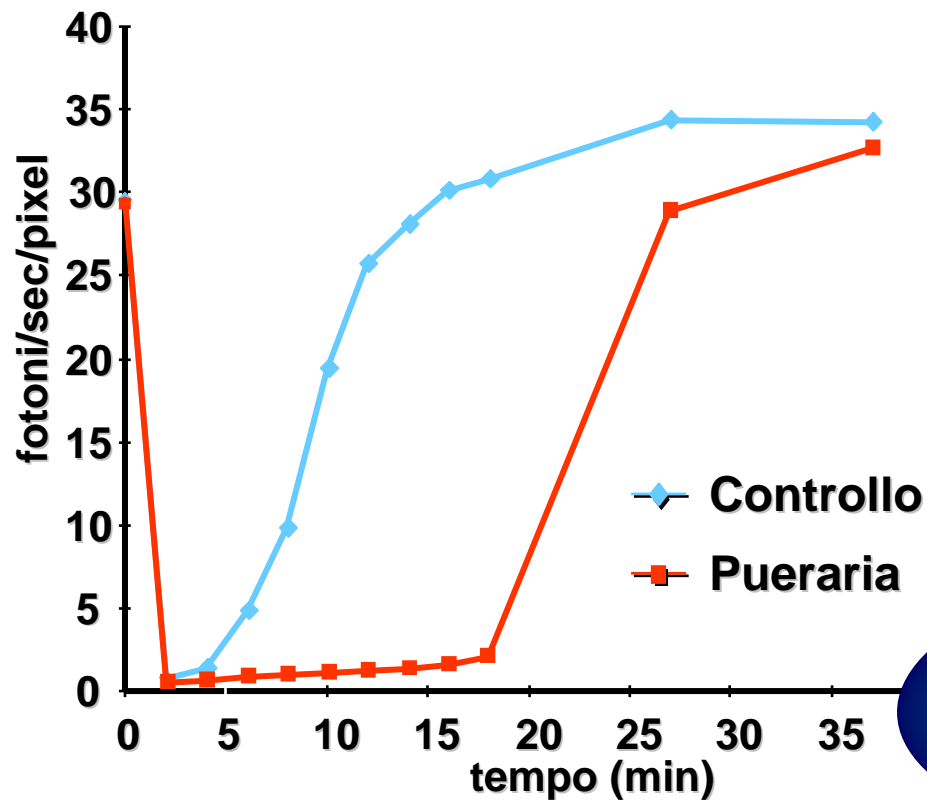
Bassi livelli ematici dopo somministrazione

Massime concentrazioni plasmatiche raggiunte dopo 2-9 ore

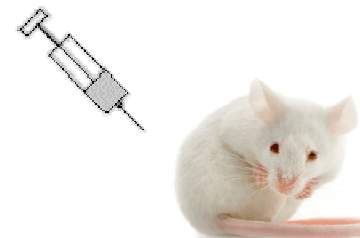
Livelli plasmatici mantenuti costanti da un importante ricircolo enteroepatico

Predominante distribuzione epatica

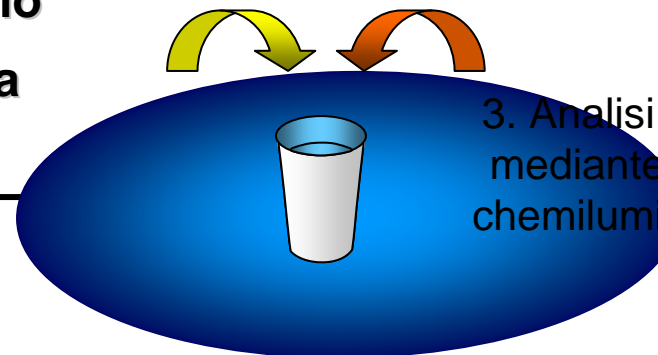
# Attività antiossidante in siero di ratto, dopo somministrazione di Pueraria estratto



1. Somministrazione di estratto di Pueraria (1.5 g/kg /day)

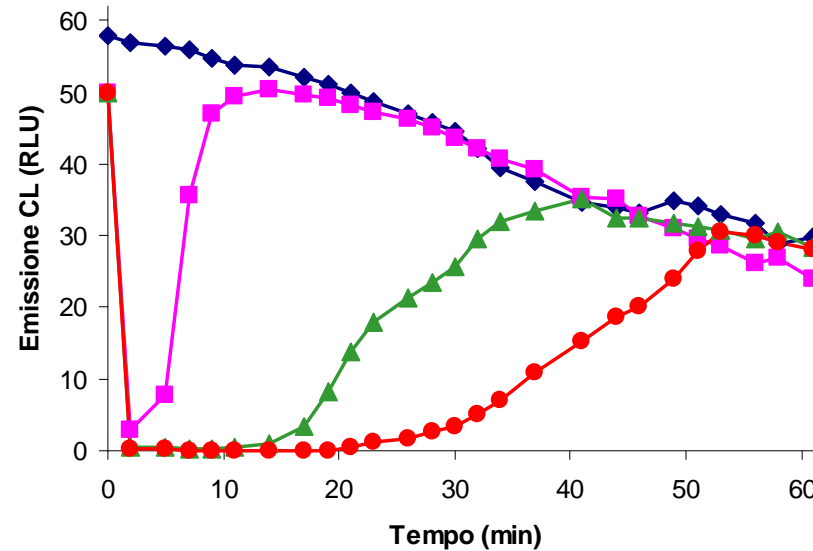
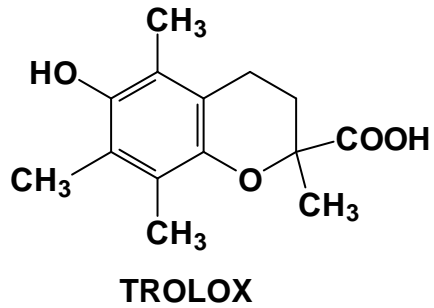


2. Prelievo sangue

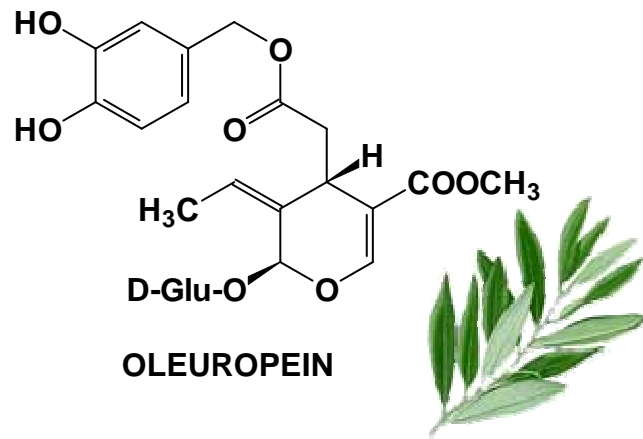


3. Analisi del siero mediante metodo chemiluminescente

# Misura dell'attività antiossidante



FENILPROPANOIDE  
DA AJUGA  
REPTANS

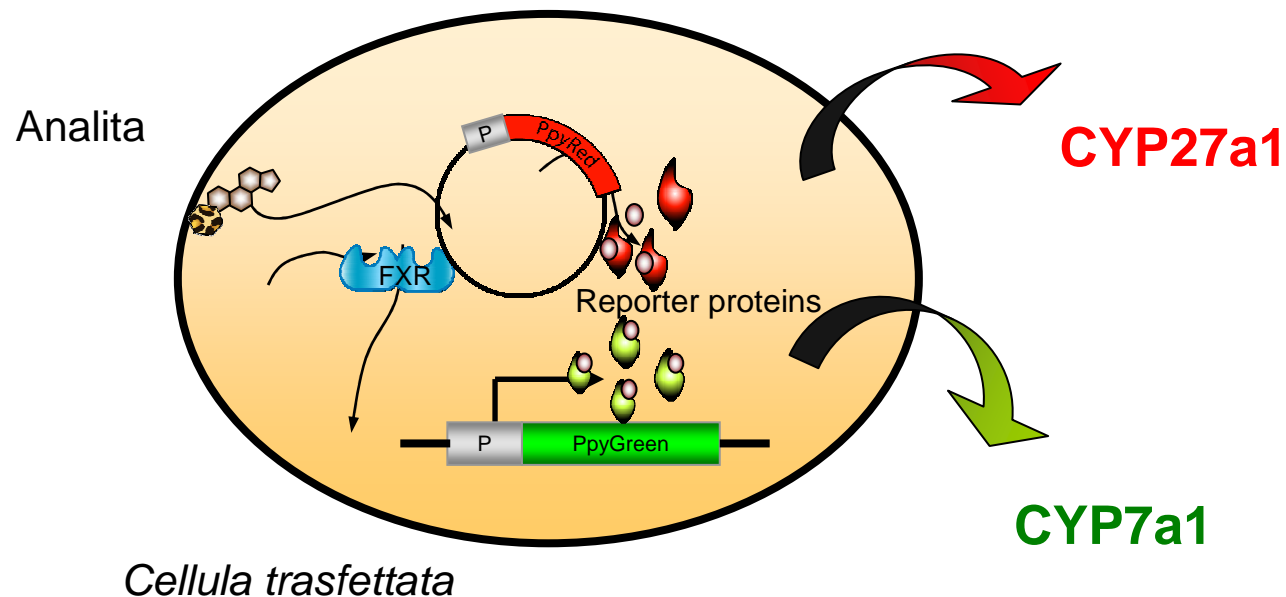


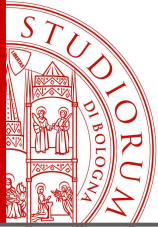
Compound	Antioxidant activity*
Trolox®	1.0
Oleuropein	1.25
Phenylpropanoid	4.5

\*Relative to that of Trolox®

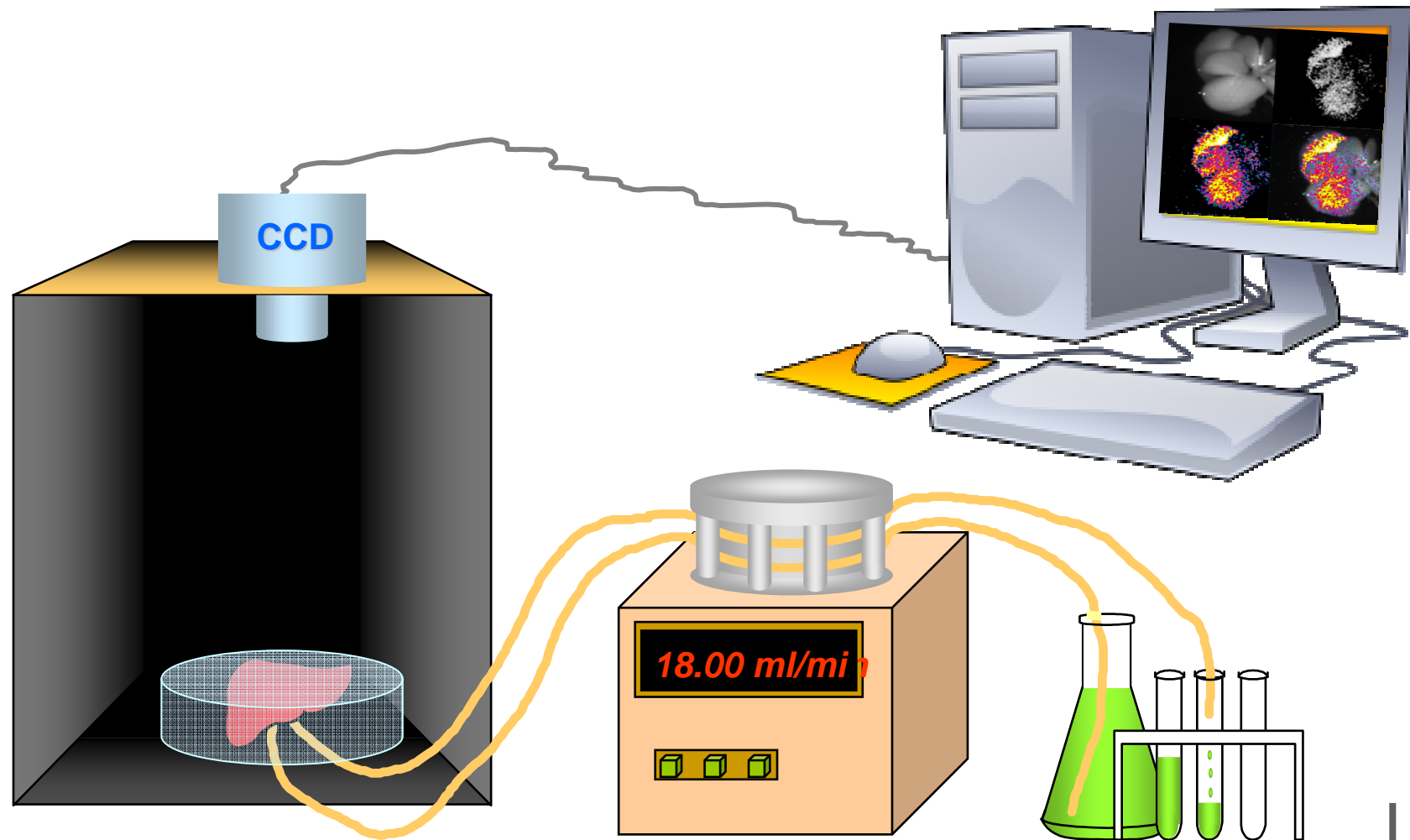
# PRINCIPIO DEL METODO

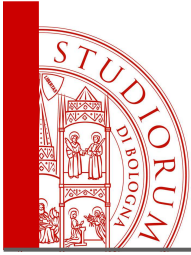
Linea cellulare di epatoblastoma umano (HepG2-FXR) che esprime due proteine reporter (luciferasi) sotto il controllo dei promotori di *cyp7a1* e *cyp27a1*.





# Misura dell'attività antiossidante su organi isolati e riperfusi





# Valutazione del tempo di svuotamento gastrico

