



# UNIVERSITÀ DI PISA

Dipartimento di Farmacia

## CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

### **ATTIVITÀ FARMACOLOGICHE E POSSIBILI BERSAGLI MOLECOLARI DEI POLISACCARIDI DEL LYCIUM BARBARUM (LBP)**

Relatore:  
Prof.ssa M.C. Breschi

Candidata:  
Bonturi Loraine

Anno Accademico 2014-2015

*Dedico questa tesi*  
*Ai miei Genitori*  
*e a mia sorella Renèe*

## INDICE:

1. INTRODUZIONE.....	5
1.1. Origini e aspetti botanici.....	5
1.2. Uso del Lycium Barbarum nella medicina tradizionale.....	8
1.3. Uso dei prodotti del Goji nel mercato odierno.....	9
2. COSTITUENTI CHIMICI.....	11
2.1. Nel frutto.....	11
2.2. Nella radice.....	15
2.3. Nei fiori e nelle foglie.....	16
3. EFFETTI FARMACOLOGICI E MECCANISMI DEGLI LBP.....	18
3.1. AZIONE ANTIOSSIDANTE E ANTIAGING.....	18
3.1.1. LBP e senescenza cellulare.....	23
3.1.2. Riepilogo attività antiossidante e anti-aging.....	25
3.2. ATTIVITÀ ANTITUMORALE.....	26
3.2.1. Cancro al seno.....	26
3.2.2. Carcinoma alla cervice.....	27
3.2.3. Carcinoma colon-rettale.....	28
3.2.4. Carcinoma dello stomaco.....	29
3.2.5. Leucemia.....	29
3.2.6. Epatocarcinoma.....	29
3.2.7. Sarcoma.....	31
3.2.8. Cancro alla prostata.....	32
3.2.9. Studi clinici degli LBPs in pazienti con tumori.....	32
3.2.10. Riepilogo azione antitumorale.....	33
3.3. EFFETTI IMMUNOMODULATORI.....	34
3.3.1. Cellule T, B, splenociti e macrofagi.....	34
3.3.2. Cellule mononucleate del sangue periferico.....	35
3.3.3. Cellule dendritiche.....	35
3.4. EFFETTI ANTIFATICA.....	37
3.5. EFFETTI ANTIVIRALI.....	38
3.6. EFFETTI IPOLIPIDEMICI.....	38
3.7. EFFETTI CARDIOPROTETTIVI.....	39
3.7.1. Danno I/R al miocardio.....	39

3.7.2. Cardiotoxicità indotta dalla doxorubicina.....	39
3.8. EFFETTI PROTETTIVI SULL' APPARATO GASTRO-INTESTINALE.....	42
3.8.1. Colite.....	42
3.8.2. Lesione I/R intestinale.....	43
3.9. EFFETTI SUL GLAUCOMA SPERIMENTALE E SULLA LESIONE ALLA RETINA INDOTTA DALL' I/R.....	44
3.9.1. Glaucoma sperimentale: ipertensione oculare acuta.....	45
3.9.2. Glaucoma sperimentale: ipertensione oculare cronica.....	46
3.9.3. Degenerazione della retina.....	47
3.9.4. Lesione ischemica alla retina indotta dall' occlusione dell' arteria cerebrale media (MCAO).....	48
3.9.5. Recisione completa o parziale del nervo ottico.....	49
3.10.    EFFETTI EPATOPROTETTORI.....	51
3.10.1. Steatosi epatica.....	51
3.10.2. Steatosi epatica non alcolica.....	52
3.10.3. Danno epatico acuto indotto dal tetracloruro di carbonio.....	53
3.10.4. Riepilogo effetti epatoprotettori.....	54
3.11.    EFFETTI IPOGLICEMICI .....	55
3.11.1. Diabete indotto dalla streptozotocina.....	55
3.12.    EFFETTI NEUROPROTETTORI E EFFETTI SUI DEFICIT COGNITIVI E DELLA MEMORIA, MORBO DI ALZHEIMER (AD) E ICTUS.....	58
3.12.1. Cervello ischemico e occlusione dell' arteria cerebrale media (MCAO)..	58
3.12.2. Lesione neuronale indotta dal peptide a $\beta$ e malattia di Alzheimer.....	62
3.12.3. Lesione cerebrale indotta dalla scopolamina.....	63
3.12.4. Lesione neuronale indotta dal glutammato.....	64
3.12.5. Lesione neuronale indotta dal manganese.....	65
3.12.6. Lesione neuronale indotta dall' omocisteina.....	65
3.12.7. Neuroma traumatico.....	66
3.13.    EFFETTI PROTETTIVI VERSO LE TOSSICITÀ D'ORGANO INDOTTE DALLE RADIAZIONI O DALLA CHEMIOTERAPIA.....	67
3.14.    EFFETTI PROTETTIVI SUL SISTEMA RIPRODUTTORE.....	69
3.14.1. Danno alla spermatogenesi indotto dal bisfenolo A.....	69
3.14.2. Inibizione del comportamento sessuale indotto dal corticosterone.....	70
3.14.3. Danno cellulare ai testicoli indotto dal calore o da H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	70

3.14.4. Danni alla spermatogenesi indotti dalle radiazioni.....	71
3.14.5. Effetto protettivo del tessuto ovarico.....	72
3.14.6. Riepilogo degli effetti protettivi sul sistema riproduttore.....	72
4. TOSSICITÀ.....	73
5. INTERAZIONI CON ALTRI FARMACI.....	73
6. ALLERGIE.....	74
7. CONCLUSIONI.....	75
8. GLOSSARIO ABBREVIAZIONI.....	76
9. BIBLIOGRAFIA.....	80

## INTRODUZIONE

Recentemente hanno attirato molta attenzione l'isolamento e la ricerca di nuovi composti di origine naturale con attività biologiche ed effetti vantaggiosi per la salute.

I frutti del *Lycium Barbarum*, chiamati anche bacche di Goji, sono usati da più di 2000 anni in Cina e in altre regioni dell'Asia, sia come integratore alimentare che nella medicina tradizionale in quanto tonico nutriente ed agente anti-invecchiamento.

Esperimenti farmacologici hanno dimostrato che, tra i vari componenti, un gruppo di polisaccaridi (LBP) con struttura Glican-O-Ser glicopeptide, hanno importanti attività biologiche, come antiossidanti, immunomodulatorie, antitumorali, neuroprotettive, radioprotettive, anti-diabete, epatoprotettive, antifatica e con effetti sull'invecchiamento e sul glaucoma.

Lo scopo del presente elaborato è di illustrare le molteplici attività biologiche e i potenziali benefici per la salute dei polisaccaridi estratti dal frutto del *Lycium barbarum*, attraverso riferimenti agli esperimenti farmacologici che sono stati condotti.



Bacche di Goji. Nutspaper<sup>1</sup>, 2/2014.

## ORIGINI E ASPETTI BOTANICI

Dal punto di vista botanico<sup>1</sup> la pianta del *Lycium barbarum* è un arbusto deciduo



appartenente alla famiglia delle Solanaceae. L'altezza delle piante varia da uno a tre metri; le foglie alterne hanno forma lanceolata o ovata, colore verde-grigio brillante e arrivano fino a 7 cm di lunghezza per 3,5 cm di larghezza con punte arrotondate o smussate. Gli steli portano da 1 a 3 fiori e il calice, a forma di campana o tubuloso, con sepali che formano lobi corti, triangolari, si spezza quando si sviluppa la bacca. La corolla a cinque petali è di colore lavanda o violacea. La fioritura si ha da giugno a settembre. I frutti sono bacche fusiformi con l'apice acuto, lungo 6-20 mm, un diametro di 3-8 mm e un pericarpo che va dall'arancione al rosso

scuro e contengono semi piccoli e gialli.

I frutti vengono raccolti da luglio ad ottobre. La pratica maggiormente diffusa per la conservazione del frutto prevede un processo di essiccamento: le bacche sono disposte in uno strato sottile su una stuoia di bambù in una zona ombreggiata e areata finché avvizziscono; dopodiché vengono asciugate al sole o in forno fino a quando la buccia è essiccata, ma la polpa è ancora morbida al tatto. Le bacche di goji essiccate sono consumate principalmente come snack e hanno un gusto dolce ma pungente simile a quello del mirtillo.

La specie *Lycium barbarum*, nativa dell'Asia settentrionale, cresce spontaneamente nelle valli dell'Himalaya, della Mongolia, del Tibet e nel nord della Cina. Per uso commerciale viene coltivato estensivamente soprattutto a Ningxia, una piccola regione autonoma della Cina, precedentemente parte del Gansu, attraversata dal fiume Giallo che, esondando, arricchisce i terreni circostanti di minerali. Il terreno ricco di nutrienti, il clima, l'irrigazione abbondante data dalla presenza del fiume creano l'habitat ideale per questa pianta.

Ad oggi il *Lycium Barbarum* si è molto diffuso nelle regioni calde del mondo e viene utilizzato nel Nord America, in Europa e in Australia come pianta ornamentale da siepe.



In figura sono rappresentati: i fiori, i frutti e i cespugli del *Lycium Barbarum*; il processo di essiccamento dei frutti; bacche essiccate pronte per essere consumate. Amagase e Farnsworth<sup>a</sup>, 2011.

Il nome botanico *L.Barbarum* è stato assegnato dal botanico svedese Carlo Linneo nel 1753. È probabile che questo nome derivi dall'antica regione meridionale dell'Anatolia, Lycia, oppure dal latino "lychnus", che significa luce o lampada, presumibilmente dovuto alla forma e al colore del frutto. Il genere *Lycium* include più di 70 specie di cespugli decidui o sempreverdi nativi delle aree tropicali o temperate dell'Est e Sud-Est asiatico, Asia minore, Europa, Sud Africa e Nord America. Quindici anni più tardi, nel 1768, Phillip Miller diede il nome e descrisse per la prima volta il *Lycium* chinense nel suo libro "Dictionary of gardening, botany, and agriculture". Queste due specie sono apparentemente indistinguibili tra loro, sia a livello morfologico che istologico. Sono state identificate dieci specie e varietà di *Lycium*, con frutto molto simile a quello del *Lycium barbarum*, commercializzate ad Hong Kong e in Cina. Le differenze, irricognoscibili alla vista, possono emergere solo grazie ad un' analisi RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

Il *Lycium Barbarum*, come afferma la "Royal Horticultural Society", è conosciuto in molti Paesi con nomi diversi, che variano a seconda della lingua e del dialetto propri dei luoghi di coltivazione. Il nome inglese utilizzato più comunemente per le bacche di goji è "wolfberry"; il motivo non è certo, ma probabilmente perché il termine "*Lycium*" ricorda "lycos", che in greco significa "lupo". Altri nomi comuni inglesi sono "matrimony wine" e "the Duke of Argyll's Tea Tree", poiché questa pianta venne introdotta in Inghilterra per la prima volta nel XVIII secolo da Archibald Campbell, botanico e terzo duca di Argyll. Abbiamo poi: "Kuko" (Giappone), "Kei tse" (Cantonese), "gugija" (Coreano), "cu khi" (Vietnam), "ga gè" (Thai), "gouqi" (Cina) e "dretsherma" (Tibet).

Nella maggior parte dei Paesi, comunque, il frutto è l'organo maggiormente conosciuto e perciò separatamente denominato lycii fruit, gouqi zi e goji. Il termine occidentale "goji" è in uso solo dal XXI secolo e deriva dalla pronuncia semplificata del cinese "gou-qi-zi", che indica le bacche del *Lycium* ("zi" significa infatti "seme", o più specificatamente "bacca").



## **USO DEL LYCIUM BARBARUM NELLA MEDICINA TRADIZIONALE**

Il frutto del Lycium è usato soprattutto in cucina come base di zuppe, porridge, condimento nel riso e in altre numerose ricette vegetariane; inoltre viene usato nella preparazione di tè, succhi, vini e liquori.

Le bacche di Goji sono considerate un elemento essenziale nella medicina tradizionale cinese da migliaia di anni e anche in altri paesi dell'Asia come il Vietnam, la Korea, il Giappone, il Tibet.

Numerosi scritti di medicina tradizionale cinese descrivono il frutto del Goji come un potente rimedio anti-età, avente proprietà antiossidanti e poteri curativi.

La prima citazione risale al 2800 a.C. nello Shennong Ben Cao Jing (Il materiale Medico del divino contadino) scritto dal leggendario imperatore Shen Nung, considerato il padre dell'agricoltura cinese; egli sosteneva che il frutto del Lycium migliorava la vista, nutriva il fegato e i reni aiutando a riequilibrare lo ying e lo yang del corpo.

Anche il farmacologo cinese Li Shi-Zen ne ribadisce le proprietà nel suo "Compendio di materia medica" indicando inoltre che l'assunzione prolungata promuove la longevità.

Una leggenda cinese narra che durante la dinastia Tang (circa 800 d.c.), in Tibet, nei pressi di un tempio buddhista, vi era un pozzo circondato da piante di Goji. Gli abitanti che regolarmente andavano al tempio per pregare e bevevano l'acqua di quel pozzo godevano tutti di ottima salute, non invecchiavano e in età anziana avevano una sana dentatura e nessun capello bianco. Tutto ciò era dovuto alle bacche di Goji che, cadendo nell'acqua del pozzo, la rendevano "un elisir di giovinezza".

Un'altra leggenda narra di una donna che non invecchiava e ha vissuto più di 300 anni mangiando una parte diversa del Lycium in ogni stagione: le foglie in primavera, i fiori in estate, i frutti in autunno e la corteccia della radice in inverno.

Per le loro numerose proprietà i monaci tibetani hanno soprannominato le bacche di Goji "Diamante Rosso".

La medicina tradizionale cinese utilizza sia il frutto che la corteccia della radice del L. Barbarum e L. Chinense, ma solo il frutto del Lycium Barbarum è inserito nell'elenco ufficiale della Farmacopea della Repubblica Popolare Cinese del 1985.

## USO DEI PRODOTTI DEL GOJI NEL MERCATO ODIERNO

Il Goji è comunemente designato come "Bacche di Goji dell'Himalaya" o "Bacche di Goji Tibetane" sul mercato globale degli alimenti funzionali. La varietà dei prodotti commercializzati è notevole: oltre succhi di frutta, birre e vini, il Goji si trova nei biscotti, barrette croccanti, cioccolate, muesli, salse e saponi. I prodotti del Goji sono stati commercializzati via Internet dal 2002 e sono sempre più disponibili nelle farmacie e nei negozi di alimenti biologici.

Il recente successo commerciale del Goji nei Paesi occidentali è stato fortemente spinto da un libro<sup>2</sup> del Dr. Earl Mindell pubblicato nel 2003, intitolato "Goji, The Himalayan Health Secret".

Il Dr. Mindell è un controverso farmacista e nutrizionista Americano che ha scritto una serie di libri su integratori alimentari e nutrizione. Le sue teorie sulla salute e sulla nutrizione riscontrano un profondo scetticismo nella comunità scientifica. Nel libro sopra citato, si estrapolano ampie raccomandazioni sugli usi del succo di Goji dalle pratiche tradizionali e dagli studi preliminari eseguiti quasi esclusivamente in Cina, tra cui la prevenzione del cancro, la salute cardiovascolare, il trattamento del diabete e l'obesità.

In particolare, il Dr. Mindell sostiene effetti quasi-miracolosi sulle aspettative di vita con il consumo del Goji identificato come "Il frutto himalayano della longevità".

Il Dr. Mindell e le sue dichiarazioni circa il "valore straordinario" del Goji sono abbondantemente citati nelle pubblicità dei prodotti del Goji, in particolare attraverso la sua società partner "Free Life International" che distribuisce il succo del Goji in vari livelli del mercato. I benefici per la salute dichiarati dal Dr. Mindell e quelli che si trovano nelle pubblicazioni web sui prodotti del Goji, sono stati recensiti e criticati in un recente libro sulle bacche di Goji<sup>3</sup>. Gli autori concludono che non vi sono evidenze scientifiche per convalidare qualsiasi delle rivendicazioni fatte finora.

Uno dei prodotti più recenti è GoChi™, un succo di frutta che contiene oltre il 30% di polisaccaridi bioattivi, che è stato lanciato dalla compagnia "Free Life International" nel 2008.

Il nome GoChi è una combinazione di *Go* dal Goji e dalla parola cinese *chi* che significa energia vitale. La pubblicità di questo prodotto si basa su un



GoChi™, il succo delle bacche di Goji, prodotto dalla "Free Life International" nel 2008, compagnia partner del Dott. Mindell.  
[http://www.bumbleenterprises.co.nz/Himalayan\\_Goji\\_Juice.php](http://www.bumbleenterprises.co.nz/Himalayan_Goji_Juice.php)

recente studio clinico<sup>4</sup> che dovrebbe aver dimostrato gli effetti generali del prodotto sulla salute. Tuttavia, considerando i parametri altamente soggettivi, il piccolo numero di partecipanti e il relativo breve termine dello studio, si ritiene che la rilevanza di questo studio sia altamente discutibile.

Le bacche di Goji e i suoi derivati sono legalmente venduti come integratori alimentari o alimenti negli Stati Uniti e in Europa. Tuttavia, questi prodotti non possono essere pubblicizzati come farmaci e le indicazioni terapeutiche sono vietate.

Nel 2006 la FDA ha dovuto inviare lettere di avvertimento<sup>5,6</sup> ad alcuni distributori di succo di Goji riguardo affermazioni commerciali che hanno violato il Food Drug and Cosmetic Act.

In Europa, una procedura di valutazione è stata avviata dalla UK Food Standards Agency nel 2007 per stabilire se le bacche di Goji dovrebbero ricevere lo stato di “nuovi prodotti alimentari” (Novel food), come il succo di Noni (*Morinda citrifolia*)<sup>7,8</sup> nel 2003. Dopo aver esaminato i dati, l'agenzia è giunta alla conclusione che ci sono stati dati sufficienti riguardo l'uso alimentare di Goji in UK prima del 1997 e che il frutto di conseguenza non rientra ai sensi della legislazione<sup>9</sup> nei nuovi prodotti alimentari.

Per quanto riguarda invece la situazione negli Stati Uniti, il Goji non rientra nella lista GRAS (generalmente considerato sicuri) della FDA.

## COSTITUENTI CHIMICI

Sono stati effettuati molteplici studi sia sui diversi organi della pianta del Goji che sui vari costituenti delle bacche di goji . Le indagini sui frutti sono state eseguite sul *L.Barbarum*, poiché è stata ritenuta la specie officinale di migliore qualità, mentre le indagini su altre parti della pianta, come la radice e le foglie, sono stati eseguiti sul *L.Chinense*.

### NEL FRUTTO:

Il gruppo di sostanze quantitativamente più importanti contenute nel frutto secco del *Lycium barbarum* sono un gruppo di glicoconiugati idrosolubili detti **LBP** (*Lycium Barbarum Polysaccharides*) la cui presenza è stimata essere il 5-8%.

Gli LBP sono stati isolati e purificati dall'estratto acquoso di *L.barbarum* attraverso metodiche come la precipitazione in etanolo, la precipitazione frazionata, la cromatografia a scambio ionico, la filtrazione su gel, la cromatografia d'affinità. La loro struttura è stata identificata mediante l'uso di tecniche come l'idrolisi parziale acida, la degradazione di smith, la cromatografia a permeazione di gel, la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC), la gas cromatografia, lo spettro di risonanza magnetica nucleare, la gascromatografia-spettrometria di massa (GCMS).

È stato scoperto che gli LBP sono una miscela complessa di polisaccaridi costituiti da acidi eteropolisaccaridi e polipeptidi o proteine, con un intervallo di peso molecolare compreso tra 8-241 kDa secondo alcuni studi<sup>10,11</sup>, mentre in altri studi<sup>12</sup> è stato stimato tra 10- 2300 kDa.

Anche se gli LBP differiscono nella composizione, la parte glicosidica costituisce il 90-95% del totale e contiene 6 monosaccaridi: arabinosio, glucosio, galattosio, mannosio, ramnosio, xilosio; inoltre acido galatturonico e 18 aminoacidi. Una pubblicazione<sup>11</sup> del 2001 riporta anche la presenza di fruttosio, fucosio e ribosio.

Gli LBP hanno una struttura Glicano-O-Ser-glicopeptide (gli zuccheri sono legati attraverso un legame O-glicosidico ai residui di serina/treonina della parte proteica).

Lo scheletro della struttura dei LBP è composto da  $\alpha$ -(1-> 6)-D-gluconi e  $\alpha$ -(1-> 4)-D poligalatturononi con diverse ramificazioni e gruppi terminali .

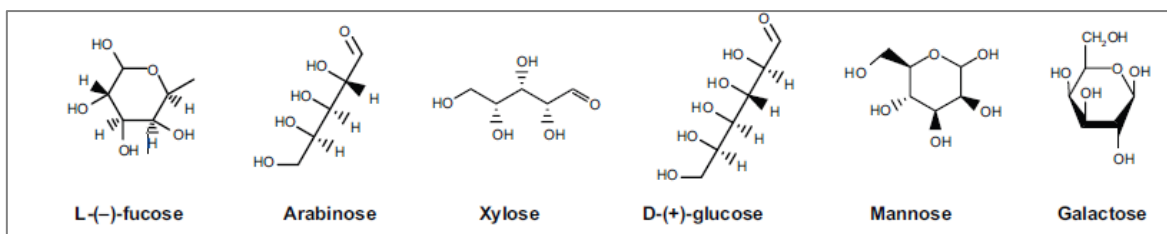


Fig: sei principali monosaccaridi presenti negli LBP. Cheng et Al<sup>b</sup>, 2015.

Glycoconjugate	MW	Carbohydrate content	Monosaccharides (molar ratio or %)
<i>L. barbarum</i>			
LbGp2	68 200	90.7	Ara, Gal(4:5)
LbGp3	92 500	93.6	Ara, Gal(1:1)
LbGp4	214 800	85.6	Ara, Gal, Rha, Glc (1.5:2.5:0.43:0.23)
LbGp5	23 700	8.6	Rha, Ara, Xyl, Gal, Man, Glc (0.33:0.52:0.42:0.94:0.85:1)
LbGp5B	23 700		Rha, Ara, Glc, Gal, (0.1:1:1.2:0.3), Galu(0.9%)
LBP3p	157 000	92.4	Gal, Glc, Rha, Ara, Man, Xyl (1:2.12:1.25:1.10:1.95:1.76)
LBPC <sub>2</sub>	12 000	92.8	Xyl, Rha, Man (8.8:2.3:1)
LBPC <sub>4</sub>	10 000	95	Glc
LBPA1	18 000		heteroglycan
LBPA3	66 000		heteroglycan
LBP1a-1	11 500		Glc
LBP1a-2	9400		Glc
LBP3a-1	10 300		GalA
LBP3a-2	8200		GalA
LBPF1	ca 150 000	48.2*	
LBPF2	ca 150 000	30.5*	
LBPF3	ca 150 000	34.5*	
LBPF4	ca 150 000	20.3*	
LBPF5	290 000	23.5*	

Tabella delle frazioni purificate degli LBP, con informazioni relative al peso molecolare, al contenuto di carboidrati, e alla composizione monosaccaridica. Potterat <sup>c</sup>, 2010.

I **carotenoidi** rappresentano il secondo gruppo di metaboliti più rappresentativi contenuti nel *Lycium barbarum*. Questi composti aumentano significativamente con l'avanzare del grado di maturazione del frutto. Sono infatti i responsabili del colore rosso-arancio dei frutti del Goji, e ne costituiscono lo 0.03-0.5%. Il carotenoide predominante è la zeaxantina dipalmitato (Fig.1, 1), che rappresenta il 56% del totale contenuto nel frutto; è presente anche la beta-criptoxantina palmitato (Fig 1, 2), zeaxantina mono-palmitato (Fig 1, 3) e piccole quantità di zeaxantina libera (Fig 1, 4) e beta-carotene (Fig 1, 5).

La Zeaxantina è un pigmento giallo, un isomero di luteina e un derivato del  $\beta$ -carotene. Quando viene ingerita la zeaxantina si accumula nei tessuti grassi, ma soprattutto nella macula, una regione della retina. Degli studi<sup>13</sup> affermano che questo composto può contribuire a proteggere la macula dalla degenerazione, che può essere indotta da eccessiva esposizione al sole (luce UV) e ad altri processi ossidativi.

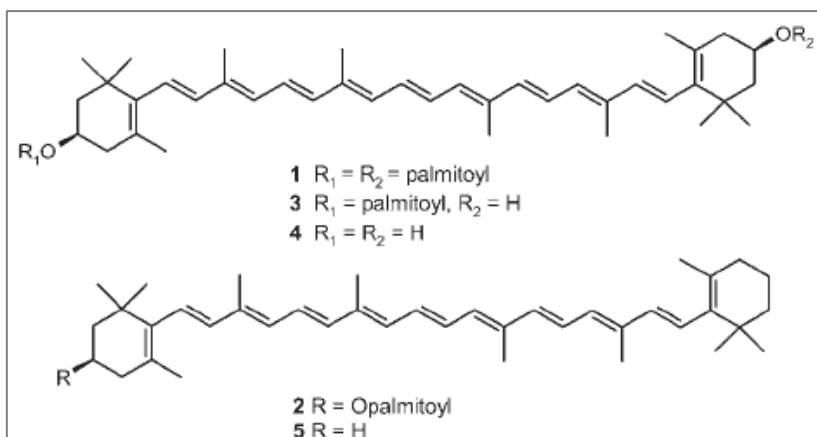


Fig. 1: carotenoidi presenti nei frutti e nelle foglie del L.Barbarum. 1: zeaxantina dipalmitato, 2: beta-criptoxantina palmitato, 3: zeaxantina mono-palmitato, 4: zeaxantina libera, 5: beta-carotene. Potterat<sup>c</sup>, 2010.

I frutti contengono inoltre **vitamine**, in particolare la riboflavina (B2), la tiamina (B1) e l'acido ascorbico (C). Il contenuto di vitamina C del frutto del Lycium è di 45 mg/100 g, valore comparabile con il contenuto presente in un limone.

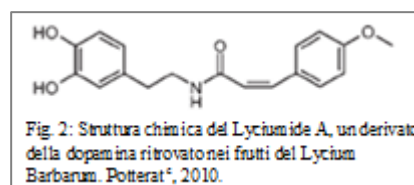
All'interno del frutto sono presenti anche i **flavonoidi**: dopo trattamento di idrolisi è emersa la presenza dell'aglicone miricetina, della quercetina e del kaempferol.

Con l'analisi GC-MS (gas-cromatografia/spettrometria di massa) è stata dimostrata la presenza di **oli essenziali e di acidi grassi** nel Lycium barbarum tra i quali l'acido palmitico, linoleico, miristico,  $\beta$  elemene e l'etilesadecanoato sono emersi come i più rappresentativi.

Il frutto contiene inoltre l'1-2,7% di **amminoacidi** liberi, tra i quali la prolina rappresenta il maggiore costituente. La taurina, la betaina e l'acido gamma-aminobutirrico compaiono inoltre come amminoacidi non proteino-genici.

Tra gli **altri costituenti** isolati e riscontrati nel frutto, ci sono anche il beta-sitosterolo e il suo glucoside daucosterol, la scopoletina (una cumarina), l'acido p-cumarico, il lyciumide A (Fig.2) (un derivato della dopamina) e l'L-monometil succinato (un estere).

Ci sono state numerose controversie circa la presenza di **atropina** nel frutto del Lycium; nel 1989, infatti, ne fu riscontrata una quantità dello 0,95% in alcuni frutti raccolti in India. Questa scoperta<sup>14</sup> apparve fortemente dubbiosa e in netta contraddizione con il largo consumo che veniva fatto del frutto, in quanto non si riscontravano alcuni effetti tossici sui consumatori.



Recenti ricerche <sup>15</sup> a riguardo, effettuate con il metodo di analisi HPLC-MS (cromatografia liquida ad alta prestazione/spettrometria di massa), hanno stabilito che nel frutto di Goji sono presenti solo delle tracce di atropina, in un quantitativo massimo che arriva a 19 ppb. Infine sono presenti **minerali** in forma inorganica come il Potassio, il calcio, il ferro, lo zinco, il cobalto, il manganese, il selenio e il magnesio.

La composizione del frutto di L. chinense appare del tutto simile a quella di Lycium Barbarum: anch'esso infatti presenta polisaccaridi, carotenoidi e flavonoidi, come tipici metaboliti.

In particolare, nel L. Chinense la rutina è il flavonoide principale ed è associato a una piccola percentuale di iperoside, quercetina e morina. Nella frazione di carotenoidi oltre alla Zeaxantina dipalmitato, costituente dominante (49%), zeaxantina e  $\beta$  carotene, sono stati isolati due cerebrosidi (Fig 25, 26) e tre derivati pirrolici (Fig. 27, 28, 29) a cui si attribuiscono le proprietà epatoprotettrici. Inoltre sono stati identificati tocoferoli e acidi fenolici come l'acido gallico e l'acido caffeico.

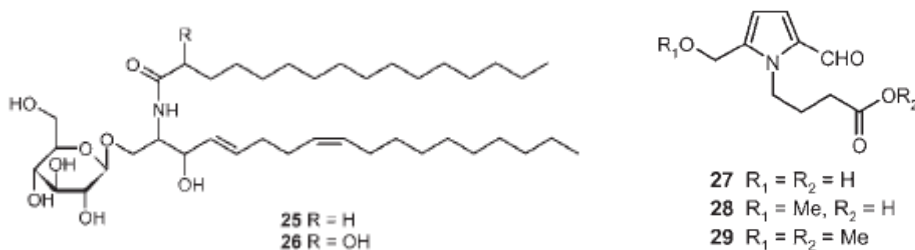


Fig. 25, 26: due cerebrosidi contenuti nei frutti del L.Chinense.

Fig. 27,28,29: tre derivati pirrolici contenuti nei frutti del L. Chinense. Potterat <sup>c</sup>, 2010.

## NELLA RADICE:

Una grande varietà di metaboliti secondari sono stati isolati dalla radice e dalla corteccia della radice di *L.Chinense*, tra cui un gruppo di peptidi ciclici sono di particolare interesse: le Lyciumine A, B, C, D (Fig. 34,35,36,37).

È stato isolato anche un glucoside indolico analogo del triptofano (Fig. 38), composti azotati come l'aurantiamide acetato (Fig. 39), il lyciumamide (Fig. 40), e una serie di derivati tiaminici (Fig. 41,42,43,44).

La radice inoltre contiene gli alcaloidi spermina kukoamine A e B (Fig. 45 e 46); i flavonoidi apigenina, acacetina, luteolina, kaempferol, quercetina e linarina; la cumarina scopoletina; acidi fenolici e glicosidi come l'acido p-cumarico e l'acido vanillico.

È stata evidenziata anche la presenza di terpeni, acidi grassi, vitamina C e betaina.

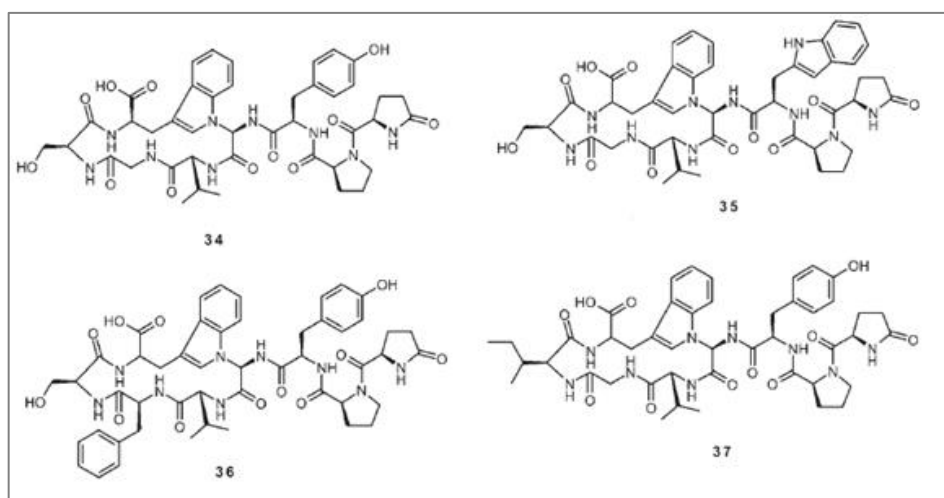


Fig. 34,35,36,37: Le Lyciumine A, B, C, D, un gruppo di peptidi ciclici di particolare interesse contenuti nella radice del *L.Chinense*. Potterat <sup>c</sup>, 2010.

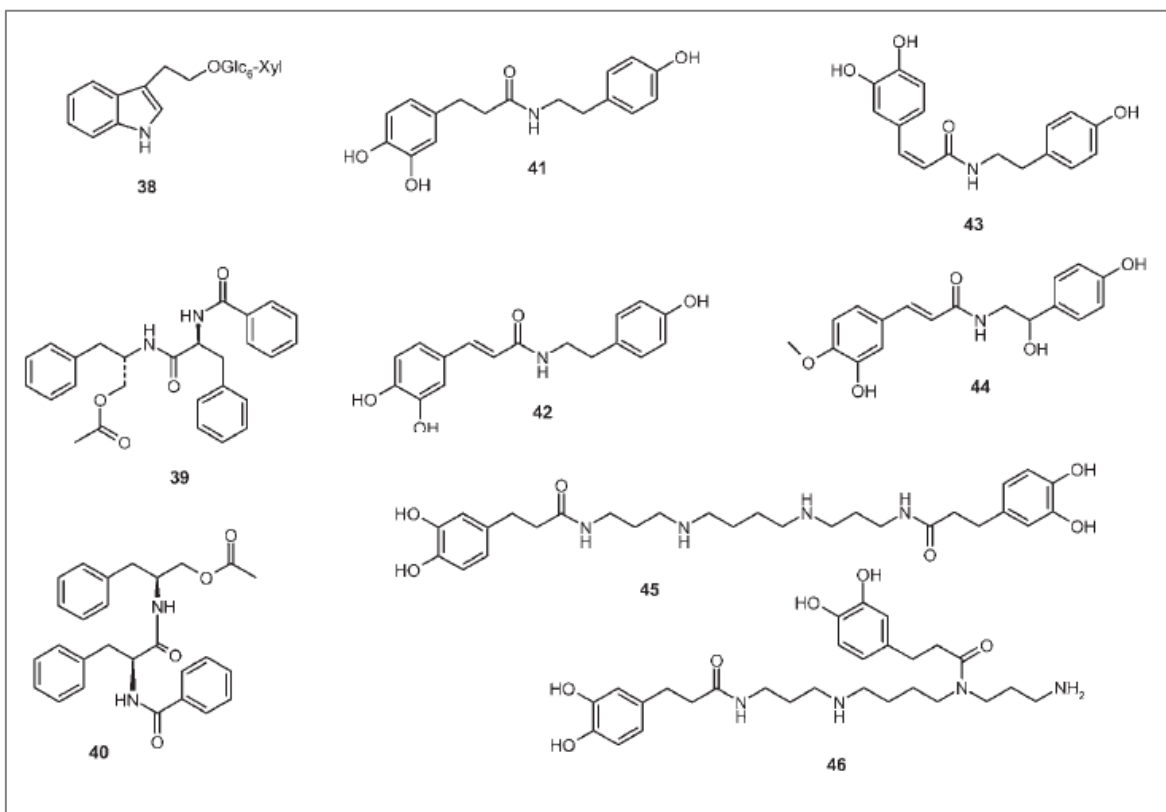
Sono stati eseguiti alcuni studi<sup>16</sup> anche sulle radici di *L.Barbarum* e sono stati isolati con l'HPLC, i ciclopeptidi lyciumine A e B, precedentemente trovati in *L.Chinense*.

La radice contiene inoltre betaina, colina, acido linoleico e  $\beta$ -sitosterolo.

La presenza di atropina nelle radici è stata citata nella stessa pubblicazione<sup>14</sup> in cui era stata riportata un'alta concentrazione di questo alcaloide nel frutto.

Questo dato è in contraddizione con i risultati ottenuti precedentemente<sup>15</sup> e quindi si esclude la presenza di atropina e scopolamina nelle corteccia della radice.





Vari composti ritrovati nella radice del L.Chinense: Fig. 38: glucoside indolico analogo del triptofano, Fig. 39: aurantiamide acetato, Fig. 40: lyciumamide, Fig. 41,42,43,44: una serie di derivati tiaminici, Fig. 45 e 46: alcaloidi spermina kukoamine A e B. Potterat <sup>c</sup>, 2010.

## NEI FIORI E NELLE FOGLIE:

Le analisi fitochimiche sulle foglie si sono concentrate sul L.Chinense e solo poche informazioni sono disponibili sui costituenti del L.Barbarum.

I Terpenoidi sono certamente i costituenti più interessanti delle foglie del L.Chinense. Sono stati isolati una serie di glicosidi diterpenici aciclici detti Lyciumosidi I-IX (Fig. 70-78). Questi Lyciumosidi appaiono piuttosto specifici del L. chinense, infatti sono stati rilevati solo nella pianta *Nicotiana Attenuata*.

Due steroidi del tipo withanolide, i withanolidi A e B (Fig. 79 e 80), purificati già nel 1970 dalla *Withania Somnifera*, hanno mostrato proprietà anti-infiammatorie e sono stati considerati per molto tempo il principale principio attivo del genere *Lycii*.

Infine è stato isolato il  $\beta$ -sitosterolo e il suo glucoside.

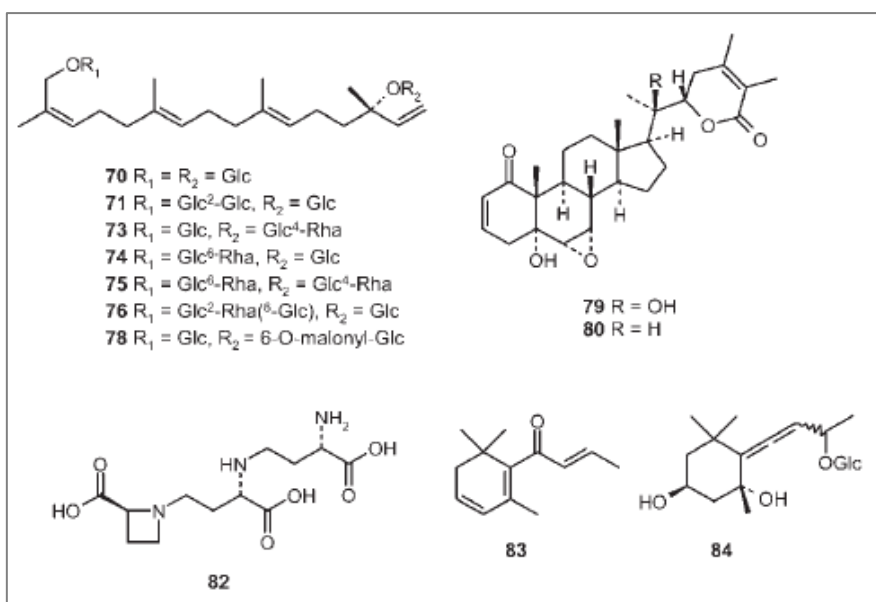
I flavonoidi rappresentano un ulteriore gruppo di metaboliti importanti nelle foglie. Sono stati isolati gli agliconi apigenina, quercetina, acetina, luteolina, e il glucoside rutina.

Sono stati trovati i carotenoidi luteina e  $\beta$ -carotene, vari composti fenolici come la scopoletina, l'acido vanillico e l'acido clorogenico.

Inoltre sono presenti composti azotati tra i quali l'ubiquitario chelante dei metalli nicotianamina (Fig. 82), l'ipoxantina, e i nucleosidi inosina, citidina 5'-monofosfato e uridin-5'-monofosfato. La composizione di aminoacidi liberi subisce forti variazioni stagionali, ma alanina, istidina e prolina prevalgono durante tutto l'anno. L'acido citrico è il maggior acido organico volatile presente nelle foglie seguito dall'acido ossalico.

Fruttosio, galattosio, maltosio e saccarosio sono stati trovati come zuccheri liberi.

Infine il contenuto totale di tannini nelle foglie è stato stimato essere tra 0.90-2.10%, ma non sono disponibili informazioni sulle strutture.



Alcuni composti ritrovati nei fiori e nelle foglie del *L. Chinense*:  
 Fig. 70-78:  
 Lyciumosidi I-IX,  
 Fig. 79,80:  
 Withanolidi A e B,  
 Fig. 82:  
 Nicotianamina,  
 Fig. 83,84:  
 Damascenone e il suo precursore.  
 Potterat <sup>c</sup>, 2010.

Riguardo i costituenti delle foglie del *L. Barbarum* ci sono poche informazioni. Sono stati isolati i flavonoidi quercetina 3-O-rutinoside-7-O-glucoside, Kaempferol 3-O-rutinoside-7-O-glucoside, rutina, nicotiflorina, isoquercetina, quercetina e kaempferol. Inoltre è stata riportata la presenza del damascenone (Fig. 83) e di un suo precursore glucosidico (Fig. 84), della colina, scopoletina, acido vanillico, acido salicilico e acido nicotinic.

Infine dai fiori sono stati isolati la diosgenina, il  $\beta$ sitosterolo e il lanosterolo.

Gli LBP sono considerati i più importanti costituenti funzionali delle bacche di Goji. Differenti frazioni degli LBP hanno diverse attività e la presenza di acido galatturonico è un elemento indispensabile per la loro attività. Le bioattività dei polisaccaridi hanno proporzionalità inversa rispetto al loro peso molecolare.

# **EFFETTI FARMACOLOGICI E MECCANISMI DEGLI LBP**

Molti studi preclinici e alcuni studi clinici sulle attività farmacologiche e i possibili meccanismi degli LBP, riportati nella letteratura, mostrano una vasta gamma di effetti terapeutici e medicinali sull'invecchiamento, sulla fatica, sul cancro, sull'ischemia, sul diabete, sul morbo di Alzheimer e sul glaucoma in diversi modelli animali.

In seguito verranno illustrate le varie attività biologiche attribuite al *Lycium Barbarum*, gli studi eseguiti e i possibili meccanismi d'azione.

## **AZIONE ANTIOSSIDANTE E ANTI-AGING**

Le bacche di Goji sono state a lungo usate nella medicina orientale come un potente agente anti-aging. Molti studi clinici<sup>17</sup>, vari studi preclinici<sup>17</sup> in vivo su animali e in vitro sulle culture cellulari, hanno mostrato l'efficacia del *L.Barbarum* e degli LBP come antiossidanti nella protezione contro varie condizioni correlate alla perossidazione.

L'invecchiamento è un deterioramento progressivo delle funzioni fisiologiche che ostacola la capacità dell'organismo di mantenere l'omeostasi e di conseguenza aumenta la suscettibilità dell'organismo alle malattie e alla morte. L'invecchiamento del sistema immunitario (immunosenescenza) è associato a una riduzione della risposta immunitaria e alla disregolazione funzionale. Questo comporta una meno efficace risposta adattativa e innata, aumenta la reattività contro gli antigeni self (autoimmunità), e diminuisce l'incidenza di malattie infettive e cancro.

Il danno ossidativo delle biomolecole aumenta con l'età ed è considerato il maggior fattore di causa di vari disordini degenerativi.

Lo stress ossidativo è una condizione in cui si ha un aumento della produzione di radicali liberi, di specie reattive (inclusi i prodotti reattivi della perossidazione dei lipidi, come i perossidi e le aldeidi reattive), e la conseguente produzione di reazioni ossidative, che provocano il danno cellulare e d'organo.

Gli antiossidanti o "spazzini dei radicali liberi" hanno un ruolo fondamentale nel ritardare l'invecchiamento biologico. Di conseguenza, il concetto di anti-aging derivante da antiossidanti come gli LBP è stato dimostrato da vari studi<sup>7</sup>. Lo stress ossidativo è

considerato come uno fra i tanti meccanismi responsabili degli effetti tossici in diversi organi a causa dell'aumentata produzione di radicali liberi dell'ossigeno; è ritenuto<sup>18,19</sup> il maggior fattore di rischio che contribuisce all'aumento della perossidazione dei lipidi e riduce gli antiossidanti nell' invecchiamento e nelle malattie correlate ad esso .

L'effetto degli LBP sullo stress ossidativo indotto dall' invecchiamento in diversi organi di topi vecchi è stato studiato da Li et al<sup>20</sup> nel 2007.

I topi sono stati trattati con una dose di LBP compresa tra 200 – 500 mg/kg di peso corporeo per 30 giorni. È stato osservato una riduzione della perossidazione dei lipidi endogeni e un aumento delle attività antiossidanti, con il ripristino ai normali livelli della superossido dismutasi (SOD), della catalasi (CAT), della glutazione perossidasi (GPx), della capacità antiossidante totale (TAOC), e un miglioramento delle funzioni immunitarie. Il livello di lipofuscina, un importante marker del danno ossidativo, aumentato in vari organi nei topi vecchi è stato soppresso dal trattamento con gli LBP.

Inoltre, l'alto livello di malondialdeide (MDA) nel sangue e in altri organi dei topi vecchi è stato abbassato dal trattamento con gli LBP.

L'effetto inibitorio degli LBP sulla perossidazione dei lipidi nei topi vecchi potrebbe essere, almeno in parte, attribuito all'influenza sugli enzimi antiossidanti e al sistema non enzimatico. Queste scoperte dimostrano che gli LBP possono promuovere gli enzimi antiossidanti e le funzioni immunitarie che sono sopresse nell'invecchiamento, e con ciò diminuiscono il rischio della perossidazione dei lipidi accelerata dalla generazione di radicali liberi causata dall'invecchiamento.

Una dieta ricca di grassi è associata allo sviluppo di obesità, diabete, ipertensione, malattie cardiovascolari e altre malattie degenerative del fisico; alcuni studi sperimentali<sup>21</sup> indicano che una dieta ricca di grassi può portare all'incremento dello stress ossidativo nei mammiferi.

Cui et al<sup>22</sup> (2011), Wu et al<sup>23</sup> (2010), Ma et al<sup>24</sup> (2009), hanno valutato gli effetti degli LBP sul metabolismo dei lipidi e degli zuccheri nel sangue, e dello stress ossidativo nei topi Kunming nutriti con una dieta ricca di grassi per due mesi.

I risultati mostrano che la somministrazione degli LBP diminuisce significativamente i livelli delle lipoproteine a bassa densità, del colesterolo totale (TC), dei trigliceridi (TG), del glucosio nel sangue e delle sostanze reattive con l'acido tiobarbiturico; aumenta invece l'attività degli enzimi antiossidanti come il SOD, GSH, GPx, CAT, rispetto al gruppo di

controllo. Ciò dimostra che gli LBP hanno una notevole inibizione contro l'ossidazione dei lipidi indotta dai radicali liberi causati da un'alimentazione ricca di grassi.

Li et Al<sup>25</sup> (2007) hanno riportato che la somministrazione di dosi di LBP, comprese tra 50 e 200 mg/kg di peso corporeo per 30 giorni, ripristina l'alterata capacità ossidativa a livelli quasi normali nei ratti Wistar con il diabete indotto da streptozotocina.

I risultati hanno mostrato che il trattamento con LBP ha aumentato i livelli delle attività degli enzimi antiossidanti del sangue e del fegato (SOD, GPx, CAT, la glutatione reduttasi (GR), e il glutatione (GSH) ) che erano diminuiti nei ratti diabetici; mentre ha diminuito il livello di MDA, che invece era aumentato in quegli animali.

Il regolare esercizio fisico ha molti benefici sulla salute come la prevenzione primaria e secondaria di varie malattie croniche (ad es. obesità, diabete, ipertensione, malattie cardiovascolari, osteoporosi). Tuttavia, uno sforzo fisico prolungato può aumentare drammaticamente l'assorbimento di ossigeno che è associato alla generazione di radicali liberi e specie reattive dell'ossigeno (ROS), superando così la capacità antiossidante di difesa.

Shan et Al<sup>26</sup> (2012) e Niu et Al<sup>27</sup> (2008) hanno esaminato gli effetti protettivi degli LBP contro il danno ossidativo nei muscoli scheletrici causato da uno sforzo fisico prolungato nei ratti Wistar maschi. L'esperimento sui ratti consisteva in un programma di esercizi fisici spossanti di 30 giorni. I ratti erano trattati con dosi di LBP tra 100-300 mg/kg di peso corporeo, per os una volta al giorno per un mese. Questo modello di sforzo fisico sperimentale promuoveva lo stress ossidativo nel tessuto muscolare scheletrico dei ratti, con una diminuzione nel muscolo del contenuto di glicogeno, una diminuzione nell'attività del SOD e GPx, e un aumento del livello di MDA e dell'attività della creatina chinasi (CK).

I risultati mostrano che con la somministrazione degli LBP diminuiva in modo dose-dipendente lo stress ossidativo indotto dallo sforzo fisico, con un aumento delle attività del SOD e GPx e una diminuzione del livello di MDA nei muscoli scheletrici.

Alcuni prodotti metabolici, che possono danneggiare i lipidi cellulari, vengono generati durante il processo in cui il galattosio viene ridotto in galattitolo, come per esempio l'aumento della perossidazione dei lipidi e della lipofuscina<sup>28</sup> che portano infine all'invecchiamento dell'organismo.

Continue iniezioni di D-galattosio negli animali causano inevitabilmente un disordine nel metabolismo del glucosio, e ciò provoca un metabolismo anormale nel fegato, cuore, reni, cervello e in altri organi importanti.

Un modello<sup>29</sup> di invecchiamento su topi indotto dal D-galattosio è stato usato per testare la capacità anti aging degli LBP. I risultati hanno mostrato che gli LBP aumentano i livelli nel sangue di SOD, CAT e GPx e riducono il livello di MDA; migliorano inoltre l'attività del SOD nella pelle e riducono il contenuto di MDA nella pelle.

Un effetto simile è stato osservato con gli LBP in un altro studio<sup>30</sup>.

Il loro meccanismo potrebbe essere collegato all'attenuazione del disordine nel metabolismo del glucosio e alla resistenza alla generazione di perossidi di lipidi e altre sostanze, che danneggiano i lipidi delle membrane cellulari.

Un altro studio<sup>31</sup> ha analizzato gli effetti inibitori degli LBP sulla glicazione non enzimatica nel modello di invecchiamento dei topi indotto dal D-galattosio. La proliferazione dei linfociti, l'attività delle interleuchine (IL)-2, le abilità di memoria e di apprendimento, e l'attività del SOD negli eritrociti è stata incrementata dagli LBP.

Gli effetti antiossidanti degli LBP sono stati esaminati in vivo anche nell'uomo.

Amagase e Nance<sup>32</sup> (2008) hanno eseguito uno studio clinico random, in doppio cieco, controllato con placebo, per studiare gli effetti generali dell'uso di un succo standard di *L.barbarum* (GoChi) per 14 giorni su dei soggetti cinesi in buono stato di salute.

Il succo GoChi contiene 1.632 mg/ al giorno di LBP (120ml, 13.6mg/ml). Il placebo coincideva nel sapore, colore e gusto con il GoChi, e consisteva in una formulazione di sucralosio, aroma artificiale di frutta, acido citrico, colore caramello in acqua purificata.

Gli effetti del GoChi sono stati esaminati tramite un questionario di voti soggettivi (da 0 a 5) delle sensazioni generali di benessere, dei malesseri sui tratti neurologici/psicologici, cardiovascolari, gastrointestinali e muscolo scheletrici e su altre possibile reazioni avverse.

Prima e dopo l'assunzione di 120 ml di GoChi al giorno o della soluzione placebo di controllo, sono stati misurati il peso, l'indice di massa corporea, la pressione sanguigna, i battiti cardiaci e l'acutezza visiva. Sono state osservate differenze significative tra il giorno 1 e il giorno 15 nel gruppo del GoChi (n=16) tra cui un aumento dell'energia, delle performance atletiche, della qualità del sonno, dell'abilità di concentrazione, dell'acutezza mentale, della calma, delle sensazione di salute e felicità. GoChi inoltre ha ridotto il senso di fatica e di stress e ha migliorato la regolarità della funzione gastrointestinale.

Al contrario, nel gruppo placebo (N=18), sono stati notati solo due cambiamenti significativi: il bruciore di stomaco e il tono dell'umore. Nessun significativo cambiamento nel distretto cardiovascolare e muscoloscheletrico è stato notato nei due gruppi. Tutti i dati dei parametri misurati (peso, pressione etc..) non erano molto diversi tra i due gruppi o tra il giorno 1 e il giorno 15. Questi risultati indicano chiaramente che il consumo di GoChi per 14 giorni aumenta le sensazioni soggettive di benessere generale e migliora la performance neurologica/ psicologica e la funzione gastrointestinale.

Amagase et Al<sup>33</sup> (2009) hanno in seguito condotto uno studio clinico randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, per esaminare gli effetti antiossidanti del succo GoChi in 50 adulti cinesi in buono stato di salute, con età compresa tra 55 e 72 anni.

Nello studio, questi soggetti sono stati trattati con un succo di goji contenente 13.6 mg/ml di LBPS in una dose di 120 ml al giorno o di placebo (n=25 per ogni gruppo) per 30 giorni. Prima e dopo il consumo di GoChi o di placebo sono stati misurati in vivo i markers antiossidanti inclusi i livelli nel siero di SOD, GPx, e perossidazione lipidica (indicata dal livello di MDA). I risultati mostrano che il consumo di GoChi ha aumentato significativamente il livello nel siero di SOD del 8.4% e del GPx del 8.7%. Questi dati indicano che un uso cronico del succo GoChi è ben tollerato nell'uomo e può promuovere la capacità antiossidante sovraregolando gli enzimi antiossidanti.

Quattro trial<sup>34</sup> clinici randomizzati, in cieco, controllati con placebo, sono stati eseguiti per identificare gli effetti generali dell'assunzione orale di 120 ml al giorno di GoChi. Ai partecipanti è stato dato un questionario con domande sui sintomi a cui assegnare un voto da 1 a 5. I punteggi ottenuti con il questionario sono stati analizzati statisticamente (medie ed errore standard) e i risultati sono stati espressi come presenza o assenza di miglioramenti.

Rispetto al gruppo placebo (n=80), il gruppo trattato con GoChi (n=81) ha mostrato significativi miglioramenti dell'astenia, dello stress, dell'acutezza mentale, nella facilità a svegliarsi, della capacità di concentrazione, sulla qualità del sonno, e sulle sensazioni di benessere generale e di salute. Alcuni modelli sperimentali più selettivi<sup>34</sup> hanno mostrato dei miglioramenti aggiuntivi della fatica, della depressione, della circolazione. L'odds ratio (un indice che definisce il rapporto di causa-effetto tra due fattori, per esempio tra un fattore di rischio e una malattia; calcolato attraverso il confronto tra le frequenze di comparsa dell'evento rispettivamente nei soggetti esposti e in quelli non esposti al fattore

di rischio in studio) ha indicato una probabilità molto alta che il GoChi migliora la fatica, le vertigini, la qualità del sonno.

Quindi le analisi confermano i vari effetti di promozione della salute del GoChi nell'uomo.

## **LBP<sub>s</sub> E SENESCENZA CELLULARE**

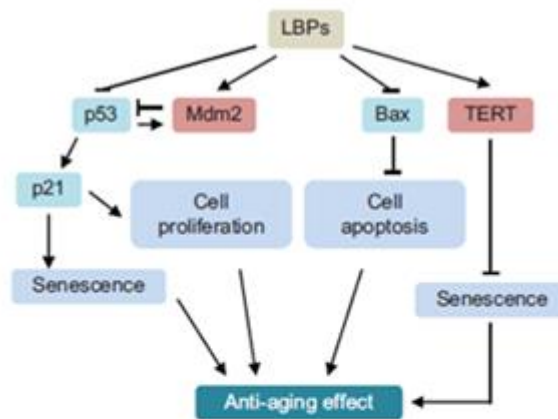
La senescenza cellulare può essere innescata da vari fattori come l'invecchiamento, un danno del DNA, l'attivazione di un oncogeno e lo stress ossidativo. La senescenza rappresenta una risposta allo stress in cui le cellule escono dal ciclo cellulare e perdono la capacità di proliferare in risposta ai fattori di crescita o ai mitogeni. Le cellule senescenti mostrano un' aumentata espressione dei biomarkers riconosciuti della senescenza, inclusa la colorazione della  $\beta$ -galattosidasi a pH 6.0, una diminuita capacità replicativa, un' aumentata espressione del p53, p21, p16 e altri inibitori chinasi ciclina-dipendenti come il p27 e p15. Il p53, un fattore di trascrizione tetramerico e soppressore tumorale, regola il controllo del ciclo cellulare, la riparazione del DNA, l'apoptosi, la senescenza cellulare e la risposta cellulare allo stress. Il p53 può promuovere o inibire la senescenza. Il p21 è il primo target a valle identificato del p53, ed è un mediatore essenziale dell'arresto del ciclo cellulare dipendente dal p53.

In un recente studio, Xia et Al<sup>35</sup> (2014), hanno esaminato il meccanismo d'azione degli LBP attraverso il saggio SA- $\beta$ -gal, hanno valutato il tasso di sopravvivenza in vivo, e hanno determinato il profilo d'espressione dei geni correlati alla via di segnalazione del p53 in un modello di embrione di pesce esposti a varie concentrazioni di LBP (1.0- 4.0 mg/ml) per 3 giorni.

I risultati hanno indicato che l'apoptosi cellulare e la senescenza avvenivano per lo più nella zona cefalica 24 ore e 72 ore dopo la fecondazione. Inoltre, è stata osservata resistenza alla senescenza replicativa a basse dosi di LBP, specialmente alla concentrazione di 3.0 mg/ml. La senescenza replicativa è il processo che regola la capacità riproduttiva delle cellule che in genere non è infinita. Infine, l'espressione dei geni relativi all'invecchiamento, come il p53, il p21 e la Bax, è diminuita mentre Mdm2 (una ligasi E3 ubiquitina p53 specifica, che agisce come principale antagonista cellulare del p53) e i geni della telomerasi trascrittasi inversa (TERT) sono sovraregolati dagli LBP.



I risultati indicano che gli effetti benefici degli LBP sull'apoptosi cellulare e sull'invecchiamento potrebbero essere mediati dal percorso di segnalazione mediato da p53.



Possible mechanisms for the anti-aging effect of LBP in zebrafish.  
 Notes: LBP shows marked anti-aging effect through the inhibition of cell apoptosis and senescence. LBP decreases the expression of p53, p21, and Bax; whereas increases the expression of Mdm2 and TERT in zebrafish. During aging, p53 is activated, triggering expression of pro-senescence targets such as p21, responsible for G1 cell-cycle arrest and E2F7, pivotal in repression of mitotic genes. Mdm2 acts both as an E3 ubiquitin ligase that recognizes the N-terminal trans-activation domain of p53 and as an inhibitor of p53 transcriptional activation.  
 Abbreviations: LBP, Lycium barbarum polysaccharides; TERT, telomerase reverse transcriptase. Cheng et Al<sup>3</sup>, 2015.

Liu et Al<sup>36</sup> (2011) ha esaminato gli effetti degli LBP sulla senescenza delle cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVECs) indotta dall'angiotensina II, ed il ruolo del p53 e p16 in questi effetti.

Le HUVECs sono state trattate con l'angiotensina II per indurre la senescenza cellulare, che è stata poi confermata attraverso la colorazione SA-β-gal. Il trattamento con LBP nelle cellule esposte ad angiotensina II ha provocato una diminuzione delle cellule β-gal-positive con una riduzione delle cellule in fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> ed un incremento delle cellule in fase S. È inoltre aumentata la vitalità delle cellule e sono significativamente diminuiti i livelli di espressione di p53 e p16 (entrambi regolatori della senescenza e soppressori tumorali) nelle HUVECs.

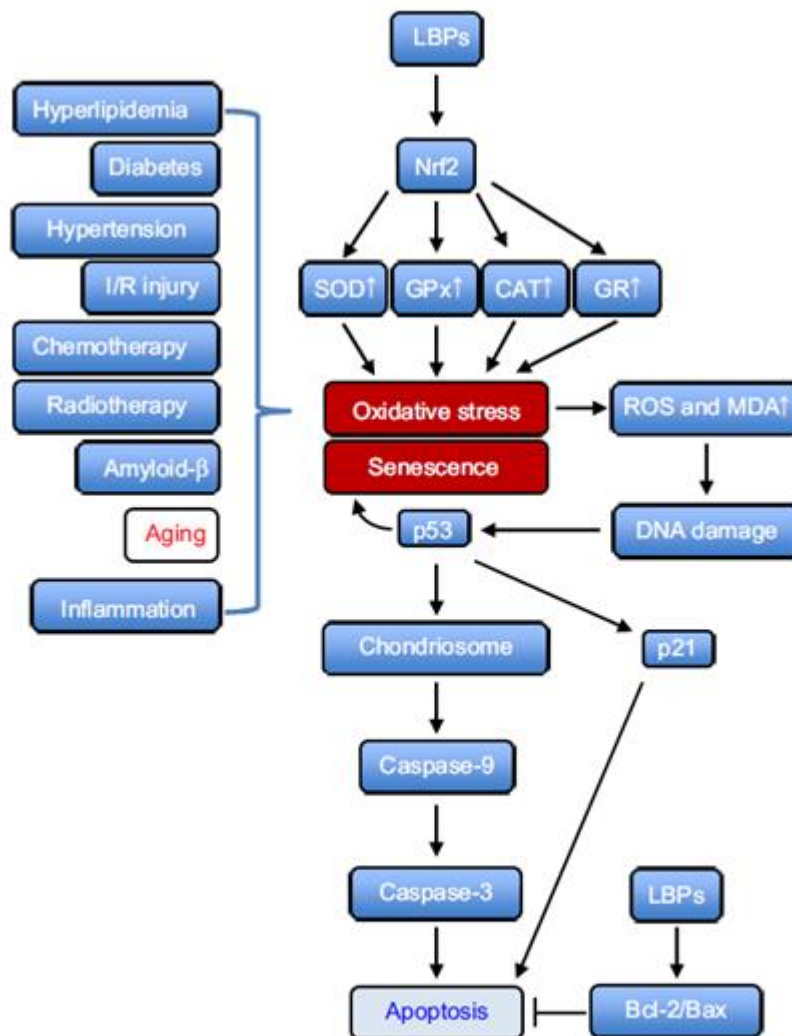
Questi risultati dimostrano che gli LBP ritardano l'invecchiamento delle HUVECs indotto dall'angiotensina II, probabilmente attraverso la downregulation dell'espressione di p53 e p16.

La senescenza mediata da p16 agisce<sup>37</sup>, attraverso la via definita "via del retinoblastoma", una proteina soppressore tumorale indicata con la sigla pRb o Rb. Questo meccanismo porta all'inibizione delle chinasi ciclina-dipendenti e all'arresto del ciclo cellulare in G<sub>1</sub>.

Rb è mantenuto in uno stato ipofosforilato che permette l'inibizione della trascrizione del fattore E2F1.

## RIEPILOGO ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE E ANTI-AGING

Riassumendo, gli LBP hanno mostrato potenti attività anti-aging e antiossidanti, attribuibili al miglioramento delle attività degli enzimi antiossidanti. In particolare gli LBP aumentano le attività di SOD, GPx, CAT e GR, inibendo così i danni indotti dallo stress ossidativo; inoltre migliorano anche l'apoptosi cellulare indotta dallo stress ossidativo e ritardano l'invecchiamento delle HUVECs indotto dall'angiotensina II, attraverso la downregulation dell'espressione di p53 e p16.



Possible mechanisms for the antioxidant activities of LBP:

Notes: LBP increase SOD, GPx, CAT, and GR activities, thereby inhibiting oxidative stress-induced damage. LBP ameliorate oxidative stress-induced cellular apoptosis. LBP can delay angiotensin II-induced aging of HUVECs by downregulating the expression of p53 and p16. In the I/R heart, LBP significantly decrease the myocardium LDH level, increase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>-ATPase activities. LBP ameliorate oxidative stress-induced cellular apoptosis by downregulating Bax and upregulating Bcl-2.

Abbreviations: LBP, Lycium barbarum polysaccharides; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; I/R, ischemia/reperfusion; HUVECs, human umbilical vein endothelial cells; Nrf2, nuclear factor erythroid 2-related factor; ROS, reactive oxygen species; MDA, malondialdehyde.

Cheng et al<sup>5</sup>, 2015.

# ATTIVITÀ ANTITUMORALE

La crescita e lo sviluppo di tumori sono caratterizzati da un'alta capacità proliferativa delle cellule tumorali, che spesso hanno mutazioni genetiche e disordini della regolazione del ciclo cellulare, dell'apoptosi, dell'autofagia e di altri processi critici. L'apoptosi ha un ruolo centrale nella progressione del cancro ed è un importante meccanismo di protezione contro la carcinogenesi grazie alla sua capacità di eliminare le cellule danneggiate o le cellule in eccesso.

Attualmente le terapie più comuni per il cancro sono la chirurgia, le radiazioni, la terapia ormonale, la chemioterapia e l'immunoterapia. Purtroppo, però, spesso l'azione di queste terapie è compromessa a causa dello sviluppo della resistenza ai farmaci e ai gravi effetti collaterali. Per questo c'è un forte bisogno di trovare dei composti antitumorali potenti e non pericolosi di origini naturali. È stato scoperto che gli LBP hanno effetti apoptotici e antiproliferativi sulle cellule cancerose in vitro e in vivo, inoltre possono potenziare gli effetti delle terapie antitumorali e ridurre gli effetti collaterali. Sono stati studiati quindi gli effetti degli LBP sui più comuni tipi di cancro come il cancro al seno, alla cervice, colon rettile, gastrico, la leucemia, il cancro al fegato, alla prostata e il sarcoma.

## CANCRO AL SENO

Il cancro al seno è il cancro più comune nelle donne; nel 2012 è stato diagnosticato a 1.7 milioni di donne nel mondo, di cui ne sono morte 522.000. Attualmente la chemioterapia per il cancro al seno allo stadio avanzato fallisce a causa della resistenza tumorale e degli effetti collaterali. Le medicine naturali sono diventate un importante approccio complementare per il trattamento del cancro al seno.

Li et Al <sup>38</sup> (2009) hanno riportato per primi che gli LBP inibiscono la crescita delle cellule MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7 cells) attraverso il cambio delle vie metaboliche dell'estradiolo. Le cellule MCF-7 sono una linea cellulare epiteliale di carcinoma mammario umano particolarmente responsiva agli estrogeni.

Gli LBP hanno dimostrato un'inibizione dose dipendente della crescita delle cellule MCF-7 del 9.5% - 42.8% al giorno 3, e del 33.9% - 83.9% al giorno 7. La risposta inibitoria al

giorno 3 all'1% di LBPs (concentrazione massima citostatica) ha mostrato un aumento dell'estrone (E1) del 84.8% , un aumento di 3.6 volte del 2-OH-E<sub>1</sub>, una diminuzione del 33.3% del 16 $\alpha$ -OH- E1, e un aumento di 9.2 volte della formazione dell'estriolo (E<sub>3</sub>). In particolare gli LBPs sembrano inibire la proliferazione delle cellule MCF-7 con recettore positivo all'estrogeno modulando il metabolismo dell'estrogeno e scambiando le vie metaboliche.

Shen e Du<sup>39</sup> (2012) hanno analizzato il meccanismo degli effetti antiproliferativi degli LBPs sulle cellule MCF-7. Queste cellule sono state trattate con 10-300 mg/L di LBPs per 24 ore. Il trattamento con LBPs ha arrestato le cellule MCF-7 nella fase S del ciclo cellulare. Gli LBPs hanno attivato in maniera dose dipendente il segnale extracellulare regolato dalla chinasi 1/2 (Erk 1/2), che è associato all'espressione del p52. Questi risultati indicano che gli LBPs inibiscono la crescita delle cellule MCF-7 attraverso l'attivazione di Erk 1/2.

## **CARCINOMA ALLA CERVICE**

Il carcinoma alla cervice è al terzo posto dei cancro più comuni nelle donne, ed è stato responsabile della morte di 266.000 donne nel 2012. Trovare nuove terapie di origine naturale per questo carcinoma è di fondamentale importanza.

Hu e Ai<sup>40</sup> (1994) hanno usato gli LBPs in combinazione con l'aglio per trattare i topi portatori di cancro umano alla cervice (U14 ). L'esame del liquido ascitico ha rivelato il danneggiamento delle cellule tumorali, del DNA e dell' RNA da parte dell'aglio e degli LBPs, e l'assedimento delle cellule cancerose da parte di un numero elevato di macrofagi e leucociti. Inoltre, attraverso l'analisi della citometria a flusso, è stato notato un accumulo di cellule in fase G<sub>0</sub>.

Il numero di cellule in fase S è diminuito dal 56% al 49%, e il numero di cellule in fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> è aumentato dal 16% al 33%. Il trattamento con gli LBPs e l'aglio ha rigonfiato i mitocondri nel citoplasma, ha danneggiato le creste mitocondriali con formazione di cavità, e ha provocato la degranolazione del reticolo endoplasmatico rugoso.

Zhu e Zhang<sup>41</sup> (2013) hanno esaminato il meccanismo degli effetti anti proliferativi degli LBPn nelle cellule HeLa del cancro cervicale umano. L'incubazione delle cellule HeLa con 6.25 mg/L di LBPn per 4 giorni ha determinato l'inibizione del 35% della crescita cellulare. È stato osservato anche un accumulo significativo di cellule in fase S e in fase sub-G<sub>1</sub>.

Gli LBPn hanno inoltre aumentato in maniera dose dipendente la concentrazione intracellulare di Ca<sup>2+</sup> nelle cellule apoptotiche. Una quantità di 6.25-100 mg/ml di LBPn ha aumentato il contenuto di NO nel mezzo di cultura a un livello basale nelle cellule HeLa. Le attività della NO sintetasi e della NO sintetasi inducibile nel mezzo di cultura sono state significativamente aumentate nelle cellule HeLa trattate con 100 mg/L di LBPn. Queste scoperte indicano che gli LBPn inibiscono la crescita delle cellule HeLa attraverso l'induzione dell'apoptosi mediata dai mitocondri.

## **CARCINOMA COLON-RETTALE**

Il carcinoma colon rettale è il terzo cancro più comune nel mondo, nel 2012 sono stati diagnosticati 1.4 milioni di nuovi casi, ed è la seconda causa di morti legate al cancro negli USA. A causa delle relativamente scarse prognosi e delle risposte alla chemio e radioterapia, c'è una grande necessità di scoprire nuovi agenti efficaci nel cancro del colon retto.

Le cellule delle linee cellulari SW480 e Caco-2 del cancro del colon retto sono state trattate con 100-1000 mg/L di LBPn per 1-8 giorni ed è stata osservata l'inibizione della proliferazione di entrambe le linee cellulari in una maniera dose dipendente. A concentrazioni da 400 mg/L a 1000 mg/L, gli LBPn inibiscono significativamente la crescita delle cellule SW480; mentre a concentrazioni da 200mg/L a 1000 mg/L gli LBPn inibiscono significativamente la crescita delle cellule Caco-2. Con il trattamento di LBPn le cellule si sono arrestate nella fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> con una diminuzione della fase S.

100-1000 mg/L di LBPn hanno provocato la down regulation dell'espressione della ciclina D, della ciclina E e della chinasi 2 ciclina-dipendente (CDK2) nelle cellule del carcinoma al colon. La ciclina E/CDK2 regola vari processi cellulari attraverso la fosforilazione di numerose proteine a valle. Nel cancro del colon retto c'è una disregolazione nell'espressione della ciclina D, della ciclina E e della CDK2.

Questi dati dimostrano gli effetti anti proliferativi degli LBP contro le cellule del carcinoma colon rettale attraverso la modulazione dei regolatori critici del ciclo cellulare.

## **CARCINOMA DELLO STOMACO**

Il carcinoma dello stomaco è il quinto cancro più comune e il terzo fattore di causa tra le morti di cancro. Il tasso di sopravvivenza a questo tipo di cancro è molto basso, perciò c'è un bisogno urgente di trovare nuove strategie terapeutiche.

Le cellule umane di carcinoma gastrico delle linee MGC-803 e SGC-7901 sono state trattate<sup>42</sup> con varie concentrazioni di LBP per 1-5 giorni. Il trattamento con LBP ha inibito la crescita delle cellule MGC-803 e SGC-7901, con un arresto del ciclo cellulare rispettivamente nella fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> e S. I cambiamenti nelle proteine associate al ciclo cellulare, come le cicline e le CDK, corrispondono ai cambiamenti nella distribuzione del ciclo cellulare. I risultati suggeriscono che l'induzione dell'arresto del ciclo cellulare contribuisce all'attività anticancro degli LBP nelle cellule del carcinoma gastrico.

## **LEUCEMIA**

La leucemia è un tumore che colpisce le cellule del sangue e il midollo spinale. Ci sono 4 sottotipi di leucemia: leucemia mieloide acuta, leucemia linfoblastica acuta, leucemia mieloide cronica e leucemia linfoblastica cronica. Nel 2012 è stata diagnosticata la leucemia a circa 352000 persone nel mondo.

È stato scoperto da Gan et Al<sup>43</sup> (2001) che una quantità di 20-1000 mg/L di LBP inibisce la crescita delle cellule HL-60 della leucemia promielocitica umana in maniera dose dipendente. Gli LBP inoltre inducono l'apoptosi delle cellule HL-60.

## **EPATOCARCINOMA**

Il cancro al fegato è il sesto cancro più comune nel mondo, con 782.000 nuovi casi diagnosticati nel 2012, ed è la terza causa delle morti relative al cancro. Il carcinoma epatocellulare è il più comune tipo di cancro al fegato primario, e i fattori che aumentano il rischio di sviluppare un carcinoma epatocellulare includono l'uso pesante e a lungo termine di alcol e le infezioni dei virus dell'epatite B e C.

Zhang e Al<sup>44</sup> (2005) hanno riportato che 10 mg/L di LBPs inibiscono la proliferazione delle cellule QGY7703 dell'epatocarcinoma umano, inducono l'arresto del ciclo cellulare, e aumentano significativamente la concentrazione intracellulare di Ca<sup>2+</sup>.

Chao et Al<sup>45</sup> (2006) hanno incubato le linee cellulari di ratto H-4-II-E e quelle umane di epatocarcinoma HA22T/VGH con varie concentrazioni di estratto grezzo di L.Barbarum (costituito principalmente da LBPs). L'estratto a concentrazione maggiore di 5 g/L ha inibito la proliferazione cellulare, ha promosso l'arresto del ciclo cellulare in fase G<sub>2</sub>/M, e ha stimolato l'apoptosi mediata da p53 nelle cellule H-4-II-E e HA22T/VGH.

L'effetto potrebbe essere causato dall'inibizione del fattore nucleare (NF)-kB che altera l'espressione delle proteine regolatrici del ciclo cellulare come la ciclina B e il p21WAF1/Cip1.

Zhang e Al<sup>46</sup> (2013) hanno scoperto che diverse frazioni di LBPs alla concentrazione di 50-400 mg/L per 2, 4, o 6 giorni hanno effetti diversi sulla proliferazione, sulla distribuzione del ciclo cellulare, e sull'apoptosi, nelle cellule SMMC-7721 dell'epatocarcinoma umano.

LBP-a4 ha la massima attività inibitoria alla dose di 400 mg/L per 2 giorni.

Le frazioni dei polisaccaridi LBP-a8, LBP-a3, LBP-a1, e LBP-a4 hanno inibito la crescita delle cellule SMMC-7721 in una maniera concentrazione-tempo dipendente. Contrariamente, LBP-p8 ha promosso la proliferazione delle cellule SMMC-7721 del gruppo di controllo alla concentrazione di 200 mg/L per 4 giorni.

Il trattamento delle cellule SMMC-7721 con 400 mg/L di LBP-a4 per 4 giorni ha arrestato le cellule nella fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo cellulare e ha aumentato la concentrazione intracellulare di Ca<sup>2+</sup>. Le cellule trattate con LBP-a4 nella fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> sono aumentate, mentre le cellule in fase S e G<sub>2</sub>/M sono diminuite.

Invece, l'incubazione delle cellule con 200 mg/L di LBP-p8 per 4 giorni ha aumentato leggermente l'indice delle cellule in fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> e S.

La concentrazione intracellulare di Ca<sup>2+</sup> delle cellule SMMC-7721 trattate con 400mg/L di LBP-a4 per 4 giorni è stata 1.59 volte maggiore di quella del gruppo di controllo, mentre quella delle cellule trattate con LBP-p8 è stata solo 1.07 volte maggiore delle cellule di controllo.

LBP-a4 è costituita da acido uronico per l'11.5%, da proteine per 0.34% e da zuccheri neutrali per 39.02%, mentre LBP-p8 è costituito da acido uronico per il 13.4%, da proteine per il 4.77% e da zuccheri neutrali per il 26.26%. LBP-p8 è formata da 7 tipi di monosaccaridi; invece LBP-a4 è composto da 6 tipi di monosaccaridi incluso il fucosio, l'arabinosio, lo xilosio, il glucosio, il mannosio e il galattosio. Il peso molecolare medio di LBP-a4 e di LBP-p8 è di 10.20 kDa e di  $6.50 \times 10^3$  kDa rispettivamente.

Questi risultati dimostrano che la diversa costituzione e la diversa struttura dei singoli LBP è responsabile di diverse attività degli LBPs. C'è una relazione tra la struttura e l'attività degli LBPs.

## **SARCOMA**

Il sarcoma è un tipo di cancro che si sviluppa da alcuni tessuti come le ossa e i muscoli. Ci sono due tipi principali di sarcoma: i sarcomi delle ossa e i sarcomi dei tessuti molli. I sarcomi dei tessuti molli si sviluppano dai tessuti molli come i muscoli, i nervi, i tessuti fibrosi, i tessuti adiposi, i vasi sanguigni e i legamenti. I tipi di sarcoma più comune negli adulti sono l'istiocitoma fibroso maligno, il liposarcoma, e il leiomiomasarcoma.

L'effetto del complesso polisaccaride-proteina del *L.Barbarum* (LBP3p) sul sistema immunitario nei topi portanti S180 è stato esaminato da Gan e Al<sup>47</sup> (2004). I topi, inoculati con una sospensione di cellule S180, sono stati trattati per os con 5 - 20 mg/kg di LBP3p per 10 giorni.

LBP3p ha inibito significativamente la crescita del sarcoma S180 trapiantabile e ha aumentato la fagocitosi dei macrofagi, la proliferazione dei linfociti della milza, l'attività citotossica dei linfociti T (CTL), il livello di espressione nell'mRNA di IL-2 e ha ridotto la perossidazione dei lipidi nei topi portanti l' S180.

La dose di 10 mg/kg di LBP3p è risultata più efficace rispetto a quella di 5 e 20 mg/kg.

Questi valori suggeriscono che LBP3p inibisce la crescita del sarcoma in vivo attraverso il potenziamento delle attività immunitarie.



## **CANCRO ALLA PROSTATA**

Il cancro alla prostata è il secondo cancro più comune negli uomini nel mondo. La chemioterapia per il cancro alla prostata solitamente porta alla resistenza ai farmaci e a dei gravi effetti collaterali nei pazienti. Pertanto c'è una grande necessità di trovare nuovi farmaci antitumorali in grado di prevenire la progressione del cancro alla prostata e di eliminare le cellule tumorali, che abbiano una migliore efficacia e dei minori effetti collaterali.

Gli effetti degli LBP sulla crescita delle cellule tumorali umane della prostata sono stati esaminati sia in vitro che in vivo da Luo e Al<sup>48</sup> (2009).

I risultati in vitro hanno mostrato che gli LBP inibiscono la crescita delle cellule PC-3 e delle cellule DU-145 in maniera dose e tempo dipendente, e causano la rottura dei filamenti di DNA in entrambe le linee cellulari. Inoltre gli LBP inducono l'apoptosi delle cellule PC-3 e DU-145. Dopo il trattamento con gli LBP, il rapporto dell'espressione della proteina Bcl-2/Bax è diminuito significativamente in modo dose dipendente; ciò suggerisce che gli LBP regolano l'espressione di Bcl-2 e di Bax per indurre l'apoptosi nelle cellule PC-3 e DU-145.

I risultati degli esperimenti in vivo indicano che gli LBP inibiscono significativamente la crescita del tumore PC-3 xenotrapiantato nei topi, con una riduzione del peso e del volume del tumore nel gruppo trattato con LBP rispetto a quello del gruppo di controllo.

## **STUDI CLINICI DEGLI LBP IN PAZIENTI CON TUMORI**

In un trial clinico<sup>49</sup>, 79 pazienti con un cancro in stato avanzato sono stati trattati con Lymphokine Activated Killer cells (LAK)/IL-2 in combinazione con LBP.

I risultati iniziali hanno indicato che la regressione del tumore è stata raggiunta da pazienti con melanoma maligno, carcinoma delle cellule renali, carcinoma colon rettale e cancro ai polmoni. L'indice della risposta dei pazienti trattati con LAK/IL-2 e LBP è più alto che quello dei pazienti trattati solo con LAK/IL-2. Anche la durata della remissione nei pazienti trattati con LAK/IL-2 e LBP è più lunga. Il trattamento con LAK/IL-2 e LBP ha portato a un aumento marcato delle attività delle cellule natural killer (NK) e LAK rispetto al trattamento con LAK/IL-2 da solo.

Gli LBP potrebbero essere usati come un adiuvante nella bioterapia del cancro.

## **RIEPILOGO AZIONE ANTITUMORALE**

Riassumendo, gli LBPs inibiscono la proliferazione di vari tipi di cellule tumorali e inducono l'arresto del ciclo cellulare in fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S, o G<sub>2</sub>/M; inibiscono inoltre la crescita del tumore xenotrapiantato nei topi.

Nei pazienti con cancro, il trattamento con LAK/IL-2 e LBPs ha portato ad un notevole aumento dell'attività delle cellule NK e LAK, maggiore rispetto al trattamento con LAK/IL-2 da solo.

Gli LBPs regolano l'espressione di Bcl-2 e di Bax per indurre l'apoptosi delle cellule tumorali tramite l'aumento della concentrazione intracellulare di Ca<sup>2+</sup> e la via mitocondriale.

Inoltre, gli LBPs inibiscono la crescita delle cellule MCF-7 attraverso l'attivazione di Erk1/2 e la modulazione del metabolismo dell'estrogeno; nelle cellule del cancro al colon gli LBPs provocano la downregulation dell'espressione della ciclina D, ciclina E, e CDK2.

Infine, gli LBPs stimolano l'apoptosi mediata da p53 nelle cellule dell'epatocarcinoma mediante l'inibizione di NK-kB.

# EFFETTI IMMUNOMODULATORI

Molti polisaccaridi naturali sono potenti immunomodulatori. Questi polimeri possono influenzare l'immunità innata e cellulo-mediata attraverso le interazioni con le cellule T, i monociti, i macrofagi e i linfociti polimorfonucleati. È stato riscontrato<sup>50</sup> che gli LBP hanno molteplici attività immuno-modulatorie in vitro e in vivo.

## CELLULE T, B, SPLENOCITI E MACROFAGI

Uno studio di Chen et Al<sup>50</sup> (2008) ha dimostrato che gli LBP e le loro due frazioni LBPF4 e LBPF5, stimolano la proliferazione delle cellule T, cioè quei linfociti derivanti dal timo che hanno un ruolo centrale nella generazione e nella regolazione della risposta immunitaria agli antigeni proteici nell'immunità adattativa.

Gli LBP, LBPF4, e LBPF5 attivano il fattore nucleare dei linfociti T attivati (NFAT) e la proteina attivatrice-1 (AP-1), inducono la trascrizione genica e la sintesi proteica di IL-2 e dell' interferone  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), stimolano le cellule T per la produzione di citochine Th1.

Le proteine NFAT hanno un ruolo chiave nello sviluppo e nella funzione del sistema immunitario; infatti nelle cellule T, le proteine NFAT regolano l'attivazione e lo sviluppo dei timociti, e la differenziazione delle cellule T.

L' AP-1 regola l'espressione genica in risposta ad una varietà di stimoli, tra cui citochine, fattori di crescita, lo stress e le infezioni batteriche e virali.

IL-2 è importante per la crescita e per l'attivazione delle cellule T, e IFN- $\gamma$  è un importante attivatore di macrofagi e induttore dell'espressione di molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC-II).

Questi risultati indicano che l'attivazione dei linfociti T indotta dagli LBP può contribuire alla funzione immunostimolante.

Gli effetti immunomodulanti in vitro e in vivo di LBPF4-OL sugli splenociti, sulle cellule T, cellule B e macrofagi di topo sono stati studiati da Zhang et al<sup>51</sup> (2011).

LBPF4-OL è la parte glicanica del complesso proteina-polisaccaride della frazione 4 di *L. barbarum* (LBPF4). Nello studio in vivo, ai topi sono stati iniettati 100  $\mu\text{g}$  / mL di LBPF4-OL al giorno per 6 giorni. I risultati hanno mostrato che LBPF4-OL ha indotto

marcatamente la proliferazione degli splenociti, ma non la proliferazione dei linfociti T e B purificati.

Ulteriori ricerche<sup>50</sup> in vitro hanno rivelato che LBPF4-OL può indurre nelle cellule della milza la produzione di IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  in modo concentrazione-dipendente.

Inoltre nei macrofagi LBPF4-OL promuove l'espressione del cluster di differenziazione (CD) 86 e delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC-II); infine rafforza notevolmente il rilascio di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

Chen et al<sup>52</sup> (2009) hanno scoperto che gli LBPs potenziano l'immunità innata grazie all'attivazione dei macrofagi. Il meccanismo è dovuto all'attivazione dei fattori di trascrizione NF-kB e AP-1 che inducono la produzione di TNF- $\alpha$  e l'upregulation delle molecole costimolatorie MHC-II.

## **CELLULE MONONUCLEATE DEL SANGUE PERIFERICO**

La produzione di citochine è un evento chiave nell'iniziazione e nella regolamentazione di una risposta immunitaria.

Gan et al<sup>53</sup> (2003) hanno studiato gli effetti del complesso proteina- polisaccaride della terza frazione del *L. barbarum* (LBP3p) sull'espressione di due citochine importanti nell'immunità antitumorale: l' interleuchina (IL) -2 e il fattore di necrosi tumorale (TNF- $\alpha$ ), nelle cellule mononucleate del sangue periferico mediante la PCR inversa.

I risultati indicano che la somministrazione di LBP3p ha aumentato l'espressione di IL-2 e TNF- $\alpha$  nel livello di mRNA e di proteine in modo dose-dipendente.

Quindi gli LBPs potrebbero indurre una risposta immunitaria in grado di contribuire all'effetto terapeutico nel cancro.

## **CELLULE DENDRITICHE**

Le cellule dendritiche (definite semplicemente "DC"), sono delle particolari cellule del sistema immunitario che hanno la funzione di catturare gli antigeni (Ag), esporli sulla propria superficie, e dare inizio alla risposta immunitaria adattativa nei linfociti T. Le DC hanno un ruolo nel mantenimento della funzione delle cellule B, esprimono una varietà di molecole di adesione, e anche di molecole costimolatorie compreso CD80 (B7-1) e CD86

(B7-2), che sono sovraregolate durante l'attivazione delle DC. Il CD86 è un marker di precoce maturazione delle DC, mentre CD80 è presente solo nelle DC mature.

Zhu et al<sup>54</sup> (2007) hanno studiato gli effetti in vitro degli LBP sulla maturazione fenotipica e funzionale delle cellule dendritiche derivate dal midollo osseo murino (BMDC). È stato osservato che 100 mg / L degli LBP aumentano la co-espressione di MHC-II, CD11c e la secrezione di IL-12 p40.

Chen et al<sup>55</sup> (2009) hanno rilevato che gli LBP sovraregolano l'espressione di CD40, CD80, CD86, e delle molecole MHC-II; inducono la produzione IL-12 p40 e p70, migliorano l'attività allostimolatoria, e sottoregolano l'assorbimento di Ag nelle DC. Inoltre, le DC trattate con gli LBP migliorano le risposte Th1 e Th2 in vitro e in vivo. Gli LBPs potrebbero essere utilizzati come un potente adiuvante per la progettazione di vaccini basati sulle DC.

## EFFETTI ANTIFATICA

La sindrome della fatica cronica (CFS) è un disordine complesso caratterizzato da una fatica persistente, che dura per almeno 6 mesi negli adulti e 3 mesi nei bambini o adolescenti, e presenta almeno 4 dei seguenti sintomi:

1. disturbi della memoria e della concentrazione tali da ridurre i precedenti livelli di attività occupazionale e personale;
2. faringite;
3. dolori delle ghiandole linfonodali cervicali e ascellari;
4. dolori muscolari e delle articolazioni senza infiammazioni o rigonfiamento delle stesse;
5. cefalea di tipo diverso da quella presente eventualmente in passato;
6. sonno non ristoratore;
7. debolezza post-esercizio fisico, che perdura per almeno 24 ore.

La fatica non è dovuta a sforzo, non è significativamente alleviata dal riposo, e non è causata da altre condizioni mediche.

I centri del controllo malattie affermano che più di un milione di americani hanno la CFS e l'80% dei casi non sono diagnosticati. La farmacoterapia svolge un ruolo minore nel controllo della CFS, mentre le erbe medicinali possono alleviarne i sintomi risultando una valida alternativa.

Gli effetti antifatica degli LBP sono stati valutati, da Luo et Al<sup>56</sup> (2000), somministrando 5 diverse dosi di LBP (5- 100 mg/kg/al dì ) in un modello di topi sottoposti ad un test di nuoto forzato con un carico peso (WFST).

I risultati mostrano che gli LBP inducono una notevole adattabilità al carico di esercizio prolungando il tempo della nuotata, e inducono una maggiore resistenza. Gli LBP aumentano l'immagazzinamento di glicogeno nei muscoli e nel fegato, aumentano l'attività dell' LDH prima e dopo la nuotata, prevengono l'aumento di acido lattico dopo la nuotata, diminuiscono l'aumento dell'azoto ureico nel sangue dopo un'intensa attività e ne accelerano la clearance.

La dose di 10 mg/kg/al dì di LBP è risultata la più efficace tra i cinque dosaggi testati.

Il fatto che gli LBP ritardano l'aumento di acido lattico nel sangue e promuovono il risparmio di glicogeno, indica che gli LBP contribuiscono ad aumentare la forza fisica e a migliorare la fatica fisica.

## **EFFETTI ANTIVIRALI**

Wang e Al<sup>57</sup> (2010) hanno preparato 4 solfati di polisaccaridi estratti dal *L.Barbarum* (sLBPs): sLBPs(0.7), sLBPs(1.1), sLBPs(1.5) e sLBPs(1.9), e hanno paragonato i loro effetti sull'infettività cellulare dei virus della malattia di New Castle (NDVs) nei fibroblasti di embrione di pulcino.

Quattro sLBPs a 5 concentrazioni diverse, e gli NDVs sono stati aggiunti in un sistema di coltivazione dei fibroblasti di embrione di pulcino in tre modi: prima e dopo l'aggiunta dei polisaccaridi, contemporaneamente all'aggiunta dei polisaccaridi e dei virus dopo essere stati mischiati.

Gli effetti dei sLBPs sull'infettività cellulare dei NDVs sono stati analizzati con il metodo MTT prendendo gli LBP non modificati come riferimento di controllo.

I risultati mostrano che gli sLBPs(1.5) e sLBPs(1.9), e sLBPs(1.1) nei tre modi di aggiunta, e sLBP(0.7) nell'aggiunta contemporanea alla miscelazione, inibiscono significativamente l'infettività dei NDVs. Gli indici di inibizione del virus di sLBPs(1.5) nell'aggiunta prima e contemporaneamente, e sLBPS(1.9) nell'aggiunta dopo, sono stati i più alti.

Gli LBP non modificati non hanno mostrato alcun effetto significativo in nessuna modalità di aggiunta.

Questi risultati indicano che la modificazione a solfati potenzia notevolmente l'attività antivirale degli LBP, che è correlata con il grado di solfatazione.

Il meccanismo dell'attività antivirale degli LBP non è ancora noto.

## **EFFETTI IPOLIPIDEMICI**

Luo et al<sup>58</sup> (2004) hanno esaminato l'effetto ipolipidemico degli LBP sui conigli con iperlipidemia indotta da allossana. Il trattamento con LBP per 10 giorni nei conigli ha ridotto in modo significativo le concentrazioni di colesterolo totale e trigliceridi nel siero, e ha aumentato notevolmente i livelli di HDL-C. Gli LBP hanno mostrato anche potenti attività antiossidanti nei conigli iperlipidemici.

# **EFFETTI CARDIOPROTETTIVI**

## **EFFETTI DEGLI LBPs SUL DANNO I/R AL MIOCARDIO**

Le malattie cardiovascolari e cardiache rappresentano un notevole e crescente problema globale, e sono una delle maggiori cause di mortalità nel mondo.

Lu e Zhao<sup>59</sup> (2010) hanno studiato gli effetti protettivi degli LBPs sul danno da ischemia / riperfusione ( I/R) nel miocardio dei topi.

I topi sono stati trattati con 150 mg/kg o con 300 mg/kg di peso corporeo di LBPs e in seguito è stata provocata la lesione I/R al miocardio. I cuori dei topi sono stati asportati e perfusi in modo retrogrado in una soluzione di Krebs-Henseleit per mantenere i livelli normali di pH, pO<sub>2</sub> e p CO<sub>2</sub>.

Gli LBPs hanno diminuito notevolmente il livello di LDH nel miocardio e hanno aumentato le attività Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasi e Ca<sup>2+</sup>-ATPasi. Inoltre, gli LBPs hanno diminuito in modo dose dipendente il tasso di cellule Bax positive nel miocardio e l'apoptosi delle cellule del miocardio, e hanno aumentato il tasso di cellule Bcl-2 positive.

Questi risultati indicano che gli LBPs proteggono il cuore del topo dal danno I/R attraverso la sovraregolazione della Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasi nel cuore e l'inibizione dell'apoptosi dei cardiomiociti.

Riassumendo, l'effetto cardioprotettivo degli LBPs verso il danno I/R è dovuto maggiormente alle attività antiossidanti, antiinfiammatorie e antiapoptotiche degli LBPs.

## **EFFETTI DEGLI LBPs SULLA CARDIOTOSSICITÀ INDOTTA DALLA DOXORUBICINA**

In un altro studio<sup>60</sup>, sono stati esaminati gli effetti cardioprotettivi degli LBPs verso la cardiotossicità acuta indotta dalla doxorubicina, sia in vitro che in vivo.

La doxorubicina (DOX) è un potente agente antitumorale, ma la sua cardiotossicità dose dipendente limita il suo uso clinico. La cardiotossicità indotta dalla DOX comporta la formazione di radicali liberi e l' amplificazione della disfunzione mitocondriale. A causa



dei bassi livelli di CAT e del GPX, disattivati nei cardiomiociti, il cuore risulta essere più suscettibile al danno ossidativo rispetto agli altri tessuti.

È stato dimostrato l'effetto cardioprotettivo dei LBPs contro la cardiotossicità acuta indotta dalla doxorubicina nei ratti<sup>61</sup> e nei cani beagle<sup>62</sup>, attraverso la loro azione antiossidante.

L'inibizione dello stress ossidativo, infatti, è ritenuto il meccanismo principale degli effetti cardioprotettivi degli LBPs, secondo Xin e Al<sup>61</sup> (2007), che hanno condotto uno studio meccanicistico nei ratti per valutare l'effetto protettivo degli LBPs nella cardiotossicità indotta dalla DOX.

Ai ratti sono stati somministrati per via orale 200 mg/kg/al giorno di LBPs per un periodo di 10 giorni, durante il quale nel settimo giorno sono stati iniettati 10 mg/kg di DOX, e alla fine dell'esperimento sono stati asportati i cuori dei ratti.

I risultati hanno mostrato che il pre-trattamento con gli LBPs per 10 giorni ha ridotto significativamente la lesione ossidativa indotta dalla DOX nel tessuto cardiaco e ha attenuato la vacuolizzazione citoplasmatica cardiaca indotta dalla DOX e il disarrangiamento delle miofibrille. Il pre-trattamento con gli LBPs ha diminuito il livello di MDA nel cuore e ha aumentato le attività del SOD e GPx nel cuore dei ratti trattati con la DOX. Gli LBPs hanno inoltre diminuito i livelli nel siero di CK, hanno invertito parzialmente la bradicardia indotta dalla DOX e hanno prolungato l'intervallo QT, come determinato dall'elettrocardiogramma.

In aggiunta, lo studio citotossico<sup>61</sup> in vitro ha mostrato che 100 µg/ml di LBPs proteggono dalla citotossicità indotta dalla DOX nei mioblasti cardiaci H9c2. L'incubazione di cellule umane A549 di carcinoma ai polmoni con 200 µg/ml di LBPs, non ha alterato l'attività antiproliferativa della DOX. Questi dati indicano che gli LBPs provocano un potente effetto protettivo sui danni ai cardiomiociti indotti dalla DOX attraverso vie antiossidanti e eliminazione di radicali liberi.

Xin e Al<sup>63</sup> (2011) hanno condotto un ulteriore studio nei cani beagle per esaminare se gli LBPs attenuano la cardiotossicità indotta dalla DOX.

Una somministrazione intravenosa di 15mg/kg di DOX ha indotto una cardiotossicità acuta nei cani beagle caratterizzata da anomalie della conduzione compresa la diminuzione della frequenza cardiaca, l'innalzamento del tratto ST, la prolungazione degli intervalli QT, l'inversione dell'onda T, l'aritmia, l'ischemia miocardica e l'aumentato livello di CK e aspartato transaminasi (AST) nel siero.

Un pre-trattamento orale con 20 mg/kg di peso corporeo di LBPs al giorno per 7 giorni, ha attenuato effettivamente sia le anomalie della conduzione indotta dalla DOX, sia l'aumento nel siero del CK e AST.

Tutti questi risultati confermano e estendono le precedenti osservazioni sui ratti riguardanti l'effetto protettivo degli LBPs sulla cardiotoxicità indotta dalla DOX.

# **EFFETTI PROTETTIVI DEGLI LBP SULL’ APPARATO GASTRO-INTESTINALE**

## **EFFETTI DEGLI LBPs SULLA COLITE**

Le malattie infiammatorie intestinali (inflammatory bowel disease - IBD) sono un gruppo di patologie caratterizzato dalla presenza di flogosi cronica e ricorrente del tratto gastrointestinale in assenza di eziologia infettiva. Le più rappresentative sono la malattia di Crohn e la rettocolite ulcerosa.

La colite ulcerosa è una malattia della mucosa rettale che interessa tutto il colon in modo continuo; mentre il morbo di Crohn è un processo infiammatorio che può interessare qualsiasi tratto dell’apparato digerente.

I sintomi che caratterizzano il morbo di Crohn e la colite ulcerosa sono generalmente molto diversi: nella maggior parte dei casi il morbo di Crohn si manifesta inizialmente con diarrea e dolori addominali localizzati nella parte dell’addome che corrisponde al tratto dell’intestino in cui è localizzata la malattia; mentre la colite ulcerosa si manifesta quasi sempre con diarrea e presenza di sangue e muco nelle feci.

Attualmente non esistono cure mediche per le IBD; lo scopo dei trattamenti farmacologici è quello di sopprimere la risposta infiammatoria, permettere la guarigione dei tessuti e alleviare i sintomi come la febbre, la diarrea, il dolore addominale ed il sanguinamento rettale. I principali farmaci oggi usati sono gli aminosalicilati, i corticosteroidi, gli immunosoppressori (azatioprina, 6-Mercaptopurina e methotrexato), gli antibiotici (metronidazolo, ampicillina, ciprofloxacina e altri) e terapie biologiche (infliximab).

Zhao e Al<sup>64</sup> (2014) hanno studiato gli effetti preventivi e curativi dei polisaccaridi grezzi (QHPS), estratti da una combinazione di due erbe contenenti LBPs e Astragalo in proporzione 2:3, nei ratti con colite. Nello studio sono stati usati ratti con la colite ulcerosa indotta dall’acido acetico.

I risultati mostrano che il trattamento con QHPS ha ridotto la perdita di peso e la diarrea associata alla colite ulcerosa e ha attenuato il danno alla mucosa del colon associata alla colite inducibile. Sono diminuiti inoltre i livelli nel siero di diamino ossidasi, D-lattato e endotossina, aumentati in precedenza dall’acido acetico. Il trattamento con QHPS ha

stimolato significativamente la proliferazione delle cellule-6 epiteliali intestinali dei ratti in modo dose dipendente.

Questo studio indica che i polisaccaridi estratti da questa combinazione di due erbe protegge dalla colite ulcerativa sperimentale, presumibilmente promuovendo il ricovero della barriera intestinale.

## **EFFETTI DEGLI LBPs SULLA LESIONE I/R INTESTINALE**

L'ischemia/riperfusionazione intestinale è una condizione che avviene frequentemente durante la chirurgia vascolare addominale e toracica, piccoli trapianti di intestino, shock emorragici, e chirurgia di bypass cardio-polmonario. L' I/R intestinale è associata ad una perdita della funzione della barriera intestinale, che facilita lo spostamento dei batteri nella circolazione innescando l'infiammazione sistemica. Inoltre, la riperfusionazione del tessuto intestinale danneggiato dall'ischemia, aggrava ulteriormente il danno al tessuto ed è considerato un effettore di infiammazione e insufficienza multiorgano, che rimane la principale causa di morte nei pazienti critici.

In un recente studio<sup>65</sup>, Yang e Al (2013) hanno esaminato gli effetti e i potenziali meccanismi degli LBPs sulla lesione I/R intestinale nei ratti. È stato usato un modello I/R comune in cui per indurre lesioni intestinali è stata bloccata e sbloccata l'arteria mesenterica superiore dei ratti.

Sono stati monitorati cambiamenti del MDA, dei fattori di necrosi tumorale (TNF)- $\alpha$ , l'attivazione del NF-kB, della molecola di adesione intercellulare (ICAM)-1, E-selectina, e dei relativi livelli degli enzimi antiossidanti, l'accumulo dei neutrofili polimorfonucleati, la permeabilità intestinale e l'istologia intestinale.

Gli LBPs hanno mostrato un marcato effetto inibitorio contro i radicali liberi e la perossidazione lipidica in vitro, inoltre hanno aumentato i livelli degli enzimi antiossidanti e hanno ridotto il danno ossidativo intestinale nei modelli animali di I/R intestinale.

In aggiunta, gli LBPs hanno inibito l'accumulo di polimorfonucleati neutrofili e l'espressione di ICAM-1, e hanno migliorato i cambiamenti nel livello del TNF- $\alpha$ , l'attivazione di NF-kB, la permeabilità e l'istologia intestinale.

Questi risultati indicano che gli LBPs proteggono dalle lesioni intestinali indotte dall'ischemia / riperfusionazione, probabilmente attraverso l'inibizione dello stress ossidativo indotto dall' I/R, l'inibizione della produzione di citochine e dell'infiammazione.

# **EFFETTI DEGLI LBPs SUL GLAUCOMA SPERIMENTALE E SULLA LESIONE ALLA RETINA INDOTTA DALL' I/R**

La lesione da I/R alla retina è associata a varie malattie oculari, come il glaucoma, l'amaurosi, l'amaurosi fugace e la retinopatia diabetica. Il danno ossidativo è una delle complicazioni che segue il danno I/R alla retina ed è accompagnato da gonfiore, dalla rottura della barriera fra sangue e retina (BRB), dalla morte delle cellule neuronali, e dall'attivazione delle cellule gliali. Il ruolo della BRB è di mantenere la condizione di omeostasi del microambiente retinale e di impedire alle sostanze nocive di entrare nella retina. La barriera esterna è formata dall'epitelio pigmentato retinico, separando la retina esterna dalla coroide; la BRB interna, invece, è formata da giunzioni strette delle cellule endoteliali vascolari e rivestita dai processi cellulari Muller.

In molte malattie oculari come l'occlusione ischemica della vena/arteria retinica e la retinopatia diabetica, la rottura della BRB interna aumenta la permeabilità vascolare retinale, provocando l'edema nella retina e la morte cellulare.

Il glaucoma, la principale causa di perdita della vista nel mondo, è associata con la perdita delle cellule gangliari della retina (RGCs) e dei loro assoni. La lesione I/R alla retina indotta dall'alta pressione intraoculare è il modello più comune utilizzato per gli studi della retina ischemica. Questo metodo produce un'ischemia totale attraverso l'occlusione della circolazione retinale e coroideale, e fornisce caratteristiche patologiche che sono quasi identiche a quelle osservate in pazienti dopo una occlusione dell'arteria retinica centrale o occlusione dell'arteria oftalmica.

Gli LBPs hanno mostrato<sup>66</sup> degli effetti protettivi nella lesione retinica indotta dall'I/R negli studi animali, inoltre nelle RGCs, nel sistema vascolare retinico e nella BRB nei modelli animali.

# **GLAUCOMA                    SPERIMENTALE:                    IPERTENSIONE OCULARE ACUTA**

L'ipertensione oculare acuta (AOH) è un modello usato per produrre la degenerazione retinica negli animali e studiare la patogenesi della morte delle RGC e i possibili interventi terapeutici per la neuroprotezione.

Molti studi animali<sup>67,68</sup> hanno mostrato gli effetti protettivi degli LBP contro la lesione retinica indotta dall' AOH.

Mi e Al<sup>68</sup> (2012) hanno valutato l'effetto protettivo degli LBP sulla lesione I/R retinale indotta dall' AOH nei ratti.

Nella retina con AOH di controllo, sono stati osservati la perdita delle RGCs, l'assottigliamento dello spessore dello strato interno della retina, l'aumento della fuoriuscita delle immunoglobuline G (IgG), la rottura delle giunzioni strette e la diminuzione della densità dei vasi sanguigni della retina.

Nella retina con AOH trattata con gli LBP invece, c'è stata una minore perdita delle RGCs con l' assottigliamento dello spessore dello strato interno della retina, la fuoriuscita delle IgG, una struttura più continua delle giunzioni strette associata ad un più alto livello di proteina occludina, ed il recupero della densità del vaso sanguigno rispetto alla retina con AOH di controllo.

L'effetto neuroprotettivo degli LBP avviene attraverso la down regulation dei prodotti finali della glicazione e dei loro recettori ( l'endotelina-1 e l' amiloide- $\beta$  (A $\beta$ ) nella retina), e delle relative vie di segnalazione, correlate all'inibizione dei danni vascolari e alla degenerazione neuronale nei danni provocati dall'AOH.

Questi dati suggeriscono che gli LBP prevengono il danno alle RGCs causato dal danno ischemico, indotto dall'AOH, e quindi potrebbero essere usati nel trattamento della retinopatia vascolare.

He e al<sup>67</sup> (2014) hanno in seguito esaminato i meccanismi degli effetti protettivi degli LBP sul danno retinale indotto dall'AOH nei ratti. Ai ratti è stato somministrato 1 mg/kg/al giorno di LBP per una settimana prima di indurre l'AOH nell'occhio sinistro.

Il raggiungimento dell'ischemia nella retina è stato confermato dal collasso dell'arteria retinica centrale e dallo sbiancamento dell'iride durante l'elevazione della pressione intraoculare.

Gli effetti protettivi degli LBP sono stati valutati quantificando la sopravvivenza delle cellule gangliari e delle cellule amacrine, e misurando l'apoptosi cellulare negli strati della retina. Inoltre è stato misurato il fattore di trascrizione nucleare eritroide-2- correlato (Nrf2) nel citoplasma e nel nucleo, e l'espressione dell'eme ossigenasi-1 (HO-1).

L'HO-1 è l'enzima che catalizza la degradazione dell'eme in biliverdina, monossido di carbonio e ferro, ed è uno degli enzimi detossificanti di fase 2 e antiossidante che sono regolati strettamente dal Nrf2.

Nella retina con lesione I/R è stato osservato un aumento dell'apoptosi e una riduzione del numero di cellule vitali nello strato delle cellule gangliari (GCL) e nello strato nucleare interno (INL), mentre è stato osservato il contrario nella retina trattata con LBP.

Nei ratti pre-trattati con LBP, il tasso della perdita delle RGC è stato ritardato e più del 50% delle RGCs sono rimaste vive nella retina per 7 giorni dopo l'insulto ischemico. Paragonata alla retina con danno I/R di controllo, quella trattata con LBP ha mostrato un aumento del numero di cellule amacrine della retina positive alla colina acetiltransferasi.

Nei ratti con la retina I/R, il pre-trattamento con LBP ha diminuito il livello delle specie reattive all'ossigeno (ROS), e ha aumentato il numero di RGCs con traslocazione nucleare di Nrf; inoltre ha sovra-regolato l'espressione del HO-1 nella retina.

Questi dati dimostrano che gli LBP esercitano effetti retino- e neuro-protettori attraverso l'attivazione del Nrf2 e l'upregulation dell'espressione di HO-1.

## **GLAUCOMA SPERIMENTALE: IPERTENSIONE OCULARE CRONICA**

Gli LBP hanno mostrato dei potenti effetti neuroprotettivi nei modelli di ipertensione oculare cronica (COH), mediante la riduzione della perdita delle RGCs.

Chan e Al<sup>69</sup> (2007) hanno valutato se la somministrazione orale di LBP protegge le RGCs dalla COH nei ratti.

Nei ratti è stata indotta la COH ed è stato osservato che gli LBP hanno diminuito notevolmente la perdita delle RGCs, anche se l'alta pressione oculare non è stata alterata

significativamente. In particolare, la morte delle RGCs è stata ritardata del 70% e questo effetto neuroprotettivo è durato quattro settimane.

Questi risultati indicano i benefici terapeutici del L.Barbarum contro la neurodegenerazione della retina nei modelli di ratti con COH.

L'effetto neuroprotettivo degli LBPs nei ratti con COH è parzialmente dovuto alla modulazione dell'attivazione della microglia, in quanto modificare lo stato di attivazione della microglia è benefico per la protezione neuronale.

Questo effetto è stato osservato da Chiu e Al<sup>70</sup> (2009) i quali, attraverso l'uso di un microscopio confocale –multifotone, hanno esaminato i cambiamenti morfologici della microglia nelle retine dei topi con COH.

Le retine con COH hanno mostrato una microglia leggermente attivata. La somministrazione di 1-100 mg/kg di LBPs ha prodotto una microglia moderatamente attivata nella retina interna con aspetto ramificato ma con processi focali più spessi e ingranditi.

Uno studio proteomico<sup>71</sup> ha evidenziato che l'effetto degli LBPs sull'aumentata sopravvivenza delle RGCs nei ratti con COH, può essere causato da un aumento dell'upregulation del cristallino  $\beta$ B2, che è un agente neuroprotettore.

## **DEGENERAZIONE DELLA RETINA**

Nella retina esterna, gli LBPs hanno mostrato<sup>72</sup> una riduzione dell'apoptosi nei fotorecettori dei topi rd1 con degenerazione dei fotorecettori.

I topi omozigoti per la mutazione rd1 hanno un' insorgenza precoce della degenerazione retinica grave, a causa di un inserto virale di una murina e di una seconda mutazione nonsense nell'esone 7 del gene Pde6b in tutti i ceppi di topi con la mutazione rd1.

Il trattamento con LBPs ha aumentato l'attività del GPx e i livelli del GSH e ha diminuito la concentrazione di cisteina nelle retine rd1.

Questi dati indicano che gli effetti degli LBPs a favore della sopravvivenza nei fotorecettori nella retina rd1 dei topi sono dovute principalmente alla riduzione dello stress ossidativo.



## **LESIONE ISCHEMICA ALLA RETINA INDOTTA DALL'OCCLUSIONE DELL'ARTERIA CEREBRALE MEDIA (MCAO)**

Li e Ai<sup>66</sup> (2011) hanno studiato gli effetti del pretrattamento con LBP sulle lesioni alla retina indotte dall'occlusione dell'arteria cerebrale media (MCAO) nei topi.

Prima di indurre la MCAO, i topi sono stati trattati per via orale con 1 mg/kg di LBPs una volta al giorno per una settimana. L'ischemia alla retina è stata mantenuta per 2 ore, dopodiché è stata fatta la riperfusione per 22 ore. Le cellule nel GCL della retina centrale e periferica sono state contate ed è stato valutato il rigonfiamento retinico attraverso la misurazione dello spessore della retina interna dalla membrana interna limitante al INL.

Sono stati determinati l'espressione dei livelli della proteina fibrillare acida della glia (GFAP), dell'acquaporina-4 (AQP4), di poli ADP-ribosio (PAR) e di nitrotirosina (NT) nella retina dei topi. L'integrità della BRB è stata analizzata con la misurazione della fuoriuscita di IgG.

Lo studio ha mostrato che, nei topi I/R trattati con LBPs rispetto a quelli del gruppo di controllo, il numero di cellule nel GCL della retina centrale e periferica è aumentato notevolmente; c'è stata una riduzione dello spessore della retina interna nella retina centrale, e sono state trovate poche cellule apoptotiche nel GCL e INL. Inoltre è stato evidenziato un aumento dell'espressione della proteina chinasi C- $\alpha$  (un marker per le cellule bipolari rod) e della calretinina nelle cellule amacrine. Inoltre non è stata trovata l'espressione della NO sintasi neuronale nelle cellule amacrine.

In condizioni ischemiche è avvenuta la rottura della BRB che ha causato il rigonfiamento degli astrociti e delle cellule di Muller e l'attivazione di GFAP e AQP4.

Nei topi I/R trattati con LBPs rispetto a quelli del gruppo di controllo, l'immunoreattività del GFAP negli astrociti del GCL è stata ridotta, come anche l'immunoreattività di AQP4 espressa negli astrociti della membrana limitante interna e nell'INL.

Il trattamento con LBP ha inoltre ridotto il numero di vasi sanguigni della retina con fuoriuscita di IgG, l'espressione della traslocazione nucleare del PAR e l'espressione di NT.

La rottura dei filamenti di DNA ha attivato l'enzima nucleare poli ADP-ribosio polimerasi (PARP) per produrre il PAR. La formazione di radicali liberi ha facilitato la produzione di

NO, che ha reagito con il superossido per formare il perossinitrito, un forte ossidante che porta alla nitratura dei residui di tirosina delle cellule per formare NT.

Questi risultati indicano che il pretrattamento con LBP nei topi protegge realmente la retina dall'apoptosi delle RGC, dal rigonfiamento retinale, dall'attivazione delle cellule gliali, dalla rottura della BRB e dallo stress ossidativo.

## **RECISIONE COMPLETA O PARZIALE DEL NERVO OTTICO**

Li e Al<sup>73</sup> (2013) hanno studiato gli effetti protettivi degli LBP sulle RGCs sui ratti sottoposti alla recisione completa o parziale del nervo ottico (CONT o PONT).

Ai ratti è stato somministrato 1 mg/kg/al giorno di LBP per 7 giorni prima della procedura chirurgica. Sono stati determinati i livelli d'espressione di molte proteine coinvolte nell'infiammazione, nello stress ossidativo e nella via delle c-Jun chinasi N- terminali (JNK)/ c-Jun.

Gli LBP non hanno ritardato la degenerazione primaria delle RGCs dopo la CONT o la PONT, ma hanno ritardato la degenerazione secondaria delle RGCs dopo la PONT.

Questi risultati dimostrano che gli LBP riducono la degenerazione secondaria delle RGCs attraverso l'inibizione dello stress ossidativo e della via JNK/c-Jun e attraverso l'aumento dell'espressione del fattore di crescita insulina simile (IGF-1).

Chu e al<sup>74</sup> hanno esaminato anche gli effetti protettivi degli LBP sulla retina nel modello di ratto con PONT durante l'elettroretinogramma multifocale (mfERGs).

La mfERG permette di registrare più risposte retiniche locali entro un breve periodo di tempo, ed è ampiamente utilizzato negli studi animali e umani delle ricerche sul glaucoma.

Ai ratti è stato somministrato 1 mg/kg di LBP tutti i giorni fino all'eutanasia.

La procedura di PONT è stata fatta 7 giorni dopo l'inizio del trattamento con LBP.

Nella risposta alla mfERG, è stato osservato la forma dell'onda nei ratti che contiene una depressione (N1) a circa 25 millisecondi, seguito da un'importante componente positiva (P1) a circa 55 millisecondi, e una risposta fotopica negativa (PhNR) a circa 75 millisecondi.

La risposta mfERG topografica mostra una forte funzione retinica lungo la banda visiva, con un picco nel campo nasale in entrambe le condizioni, con e senza PONT.

Dopo la somministrazione di 1 mg/kg di LBP per una settimana prima della procedura PONT, nei ratti è stato osservato un aumento delle risposte N1, P1 e PhNR, in particolare nella retina inferiore, rispetto al gruppo di controllo. Le ampiezze delle onde N1 sono aumentate notevolmente alla 4° settimana dopo la PONT, tranne che nelle regioni superiori. L'ampiezza dell'onda P1 nella regione superiore distante, ha mostrato una forte riduzione una settimana dopo la PONT, ma poi è tornata al livello normale. Le ampiezze dell'onda P1 sono rimaste normali in altre regioni dopo la PONT ma sono aumentate significativamente nella retina inferiore 4 settimane dopo la PONT. L'ampiezza dell'onda PhNR si è ridotta notevolmente nella retina superiore una settimana dopo la PONT ma poi è tornata gradualmente ai livelli normali. L'ampiezza dell'onda PhNR nella retina inferiore sembra aumentata dopo la PONT con un prolungamento dell'assunzione di LBPs, ma questo effetto non è stato statisticamente significativo.

Questi risultati indicano che gli LBPs riducono il deterioramento della funzione retinica dopo la PONT attraverso meccanismi sconosciuti.

# EFFETTI EPATOPROTETTORI

## STEATOSI EPATICA

La steatosi epatica alcolica (AFLD) è una malattia cronica caratterizzata da un eccessivo accumulo di grasso all'interno del fegato causato dal consumo cronico di alcol, che tipicamente progredisce dallo stato di fegato grasso (semplice steatosi), a epatite alcolica, a epatite cronica fino agli stati di fibrosi epatica e di cirrosi.

Il consumo cronico di alcol causa la secrezione di alcune citochine pro-infiammatorie come il TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 e causa stress ossidativo, perossidazione lipidica e tossicità da acetaldeide.

Questi fattori causano infiammazione, apoptosi ed eventualmente fibrosi e cirrosi nel fegato.

Non c'è cura per l'epatopatia alcolica, ma sono stati usati composti naturali con forti effetti antiossidanti.

Cheng e Kong<sup>75</sup> (2011) hanno studiato l'effetto protettivo degli LBP nel danno epatico indotto dall'alcol nei ratti. I ratti sono stati nutriti con 7 g di etanolo per kg di peso corporeo attraverso un'infusione gastrica tre volte al giorno per 30 giorni consecutivi.

Il trattamento con etanolo ha aumentato notevolmente i livelli nel siero di alanina aminotrasferasi e AST, di trigliceridi, il colesterolo totale, le lipoproteine a bassa densità del colesterolo (LDC-C), di MDA e ha diminuito le lipoproteine ad alta densità di colesterolo (HDL-C) nel siero e i livelli epatici di SOD, CAT, GPx e GSH.

La somministrazione di 300 mg/kg di LBP per 30 giorni ha invertito significativamente questi effetti causati dall'etanolo, ha ridotto il danno epatico, ha impedito la progressione della steatosi epatica indotta dall'alcol e ha migliorato la funzione antiossidante rispetto al gruppo di controllo.

I risultati indicano che gli LBP proteggono il fegato dai danni causati dall'etanolo attraverso meccanismi antiossidanti.

## STEATOSI EPATICA NON ALCOLICA

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) è una patologia metabolica cronica del fegato che assomiglia istologicamente al danno epatico indotto dall'alcol, ma non è causato da un abuso dell'alcol. Si tratta di un insieme di malattie che vanno dalla semplice steatosi, alla steatoepatite non alcolica, fino all'avanzata fibrosi e alla cirrosi. La NAFLD è associata ad altre condizioni mediche come la sindrome metabolica, l'obesità, malattie cardiovascolari e diabete.

I meccanismi coinvolti con la patogenesi sono associati con la dieta e lo stile di vita, con l'afflusso di acidi grassi liberi al fegato dal tessuto adiposo dovuto alla resistenza all'insulina, con lo stress ossidativo epatico, con la produzione di citochine, con la riduzione della produzione di lipoproteine a bassa densità e con la flora batterica intestinale.

La terapia cardine della NAFLD consiste nella perdita di peso attraverso una dieta sana e una regolare attività fisica, ma non ci sono ancora farmaci approvati per il trattamento della NAFLD.

In uno studio condotto da Xiao e al<sup>76,77</sup> (2013), alcuni ratti sono stati nutriti con una dieta ricca di grassi (HD) per indurre la steatosi epatica non alcolica, con o senza l'assunzione orale di 1 mg/kg di LBP al giorno per 8 settimane. Sui ratti trattati con LBP sono stati osservati dei migliori livelli di acidi grassi liberi, un'istologia migliore, un riequilibrio del metabolismo lipidico, una riduzione dei fattori profibrogeni attraverso la via del fattore di crescita trasformante TGF- $\beta$ /SMAD (small mother against decapentaplegic), un miglioramento dello stress ossidativo mediante la via dipendente del citocromo P450 2E1, una riduzione della produzione delle chemiochine e dei mediatori pro-infiammatori epatici, e un miglioramento dell'apoptosi epatica attraverso le vie intrinseca e estrinseca p53-dipendenti.

Li e Al<sup>78</sup> (2014) hanno condotto uno studio sui topi per capire se gli LBP prevengono la steatosi epatica attraverso l'attivazione della proteina chinasi attivata da AMP (AMPK) e attraverso la soppressione delle proteine che legano gli elementi regolatori dello sterolo (SREB-1c).

I topi sono stati nutriti con una dieta povera di grassi, o con una dieta ricca di grassi (HD), e con 100mg/kg di LBP per 24 settimane.

I risultati mostrano che gli LBPs hanno migliorato la composizione corporea e i profili metabolici dei lipidi nei topi nutriti con una dieta ricca di grassi; inoltre hanno ridotto notevolmente l'accumulo intracellulare epatico di trigliceridi.

I profili d'espressione dei geni epatici dimostrano che gli LBPs attivano la fosforilazione dell'AMPK, sopprimono l'espressione nucleare di SREB-1c e diminuiscono l'espressione dei geni lipogenici.

## **DANNO EPATICO ACUTO INDOTTO DAL TETRACLORURO DI CARBONIO**

È stato condotto uno studio<sup>79</sup> sull'effetto protettivo degli LBPs sul danno epatico acuto indotto da tetracloruro di carbonio (CCl<sub>4</sub>).

Ai topi è stato iniettato il CCl<sub>4</sub> per indurre l'epatotossicità acuta e sono stati nutriti con LBPs 2 ore prima dell'iniezione di CCl<sub>4</sub>.

I risultati mostrano che gli LBPs hanno ridotto la necroinfiammazione e lo stress ossidativo indotto dal CCl<sub>4</sub>. Gli effetti protettivi degli LBPs nell'epatotossicità indotta da CCl<sub>4</sub> sono parzialmente dovuti alla downregulation dell'attività del NF-κB, un fattore di trascrizione. L'NF-κB ha un ruolo chiave nella regolazione della risposta immunitaria agli stimoli come lo stress, le citochine, i radicali liberi, le radiazioni ultraviolette e le infezioni.

L'NF-κB quando è nello stato non attivato si trova nel citosol complessato con la proteina inibitoria IκBα. L'NF-κB nella forma attivata viene trasportato nel nucleo dove si lega a una specifica sequenza di DNA detta elementi di risposta. Il complesso DNA/NF-κB poi recluta altre proteine come i coattivatori e la RNA polimerasi per innescare l'espressione genica.

Ahn e al<sup>80</sup> (2014) hanno eseguito uno studio per valutare se l'estratto del frutto del Lycium Chinense (LC) e la sua componente betaina può influenzare l'epatotossicità causata da CCl<sub>4</sub> nei ratti.

Il trattamento con l'estratto del frutto del Lycium Chinense ha fermato l'aumento nel siero di alanina aminotransferasi e di AST nei ratti lesi da CCl<sub>4</sub>; ha ripristinato i livelli diminuiti di enzimi antiossidanti, come la capacità antiossidante totale, il SOD, il CAT, e il GPx; e

ha soppresso l'espressione dei mediatori infiammatori inclusi NO sintasi inducibile e la ciclossigenasi.

La betaina ha mostrato effetti epatoprotettori come quelli dell'estratto dei frutti del Lycium Chinense.

Queste scoperte dimostrano che l'estratto dei frutti di LC riduce il danno epatico causato da CCl<sub>4</sub> attraverso l'aumento dell'attività antiossidante e la riduzione dei mediatori infiammatori inclusi NO sintasi inducibile e la ciclossigenasi.

## **RIEPILOGO EFFETTI EPATOPROTETTORI**

Gli LBPs presi insieme, possono ridurre notevolmente lo stress ossidativo, sopprimere le risposte infiammatorie e inibire l'apoptosi per proteggere il fegato dai danni causati da vari fattori.

I LBPs aumentano i livelli e le attività del GPx, SOD, CAT, GSH, HDL-C e AMPK, mentre riducono i livelli di LDL-C e MDA attraverso la modulazione delle vie mediate dal p53, SREBP-1c e NF-κB.

## **EFFETTI IPOGLICEMICI DEGLI LBP**

Il diabete mellito è un gruppo di complessi disordini metabolici caratterizzato da un alto livello di glucosio nel sangue e un'insufficiente capacità secretiva di insulina causati da un ridotto metabolismo glucidico o una disfunzione cellulare. Il 90-95% di tutti i casi di diabete diagnosticati negli adulti è rappresentato dal diabete di tipo 2 (chiamato diabete mellito non insulina dipendente, T2DM, o diabete dell'adulto), che è un disordine metabolico cronico caratterizzato dalla progressiva iperglicemia conseguente al declino della funzione delle cellule  $\beta$ , ed è solitamente accompagnato da una ridotta sensibilità all'insulina nei tessuti periferici come il fegato e i muscoli.

Se non trattata, l'iperglicemia a lungo termine può portare ad un aumento del rischio di complicazioni macrovascolari (cardiovascolari, cerebrovascolari, e malattie vascolari periferiche) e microvascolari (nefropatia, neuropatia, e retinopatia). Inoltre alte concentrazioni di glucosio e alti livelli di acidi grassi stimolano l'accumulo eccessivo di ROS, che possono causare lesioni ai tessuti e insulino resistenza nei tessuti periferici metabolici.

Ci sono vari agenti ipoglicemizzanti orali per il trattamento del diabete, come le biguanidi e le solfoniluree, ma questi agenti sintetici sono spesso associati con reazioni avverse.

Per esplorare e scoprire sostituti nuovi, più sicuri e più efficaci, sono stati studiati gli effetti ipoglicemizzanti degli LBP ed è stato confermato che gli LBP prevengono lo sviluppo del diabete e rallentano la sua progressione una volta che si è sviluppato.

Vari studi<sup>81,82</sup> hanno dimostrato che gli LBP esercitano effetti ipoglicemici e attività insulino-sensibilizzante attraverso l'attività antiossidante, l'aumento del metabolismo glucidico, la secrezione di insulina e mediante la promozione della proliferazione delle cellule  $\beta$  del pancreas.

## **DIABETE INDOTTO DALLA STREPTOZOTOCINA**

Zhao e al<sup>83</sup> (2005) hanno condotto uno studio animale per esaminare l'attività ipoglicemica degli LBP nei ratti con diabete sperimentale.

I ratti sono stati nutriti per 3 giorni con una dieta ricca di grassi (HD), e poi su di essi è stata eseguita un'iniezione di 50 mg/kg di streptozotocina per indurre il diabete.



Sono stati monitorati i livelli a digiuno di glucosio, lipidi, e insulina, ed è stato determinato il contenuto del trasportatore del glucosio di tipo 4 (GLUT4) nel muscolo gastrocnemio (polpaccio).

In condizioni anaerobiche, il GLUT4 è il vettore principale che trasporta il glucosio dal sangue al muscolo e alle cellule adipose, mentre in condizioni normali (non stimolato) è sequestrato in vescicole intracellulari. Questa conservazione impedisce al GLUT4 di raggiungere la superficie cellulare e trasportare glucosio nei muscoli e nelle cellule adipose quando i livelli di glucosio nel sangue sono bassi.

Dopo un pasto, quando i livelli di glucosio nel sangue aumentano, l'insulina viene secreta dal pancreas, ciò innesca una cascata di segnali intracellulari che portano alla traslocazione del GLUT4 dai compartimenti intracellulari alla superficie cellulare, che determina l'assorbimento del glucosio e la normalizzazione dei livelli di glucosio nel sangue.

Il trattamento orale di 10 mg/kg/al giorno di LBP per 3 settimane ha provocato una significativa riduzione della concentrazione di trigliceridi nel plasma e una riduzione del peso dei ratti diabetici.

Gli LBP hanno diminuito notevolmente i livelli di colesterolo nel plasma, i livelli di insulina a digiuno nel plasma, e hanno diminuito il livello di glucosio postprandiale a 30 minuti durante il test orale di tolleranza al glucosio, inoltre ha aumentato significativamente l'indice di sensibilità all'insulina nei ratti diabetici.

In più, gli LBP hanno aumentato il livello di GLUT4 nel muscolo scheletrico sotto stimolazione di insulina.

Gli LBP attenuano il metabolismo scorretto del glucosio e dei lipidi e migliorano l'insulino resistenza, con un meccanismo che probabilmente coinvolge l'upregulation del GLUT4 e il miglioramento del traffico del GLUT4 e della segnalazione intracellulare dell'insulina.

L'effetto del trattamento orale degli LBP sul glucosio nel sangue, sullo stress ossidativo e sul danno al DNA è stato analizzato da Wu e al<sup>84</sup> (2006) su dei ratti con il diabete sperimentale.

I ratti sono stati nutriti con una dieta ricca di grassi per 3 settimane e poi gli è stato provocato il diabete attraverso un'iniezione di 50mg/kg di streptozotocina.

La somministrazione orale di 10 mg/kg/al giorno di LBP per 4 settimane ha provocato la riduzione dei livelli del glucosio nel sangue. Anche i livelli a digiuno di MDA e NO nel

siero sono diminuiti nei ratti diabetici, mentre sono aumentati i livelli nel siero di SOD. Gli LBP hanno ridotto il danno del DNA cellulare nei linfociti periferici dei ratti diabetici, come determinato dall' elettroforesi su singola cellula.

Questi risultati indicano che gli LBP migliorano il metabolismo del glucosio attraverso l'inibizione dello stress ossidativo nel diabete.

Li<sup>85</sup> (2007) ha riportato che il trattamento con 50-200 mg/kg di LBP per 30 giorni nei ratti con diabete indotto da streptozotocina, ha ridotto notevolmente il livello di glucosio nel sangue e ha aumentato il livello di insulina nel sangue.

Gli effetti ipoglicemici degli LBP sono fortemente correlati con i loro effetti antiossidanti.

# **EFFETTI NEUROPROTETTORI E EFFETTI SUI DEFICIT COGNITIVI E DELLA MEMORIA, MORBO DI ALZHEIMER (AD) E ICTUS.**

Con il drastico aumento della popolazione anziana negli ultimi decenni, c'è stato un grande aumento della prevalenza di malattie neurodegenerative legate all'età, come i disturbi cognitivi e della memoria, la malattia di alzheimer (AD), e il morbo di Parkinson. Vi è un crescente interesse nel cercare nuovi agenti terapeutici per queste malattie devastanti derivanti da erbe medicinali.

Gli LBP possiedono effetti neuroprotettivi in vari modelli in vitro e in vivo<sup>86,87</sup>, ma i meccanismi non sono ancora stati completamente chiariti.

È stato osservato che nel sistema nervoso, gli LBP proteggono dalle lesioni neuronali o dalla perdita indotta da I / R<sup>88,89</sup>, dal peptide A $\beta$ <sup>90,91</sup>, dall'eccitotossicità da glutammato, e da altri insulti neurotossici<sup>87</sup>; inoltre gli LBP migliorano la neurogenesi<sup>92</sup>.

## **CERVELLO ISCHEMICO E OCCLUSIONE DELL' ARTERIA CEREBRALE MEDIA (MCAO)**

L'ictus ischemico è una delle malattie più devastanti, che causa alti tassi di disabilità e mortalità nelle persone anziane. L'eccitotossicità acuta, lo stress ossidativo e l'infiammazione, sono i tre principali meccanismi coinvolti nella morte cellulare durante l'ictus ischemico. L'edema cerebrale è una caratteristica dannosa dopo l'ictus ischemico ed è uno dei fattori di impatto del peggioramento clinico entro le prime 24 ore dopo l'insorgenza dell'ictus. L'ischemia cerebrale e la ri-perfusione innescano una cascata di eventi cellulari, tra cui la morte cellulare, lo stress ossidativo e l'infiammazione, che contribuiscono alla degradazione della barriera emato-encefalica (BBB).

L'apoptosi delle cellule neuronali svolge un ruolo importante nello sviluppo del danno ischemico nel tessuto cerebrale. La via mitocondriale dell'apoptosi è una delle vie

principali, e un gran numero di proteine correlate all'apoptosi nei mitocondri svolgono un ruolo importante nell'avvio e nello sviluppo dell'apoptosi neuronale.

La famiglia di proteine Bcl-2 pro-apoptotiche e anti-apoptotiche svolgono un ruolo importante nella via mitocondriale apoptotica. La Bax è una proteina pro-apoptotica mentre la Bcl-2 è una proteina anti-apoptotica della famiglia Bcl-2. Il Citocromo C si lega ed attiva il fattore 1 attivante la proteasi apoptotica, cioè la procaspasi-9, formando un apoptosoma insieme con l'ATP. L'apoptosoma quindi attiva la caspasi-9, che porta all'attivazione della caspasi-3 e infine all'apoptosi cellulare. La Caspasi-3 è stata riconosciuta come un mediatore chiave dell'apoptosi e scinde il substrato PARP-1, che è un enzima nucleare multifunzionale la cui attività è rapidamente stimolata da rotture del DNA.

L'effetto protettivo degli LBPs è stato studiato, da Rui et al<sup>93</sup> (2012), in colture primarie di neuroni dell'ippocampo di ratto sottoposti a deprivazione/riperfusioni di ossigeno e glucosio.

Le colture di neuroni dell'ippocampo sono state esposte a deprivazione di ossigeno e glucosio per 2 ore seguita da una riossigenazione di 24 ore.

Il trattamento con LBPs (10-40 mg / L) ha attenuato in modo significativo il danno neuronale e ha inibito il rilascio di LDH in modo dose-dipendente.

Yang et al<sup>88</sup> hanno studiato l'effetto protettivo del pretrattamento con LBP in un modello di ictus sperimentale (MCAO) sui topi.

Ai topi sono stati somministrati 1 mg / kg o 10 mg / kg di LBPs al giorno per 7 giorni, e poi sono stati sottoposti a 2 ore di occlusione dell'arteria cerebrale media (MCAO) transitoria seguito da 22 ore di riperfusioni.

Il pretrattamento con LBP ha migliorato in modo dose-dipendente i deficit neurologici; ha ridotto la dimensione dell'infarto, i neuroni apoptotici nella zona di penombra ischemica, e l'edema cerebrale; inoltre ha protetto il cervello dalla rottura della BBB, come indicato dall'upregulation dell'espressione dell'occludina. L'occludina, una delle proteine situate nelle giunzioni strette, svolge un ruolo importante nel mantenimento dell'integrità della BBB.

Il pre-trattamento con 10 mg / kg di LBPs per 7 giorni ha anche soppresso profondamente l'upregulation dell'espressione dell'AQP4 e l'attivazione del GFAP nelle aree di penombra omolaterale; il trattamento con LBPs ha ridotto inoltre sia lo stress nitrosativo che la perossidazione lipidica nella penombra ischemica cerebrale dopo la MCAO.

Gli LBPs, a entrambe le dosi, hanno attenuato l'espressione di metalloproteinasi della matrice-9 (MMP-9) nelle aree di penombra omolaterale.

Questi risultati dimostrano chiaramente gli effetti benefici degli LBPs di prevenzione del danno ischemico e dell' edema cerebrale in un modello murino di ictus sperimentale.

Gli effetti neuroprotettivi degli LBPs sull' ictus ischemico comprendono la riduzione del danno neuronale e dell'infarto, il mantenimento dell' integrità della BBB, e la riduzione dell'edema cerebrale attraverso l'attività antiossidante, la soppressione dell'upregulation di MMP-9 e AQP4, attraverso l'anti-apoptosi e l'inibizione dell'attivazione gliale.

In uno studio, Wang et al<sup>94</sup> (2013) hanno esaminato l'effetto della somministrazione degli LBPs su lesioni cerebrali nei topi con MCAO.

Lo studio ha dimostrato che gli LBPs a dosi di 20 mg / kg e 40 mg / kg hanno diminuito significativamente i punteggi del deficit neurologico (che quantificano la gravità del deficit neurologico provocato da un'ictus) e la zona infartuata in topi con MCAO.

Gli LBPs hanno diminuito significativamente il contenuto di MDA e hanno aumentato le attività di SOD, GPx, CAT, e LDH nel cervello ischemico.

Questi risultati suggeriscono che gli LBPs potrebbero agire come potenziale agente neuroprotettivo verso la lesione cerebrale indotta dalla riperfusione, attraverso la riduzione dei perossidi lipidici, dell'eliminazione dei radicali liberi, e il miglioramento del metabolismo energetico.

In uno studio simile, Wang et al<sup>89</sup> (2014) hanno studiato l'effetto protettivo della somministrazione di 10, 20, e 40 mg / kg di peso corporeo di LBPs o 0,4 mg / kg di nimodipina per 7 giorni, su lesioni cerebrali indotte da MCAO nei topi.

I risultati hanno mostrato che la somministrazione di 20 e 40 mg / kg di LBPs ha diminuito notevolmente i punteggi del deficit neurologico e il volume dell'infarto nei topi con MCAO. La somministrazione di 10 e 40 mg / kg di LBPs ha anche ridotto il danno morfologico neuronale e l'apoptosi neuronale nella penombra ischemica della corteccia sinistra.

La dose di 40 mg / kg LBPs ha inoltre soppresso la sovraespressione nella corteccia di Bax, citocromo C, caspasi-3 e caspasi -9, la scissione di PARP-1, e ha ridotto la downregulation di Bcl-2 nei topi con MCAO.

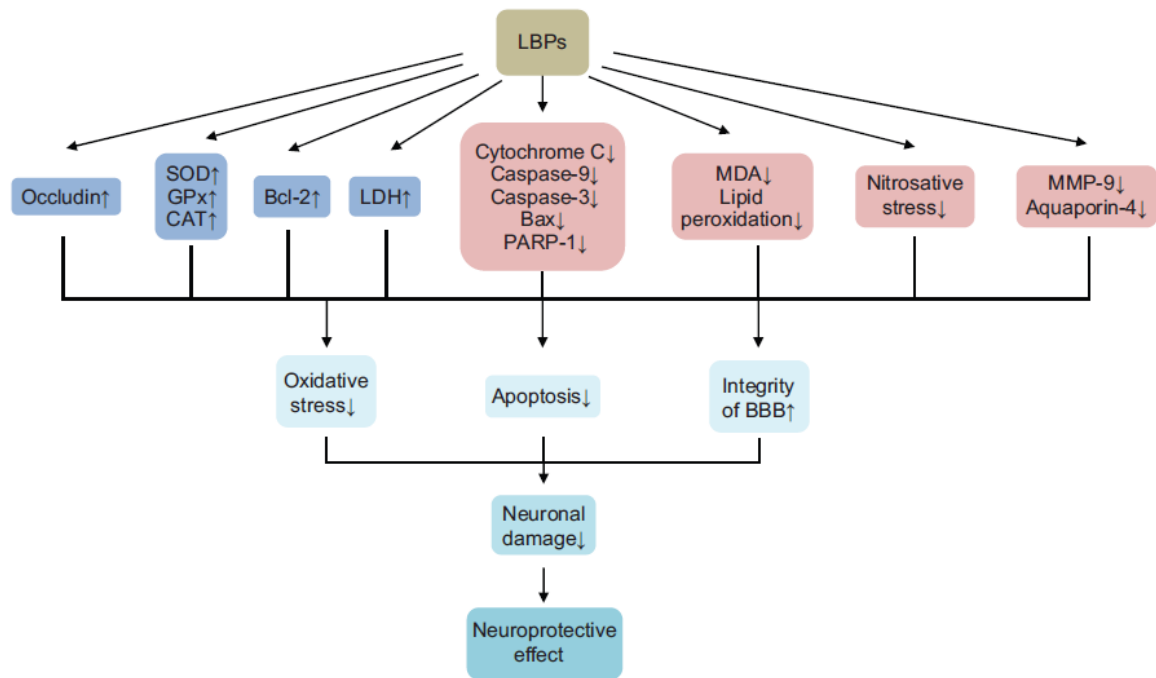


Fig: Possibili meccanismi degli effetti neuroprotettivi degli LBPs contro la lesione neuronale indotta da MCAO. Cheng et Al<sup>b</sup>, 2015.

In sintesi, gli effetti protettivi degli LBPs sulle lesioni cerebrali indotti da MCAO sono principalmente attribuibili alla riduzione dello stress ossidativo, all'inibizione dell'apoptosi, e all'aumento dell'integrità della BBB.

Il trattamento con LBPs riduce lo stress ossidativo attraverso l'aumento dell'attività di SOD, GPx, CAT e LDH, e la riduzione del contenuto di MDA e di perossidazione lipidica. Gli LBPs inibiscono anche l'apoptosi attraverso la diminuzione dell'espressione del citocromo C e della Bax, la scissione delle caspasi-9 e caspasi-3 e del PARP-1, ma aumentando il livello di espressione di Bcl-2.

Inoltre, gli LBPs aumentano l'integrità della BBB attraverso l'upregulation dell'espressione dell'occludina e la downregulation dell'espressione di MMP-9 e AQP4.

## **LESIONE NEURONALE INDOTTA DAL PEPTIDE A $\beta$ E MALATTIA DI ALZHEIMER**

È ritenuto che i peptidi A $\beta$  siano associati con la morte neuronale progressiva osservata nella malattia di Alzheimer (AD).

Yu et al<sup>90</sup> (2005) hanno studiato l'effetto degli LBP sulla morte neuronale indotta dai peptidi A $\beta$ 1-42 e A $\beta$ 25-35 nei neuroni corticali primari dei topi.

Dopo l'esposizione ai peptidi A $\beta$ , nei neuroni corticali primari dei ratti è stata osservata una marcata apoptosi e necrosi.

Il pre-trattamento con LBP ha ridotto significativamente il rilascio di LDH. Inoltre, gli LBP hanno attenuato l'attività della caspasi-3 attivata dai peptidi A $\beta$ . I peptidi A $\beta$  inducono una rapida attivazione di c-JNK attraverso la fosforilazione.

Il pre-trattamento con LBP ha ridotto notevolmente la fosforilazione di JNK-1 e dei suoi substrati c-Jun-I e c-Jun-II.

Quindi gli LBP esercitano effetti neuroprotettivi in modo dose-dipendente attraverso la regolazione della via di JNK-1.

Yu et al<sup>90</sup> (2007) hanno anche studiato gli effetti degli LBP sulla fosforilazione della proteina chinasi dipendente dal RNA a doppio filamento (PKR) nei neuroni corticali di ratto esposti ai peptidi A $\beta$ . Il PKR è un sensore intracellulare di stress e può arrestare la sintesi proteica fosforilando la subunità alfa del fattore di inizio della traduzione eIF2.

Il pretrattamento con LBP ha protetto efficacemente i neuroni dall'apoptosi indotta dai peptidi A $\beta$  riducendo l'attività di entrambe le caspasi-3 e -2, ma non le caspasi-8 e -9. Inoltre gli LBP hanno ridotto notevolmente la fosforilazione del PKR indotta dai peptidi A $\beta$ .

## **LESIONE CEREBRALE INDOTTA DALLA SCOPOLAMINA**

Un recente studio di Chen et al<sup>87</sup> (2014) ha riportato gli effetti terapeutici degli LBPs sull'apprendimento, sulla memoria e sulla neurogenesi nei ratti trattati con scopolamina (SCO). La scopolamina è usata per indurre deficit di apprendimento e di memoria.

Sono stati somministrati 0,2 mg / kg o 1 mg / kg di peso corporeo al giorno di LBPs per 14 giorni prima dell'inizio e durante il trattamento con scopolamina di 4 settimane.

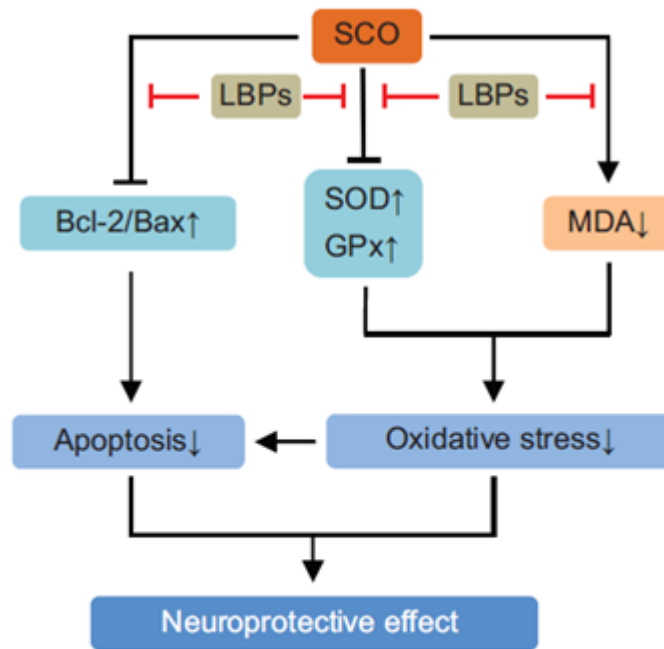
Gli LBPs a entrambe le dosi hanno quasi ripristinato la memoria e la capacità di apprendimento nei ratti trattati con SCO; inoltre hanno impedito la riduzione della proliferazione neuronale indotta dalla SCO e hanno aumentato la differenziazione dei neuroblasti nel giro dentato dell'ippocampo dei ratti.

Il trattamento con LBP protegge anche i dendriti dai danni dalla SCO<sup>87</sup>. Gli LBPs diminuiscono in modo dose-dipendente lo stress ossidativo indotto dalla SCO nell'ippocampo e invertono l'aumentato rapporto di Bax / Bcl-2 indotto dalla SCO. Inoltre gli LBPs aumentano significativamente la SOD e l'attività del GPx nell'ippocampo e riducono il livello di MDA nei ratti trattati con SCO. Tuttavia, gli LBPs non influenzano l'innalzamento dell'attività dell'acetilcolinesterasi e la diminuzione del livello del fattore neurotrofico cerebrale nell'ippocampo causato dalla SCO. (Il fattore neurotrofico cerebrale BDNF è una neurotrofina che agisce su determinati neuroni del sistema nervoso centrale e periferico, contribuendo a sostenere la sopravvivenza dei neuroni già esistenti, e favorendo la crescita e la differenziazione di nuovi neuroni e sinapsi. Si trova nell'ippocampo e in tutte le aree deputate all'apprendimento, alla memoria, e al pensiero).

Questi risultati suggeriscono che gli LBPs prevengono i danni cognitivi e della memoria e la riduzione della proliferazione cellulare e della differenziazione neuroblastica nell'ippocampo indotte dalla SCO.

L'azione anti-ossidante e anti-apoptotica sono i due principali meccanismi degli effetti neuroprotettivi degli LBPs nei ratti trattati con scopolamina.





**Fig** Possible mechanisms for the neuroprotective effects of LBPs against SCO-induced neurotoxicity.

**Notes:** LBPs protect neurons against SCO-induced neurotoxicity through the reduction of the oxidative stress and apoptosis. LBPs increase the activities of SOD and GPx, restore the balance of Bcl-2 to Bax, but decrease the content of MDA.

**Abbreviations:** LBPs, *Lycium barbarum* polysaccharides; SCO, scopolamine; SOD, superoxide dismutase; GPx, glutathione peroxidase; MDA, malondialdehyde. Cheng et Al<sup>b</sup>, 2015.

## LESIONE NEURONALE INDOTTA DAL GLUTAMMATO

L'eccitotossicità causata dal glutammato è coinvolta in molte malattie neurodegenerative, tra cui l'Alzheimer. Infatti, l'attenuazione della tossicità del glutammato è una delle strategie terapeutiche per l'Alzheimer.

Gli LBPs sono stati somministrati nelle culture di neuroni primari<sup>95</sup> per rilevare se possono prevenire la neurotossicità indotta da glutammato.

La morte cellulare indotta da glutammato è stata significativamente ridotta dagli LBPs a concentrazioni comprese tra 10 µg / mL a 500 µg / mL.

Gli LBPs hanno fornito neuroprotezione anche 1 ora dopo l'esposizione al glutammato.

Oltre al glutammato, gli LBPs hanno attenuato anche il danno neuronale indotto dall' N-metil-D-aspartato, ed hanno ridotto la fosforilazione di JNK indotta dal glutammato.

Si può concludere quindi che gli LBPs esercitano notevoli effetti neuroprotettivi sui neuroni corticali esposti al glutammato.

## **LESIONE NEURONALE INDOTTA DAL MANGANESE**

Il manganese può indurre lesioni in molti organi, soprattutto nel cervello e ciò porta a gravi deficit cognitivi e di memoria.

Uno studio<sup>96</sup> ha analizzato l'effetto terapeutico degli LBPs sulla neurogenesi, sull'apprendimento e sulla memoria di topi avvelenati dal manganese.

La capacità di apprendimento spaziale e la memoria dei topi è stata determinata con il test “Morris water maze” o labirinto acquatico di Morris, in cui il ratto viene posto in labirinto dentro una piscina e deve trovare una piattaforma invisibile che consente di fuoriuscire dall'acqua. Le cellule neurogeniche sono state marcate con bromodeossiuridina (BrdU) e sono state rilevate mediante immunohistochimica.

Il tempo medio di fuga era minore e le cellule BrdU-positive nel gruppo trattato con LBPs erano significativamente maggiori rispetto a quelle del gruppo di controllo.

Perciò gli LBPs potrebbero migliorare la capacità di apprendimento e la memoria dei topi avvelenati con il manganese promuovendo la neurogenesi nell'ippocampo.

## **LESIONE NEURONALE INDOTTA DALL'OMOCISTEINA**

Studi clinici<sup>97</sup> ed epidemiologici precedenti hanno suggerito che elevati livelli di omocisteina nel plasma aumentano il rischio di Alzheimer (AD). L' omocisteina danneggia i neuroni inducendo l'apoptosi, la frammentazione del DNA, e la fosforilazione di Tau (una proteina che contribuisce all'organizzazione spaziale dei microtubuli, ma se iperfosforilata provoca<sup>98</sup> la degenerazione del citoscheletro neuronale e quindi gravi malattie neurodegenerative come l'AD).

Ho et Al<sup>99</sup> (2010) hanno condotto degli studi in vitro e in vivo per analizzare gli effetti benefici degli LBPs sulla neurotossicità causata dall' omocisteina.

Il trattamento con LBPs ha attenuato in modo significativo la morte delle cellule neuronali indotta da omocisteina e l' apoptosi nei neuroni corticali primari di ratto.

Gli LBPs hanno anche ridotto significativamente la fosforilazione di Tau-1, indotta dall' omocisteina, attraverso la soppressione della fosforilazione di (Erk1 / 2) e JNK.

I dati hanno dimostrato che gli LBPs esercitano effetti neuroprotettivi sui neuroni corticali esposti all' omocisteina mediante la modulazione delle vie di JNK e ERK1 / 2.

## NEUROMA TRAUMATICO

I Neuromi traumatici sono tumori prodotti da un processo reattivo per rigenerare i nervi danneggiati che si traducono in una proliferazione disordinata di fasci nervosi. Questi tumori sono generalmente legati a precedenti interventi chirurgici o a un trauma.

Fan et al<sup>100</sup> (2010) hanno studiato gli effetti degli LBP sulla formazione del neuroma traumatico e sul dolore dopo la resezione del nervo sciatico nei ratti.

Lo studio ha mostrato che c'era meno neuroma formato nel gruppo trattato con LBP rispetto al gruppo di controllo. I dati di microscopia elettronica a trasmissione hanno mostrato che c'erano numerosi assoni nel tumore del nervo, più fibroblasti a fuso, più fibre di collagene, e iperplasia e guaina mielinica degenerata nel gruppo di controllo; mentre nel gruppo trattato con LBP, c'era meno guaina mielinica nella fine prossimale dei nervi lesionati, meno cellule di Schwann e fibroblasti e fibre di collagene.

Gli LBP possono quindi inibire l'autofagia e la formazione del neuroma traumatico dopo la resezione del nervo sciatico nei ratti.

# **EFFETTI PROTETTIVI VERSO LE TOSSICITÀ D'ORGANO INDOTTE DALLE RADIAZIONI O DALLA CHEMIOTERAPIA**

Sia le radiazioni che la chemioterapia possono indurre gravi tossicità d'organo.

Gli LBP potrebbero servire come un supplemento molto utile per le terapie del cancro, come la chemioterapia e la radioterapia.

Hai-Yang et al<sup>101</sup> (2004) hanno studiato gli effetti terapeutici degli LBP sulla mielosoppressione indotta dalla mitomicina C nei topi.

Ai topi sono stati iniettati 150 mg / kg di mitomicina C per 2 giorni consecutivi allo scopo di produrre una grave mielosoppressione, e in seguito sono stati trattati con iniezione di 100 o 200 mg / kg / al giorno di LBP per 6 giorni.

I campioni di sangue sono stati raccolti dalle vene della coda dei topi nei giorni 7, 10, 12, 14, 17, 19, 21, 24, e 27, e sono stati monitorati i globuli bianchi periferici, globuli rossi, emoglobina, e la conta piastrinica.

La somministrazione di 100 mg / kg di LBP (LBP-L) al giorno 14 e 200 mg / kg di LBP (LBP-H) nei giorni 10, 14, 17, 19, e 21 hanno aumentato in modo significativo i globuli rossi periferici, emoglobina, e l'ematocrito dei topi mielosoppressi rispetto al gruppo di controllo.

LBP-L nei giorni 12 e 14 e LBP-H nei giorni 10, 12, 14, 17, 19, e 21 hanno inoltre promosso il recupero delle piastrine periferiche.

LBP-H nei giorni 12, 17, 19, e 21 ha anche inibito l'aumento del volume piastrinico medio dei topi mielosoppressi.

Questi risultati indicano che gli LBP migliorano il recupero delle piastrine nei topi mielosoppressi rispetto al gruppo di controllo, ma non incidono in maniera significativa sul recupero dei globuli bianchi.

Gong et al<sup>102</sup> (2005) hanno esaminato gli effetti degli LBP sulla depressione midollare indotta dalle radiazioni o dalla chemioterapia nei topi e in una coltura di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs).

Nell'esperimento in vivo, i topi sono stati irradiati con raggi X o iniettati con carboplatino per produrre una grave mielosoppressione.

Gli LBPs hanno aumentato i globuli bianchi, i globuli rossi, e la conta piastrinica sia nei topi trattati con radiazioni che con carboplatino.

Questo studio dimostra che gli LBPs promuovono il recupero del midollo osseo e delle cellule mononucleate del sangue periferico dalla mielosoppressione indotta dalle radiazioni o dalla chemioterapia nei topi, e gli effetti sono dovuti probabilmente al rilascio di GM-CSF (fattore di crescita dei granulociti e dei macrofagi) dalle PBMCs.

# **EFFETTI PROTETTIVI SUL SISTEMA RIPRODUTTORE**

L'erborista cinese Li Shizhen ha attribuito alle bacche di Goji un effetto pro-sessuale e, quindi, sono state inserite tra i rimedi naturali cinesi come agenti potenzianti le funzioni sessuali.

Il consumo quotidiano di succo di Goji nei soggetti sani migliora la sensazione di benessere verso la sessualità, tra cui l' aumento dell'attività e della capacità sessuale.

Studi<sup>33</sup> animali hanno dimostrato che gli LBP esercitano effetti benefici sulla prestazione sessuale e sulla fertilità, anche se i meccanismi alla base rimangono in gran parte sconosciuti.

## **DANNO ALLA SPERMATOGENESI INDOTTO DAL BISFENOLO A**

Gli LBP hanno mostrato<sup>103</sup> effetti protettivi verso i danni alla spermatogenesi indotti dal bisfenolo A nei topi.

Gli LBP sono stati somministrati insieme a 20 mg / kg di peso corporeo di bisfenolo A per 7 giorni ai topi.

I risultati hanno mostrato che i pesi dei testicoli e dell'epididimo sono aumentati dopo l' integrazione con diversi dosaggi di LBP, rispetto al gruppo di controllo, e le attività di SOD e GPx sono aumentate, mentre i contenuti di MDA sono gradualmente diminuiti.

Gli LBP hanno mostrato anche effetti positivi sull' espressione di Bcl-2 / Bax nei topi trattati con bisfenolo A.

Gli autori hanno concluso che gli LBP potrebbero essere uno dei potenziali agenti che proteggono gli animali adulti maschi dai danni riproduttivi indotti dal bisfenolo A.

## **INIBIZIONE DEL COMPORTAMENTO SESSUALE INDOTTO DAL CORTICOSTERONE**

In un recente studio<sup>92</sup> sono stati studiati gli effetti degli LBP sulla comportamento sessuale maschile dei ratti adulti.

La somministrazione orale di 1 mg / kg o 10 mg / kg di LBP per 21 giorni ha migliorato notevolmente le prestazioni copulatorie maschili tra cui l' aumento dell'efficienza copulatoria, l' aumento della frequenza di eiaculazione, e un accorciamento della latenza dell'eiaculazione. Inoltre, l' inibizione sessuale causata dall' assunzione cronica di corticosterone è stata prevenuta con la somministrazione di 40 mg / kg di LBP per 21 giorni. Infine, gli LBP hanno contrastato la soppressione della neurogenesi nella zona subventricolare e nell'ippocampo dei ratti adulti indotta dal trattamento con corticosterone. L'effetto neurogeno degli LBP è stato dimostrato anche in vitro utilizzando le cellule staminali neurali di ratti. Infatti, il trattamento con corticosterone ha soppresso la proliferazione delle cellule, mentre la co-incubazione con 10 µg / ml di LBP ha invertito la soppressione della crescita.

Il blocco della neurogenesi nei ratti maschi ha abolito l'effetto pro-sessuale degli LBP.

Questi risultati dimostrano l'effetto pro-sessuale degli LBP sui ratti normali e sui ratti sessualmente inibiti, inoltre gli LBP possono modulare il comportamento sessuale regolando la neurogenesi.

## **DANNO CELLULARE AI TESTICOLI INDOTTO DAL CALORE O DA H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Luo et al<sup>104</sup> (2006) hanno studiato l'effetto degli LBP sul danno ai testicoli di ratto indotto da un fattore fisico (esposizione al calore di 43°C), sul danno al DNA delle cellule testicolari di topo indotto da un fattore chimico (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e sul comportamento sessuale e la funzione riproduttiva di ratti maschi emicestrati.

I risultati hanno mostrato che gli LBP hanno fornito un effetto protettivo contro il danno tissutale testicolare indotto dall' esposizione al calore.

Una concentrazione idonea di LBPs ha aumentato significativamente i pesi del testicolo e dell'epididimo, ha migliorato l'attività del SOD, e ha aumentato i livelli dell'ormone sessuale nei testicoli danneggiati dei ratti.

Gli LBPs hanno mostrato un effetto protettivo dose-dipendente contro il danno ossidativo del DNA di cellule testicolari di topo indotto da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Gli LBPs hanno anche migliorato le prestazioni copulatorie e la funzione riproduttiva dei ratti maschi emicastrati, hanno regolato la secrezione di ormoni sessuali, hanno aumentato i livelli di ormone, e hanno migliorato la quantità e la qualità dello sperma.

Gli LBPs potrebbero fornire qualche effetto protettivo verso l'apoptosi indotta dallo stress da calore (HS), delle cellule germinali nei topi.

Novanta ratti maschi sono stati divisi<sup>105</sup> casualmente in cinque gruppi di 18 ciascuno: controllo, HS, alte dosi di LBPs, dose media di LBPs e basse dosi di LBPs.

Rispetto al gruppo HS, i tre gruppi con LBP hanno mostrato diminuzioni statisticamente significative nell'indice di apoptosi, nel livello di espressione della caspasi-3 nelle cellule germinali, e nella concentrazione del citocromo C nel citosol.

Gli LBPs proteggono quindi le cellule germinali dall'apoptosi attraverso la modulazione della via mitocondriale.

## **DANNI ALLA SPERMATOGENESI INDOTTI DALLE RADIAZIONI**

Zhang et Al<sup>106</sup> (2010) hanno studiato gli effetti protettivi degli LBPs sui disturbi della spermatogenesi indotta dal Co- $\gamma$  nei topi e hanno scoperto che gli LBPs hanno prodotto un recupero quasi completo dal disordine endocrino riproduttivo e dal danno alla spermatogenesi.

Luo et al<sup>107</sup> (2011) hanno confermato gli effetti protettivi degli LBPs sul danno alla spermatogenesi indotta dalle radiazioni nei ratti maschi esposti a irradiazione Co- $\gamma$  subcronica locale.

In questo studio sono stati determinati gli effetti degli LBPs sulla quantità e sulla motilità dello sperma, sulla capacità sessuale, sui livelli ormonali nel siero, sullo stato ossidativo, e sul danno al DNA nel tessuto testicolare nei giorni 1, 7, e 14, dopo la dose.



I risultati hanno mostrato che gli LBP hanno aumentato significativamente la quantità e la motilità degli spermatozoi, hanno accorciato le latenze di erezione e di eiaculazione, hanno aumentato il numero di eiaculazioni e hanno migliorato la capacità sessuale nei ratti maschi.

Gli LBP inoltre hanno avuto un ruolo significativo nel recupero dei livelli sierici di testosterone, hanno aumentato l'attività della superossido dismutasi, hanno diminuito i livelli di MDA, hanno promosso il bilancio ossidativo, e hanno riparato il danno al DNA dei testicoli.

Gli LBP hanno notevoli effetti protettivi contro i danni indotti dall'esposizione subcronica locale dell'irraggiamento Co- $\gamma$ .

## **EFFETTO PROTETTIVO DEL TESSUTO OVARICO**

Wei et al<sup>108</sup> (2011) hanno studiato il meccanismo di protezione degli LBP sulla funzione del tessuto ovarico nei ratti femmine senili di 14 mesi di età.

Dosi quotidiane orali di LBP (20, 40, o 60 mg / kg di peso corporeo) per 30 giorni hanno portato al recupero dell'atrofia uterina ed hanno ripristinato il livello nel siero di IGF-1, i livelli di estrone e progesterone che sono diminuiti nei ratti anziani, e hanno ridotto l'espressione della proteina-legante IGF-1 (IGFBP-1) nel tessuto ovarico, che elevata nei ratti anziani.

## **RIEPILOGO DEGLI EFFETTI PROTETTIVI DEGLI LBP SUL SISTEMA RIPRODUTTORE**

L'effetto protettivo degli LBP sul sistema riproduttivo è, almeno in parte, attribuito all'azione antiossidante, alla promozione della proliferazione cellulare, e all'azione anti-apoptotica. E' stato dimostrato che gli LBP proteggono i topi dai danni al sistema riproduttivo indotti dal bisfenolo A, aumentando l'attività di SOD e GPx, e che gli LBP aumentano il peso degli organi sessuali nei ratti. Inoltre, gli LBP diminuiscono il rapporto di Bcl-2 / Bax, il livello di espressione della caspasi-3, e la concentrazione di citocromo C nel citosol, infine aumentano la proliferazione cellulare in vitro.

# TOSSICITÀ

L. Barbarum è stato usato da più di 2500 anni nella tradizione popolare come alimento e medicina naturale senza alcun segno di tossicità. Nella letteratura scientifica <sup>109,110,111</sup> e nei libri <sup>112,113,114</sup> di erbe medicinali tradizionali cinesi non sono menzionate tossicità, ma solo effetti benefici. Una pubblicazione <sup>115</sup> sul L. Barbarum, sulla base di studi tossicologici, conclude che i frutti di questa pianta non sono tossici.

Vari studi clinici <sup>116,117</sup> sull'uomo hanno confermato la sicurezza del succo delle bacche di Goji, equivalente a circa 150 g di bacche fresche. Non sono state osservate reazioni avverse o cambiamenti dei parametri controllati.

Un recente studio <sup>118</sup> tossicologico sui ratti, ha dimostrato che la somministrazione orale del succo dei frutti del L.Barbarum (GoChi) non provoca alcuna tossicità; inoltre non è stata trovata la DL50 (dose letale; cioè la dose della sostanza che causa la morte nel 50% dei soggetti esaminati). Quindi si può concludere che il GoChi è sicuro per via orale.

Studi di tossicità <sup>119</sup> hanno dimostrato che l'iniezione di 2,4 g / kg di estratto dei frutti del Lycium Barbarum non ha causato reazioni avverse nei topi; la DL50 dell' iniezione nei topi è stimata essere di circa 8,3 g / kg, una grande quantità .

È stato riportato <sup>120</sup> comunque un caso di epatotossicità in una paziente , che aveva assunto un thè a base di bacche di Goji tre volte al giorno per dieci giorni. I valori dei test di funzionalità epatica sono tornati a livelli normali dopo un mese dell'interruzione dell'assunzione di quel thè.

## INTERAZIONI CON ALTRI FARMACI

Recentemente, in Cina, sono stati segnalati due casi <sup>121,122</sup> di una possibile interazione del Lycium Barbarum con il Warfarin; l'assunzione prolungata di un thè a base di bacche di Goji, ha provocato a due persone in trattamento con il warfarin, un aumento del valore di INR (rapporto internazionale normalizzato; valore che esprime il tempo di protrombina come rapporto, cioè il tempo necessario alla formazione del coagulo).

Tuttavia, considerando l'elevato utilizzo dei frutti del L. barbarum e del warfarin, e il ridotto numero di segnalazioni di interazione, il rischio di interazioni farmacologiche associate al Goji non può essere definitivamente valutato. È comunque consigliata cautela, in particolare per i pazienti in trattamento con farmaci con un ristretto indice terapeutico.

## ALLERGIE

Sono stati riportati inoltre alcuni casi di reazioni allergiche in seguito all'ingestione delle bacche di Goji.

Uno studio clinico<sup>123</sup> ha determinato che i frutti del *Lycium Barbarum* hanno un potere allergenico, infatti sono state rilevate in vitro delle IgE specifiche, nei pazienti positivi allo skin prick test. Inoltre, è stata valutata, attraverso gli skin prick test, la cross-reattività (cioè le reazioni allergiche crociate scatenate dalla sensibilizzazione ad una sostanza e l'ingestione di un cibo) tra le bacche di Goji e altri panallergeni di piante alimentari (proteine di difesa espresse dalla pianta contro infezioni parassitarie; sono allergeni stabili come le LTP). In questi test, la positività alle bacche di Goji è stata associata alla positività alla pesca e al panallergene delle proteine non specifiche del trasporto lipidico (LTP).

Le LTP sono molecole localizzate al di sotto della buccia di alcuni frutti che svolgono funzioni di difesa contro alcuni patogeni delle piante; sono allergeni stabili in grado di sensibilizzare il soggetto per via orale e indurre gravi reazioni sistemiche.

I risultati dei test indicano che la reazione allergica alle bacche di Goji è dovuta alla sensibilizzazione alle LTP e alla cross-reattività delle LTP con altri cibi, per esempio la pesca. Quindi i soggetti con allergie alimentari, in particolare con allergie alle LTP, dovrebbero consumare le bacche di Goji con cautela, in quanto hanno un rischio maggiore di sviluppare reazioni allergiche.

# CONCLUSIONI

I frutti del *Lycium Barbarum*, chiamati anche bacche di Goji, sono usati da più di 2000 anni in Cina e in altre regioni dell'Asia, sia come integratore alimentare che nella medicina tradizionale popolare.

Tra i vari componenti, un gruppo di polisaccaridi (LBP), hanno mostrato molteplici attività farmacologiche, tra cui effetti anti-invecchiamento, antiossidanti, anti-fatica, antitumorali, anti-diabetici, anti-virali, epatoprotettivi, cardioprotettivi, neuroprotettivi, ipolipemizzanti, radioprotettivi, ed immunomodulanti. Pertanto, gli LBP hanno un grande potenziale come farmaci per la prevenzione e il trattamento di varie malattie.

Ulteriori studi sono comunque necessari per chiarire i meccanismi d'azione di queste diverse attività, per identificare la struttura chimica degli LBP e la relazione struttura-attività.

Sebbene non siano stati riscontrati casi di tossicità degli LBP nell'uomo, sono stati segnalati due casi di possibile interazione farmacologica tra warfarin e LBP, e vari casi di allergia. È opportuno quindi approfondire lo studio tossicologico e le interazioni con altri farmaci o alimenti.

# GLOSSARIO ABBREVIAZIONI

AFLD: steatosi epatica alcolica

Ag: antigeni

AOH: ipertensione oculare acuta (acute ocular hypertension)

AP-1: la proteina attivatrice-1

AQP4: acquaporina-4

BBB: barriera emato-encefalica (blood brain barrier)

BDNF: fattore neurotrofico cerebrale (Brain-derived neurotrophic factor)

BRB: barriera fra sangue e retina (blood-retinal barrier)

BrdU: bromodeossiuridina

CAT: catalasi

CD 86: cluster di differenziazione 86

CDK2: chinasi 2 ciclina-dipendente

CFS: sindrome della fatica cronica

CK: creatina chinasi

CONT: recisione completa del nervo ottico (complete optic nerve transection)

CTL : l'attività citotossica dei linfociti T

DC: cellule dendritiche

DOX: doxorubicina

eIF2: fattore eucariotico di attivazione della traduzione

GCL: strato delle cellule gangliari

GFAP: proteina fibrillare acida della glia

GLUT4: trasportatore del glucosio di tipo 4

GM-CSF: fattore di crescita dei granulociti e dei macrofagi ( Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor)

GPx: glutazione perossidasi

GR: glutazione reduttasi

GRAS: generalmente considerato sicuri (generally recorded as safe)

GSH: glutazione

HD: una dieta ricca di grassi (high-fat diet)

HDL-C: lipoproteine ad alta densità di colesterolo

HO-1: eme ossigenasi-1

HS: stress da calore

HUVECs: cellule endoteliali della vena ombelicale umana

IBD: malattie infiammatorie intestinali (inflammatory bowel disease )

ICAM-1: molecola di adesione intercellulare

IFN- $\gamma$ : interferone  $\gamma$

IGF-1: fattore di crescita insulina simile

IGFBP: ( IGF binding protein), proteine leganti IGF

IL: interleuchine

INL: strato nucleare interno

JNK: via delle c-Jun chinasi N- terminali

LAK : Lymphokine Activated Killer cells

LBP: polisaccaridi del Lycium Barbarum, (Lycium Barbarum Poysaccharides)

LDC-C: lipoproteine a bassa densità del colesterolo

LDH: lattato deidrogenasi

MCAO: occlusione dell'arteria cerebrale media (middle cerebral artery occlusion)

MCF-7: ( Michigan Cancer Foundation-7 cells). Linea cellulare epiteliale di carcinoma mammario umano particolarmente responsiva agli estrogeni.

MDA: malondialdeide

mfERGs: elettroretinogramma multifocale

MHC-II: molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II

MMP-9: metalloproteinasi della matrice-9

NAFLD: steatosi epatica non alcolica

NDVs : virus della malattia di New Castle

NFAT: fattore nucleare dei linfociti T attivati

NF- $\kappa$ B: ( nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells ) fattore di trascrizione.

NK: cellule natural killer

Nrf2: fattore di trascrizione nucleare eritroide-2- correlato

NT: nitrotirosina

PAR: poli ADP-ribosio

PARP: enzima nucleare poli ADP-ribosio polimerasi

PBMCs: cellule mononucleate del sangue periferico

PKR: proteina chinasi dipendente dal RNA a doppio filamento

PONT: recisione parziale del nervo ottico (partial optic nerve transection)

proteina chinasi attivata da AMP (AMPK)

QHPS: polisaccaridi grezzi estratti da una combinazione di due erbe contenenti LBP e Astragalo in proporzione 2:3

RGCs: cellule gangliari della retina

ROS: specie reattive dell'ossigeno

SCO: scopolamina

SMAD (small mother against decapentaplegic)

SOD: superossido dismutasi

SREB-1c: proteine che legano gli elementi regolatori dello sterolo, (Sterol Regulatory Element-Binding Protein)

T2DM: diabete di tipo 2 ( o diabete mellito non insulina dipendente)

TAOC: capacità antiossidante totale

TERT: telomerasi trascrittasi inversa

TGF- $\beta$ : fattore di crescita trasformante  $\beta$

TNF- $\alpha$ : fattore di necrosi tumorale

WFST: weight-loaded forced swim test



# BIBLIOGRAFIA

a. Amagase H., Farnsworth N. R. , *A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of Lycium barbarum fruit (Goji).* (2011) *Food Research International* 44: 1702–1717

b. Cheng J., Zhou Z., Sheng H., He L., Fan X., He Z., Sun T., Zhang X., Zhao R. J., Gu L., Cao C., Zhou S, *An evidence-based update on the pharmacological activities and possible molecular targets of Lycium barbarum polysaccharides.* (2015) *Drug Design Development and Therapy* 9: 33-78.

c. Potterat O. , *Goji (Lycium barbarum and Lycium chinense): Phytochemistry, Pharmacology and Safety in the Perspective of Traditional Uses and Recent Popularity.* (2010) *Planta med.* ; 76: 7–19.

1. *Nutspaper*,2/2014.

2. Mindell E, Handel R. *Goji. The Himalayan health secret.* (2003) Dallas: Momentum Media.

3. Gross PM, Zhang X, Zhang R, *Wolfberry: nature's bounty of nutrition & health.* 2003 Lake Dalla: Booksurge Publishing;

4. Amagase H, Nance DM. *A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical study of the general effects of a standardized Lycium barbarum (Goji) juice, GoChi™.* (2008) *J Altern Compl Med*; 14: 403–412

5. Food and Drug Administration. *Letter of notice Ref. No. CL-06-HFS-810-214.* May 8 2006.

6. Food and Drug Administration. *Letter of notice Ref. No. CL-06-HFS-810-226.* August 7 2006.

7. Potterat O, Hamburger M. *Morinda citrifolia (Noni) fruit: phytochemistry, pharmacology, safety.* *Planta Med* 2007; 73: 191–199

8. European Commission. *Commission decision of 5 June 2003 authorising the placing on the market of „noni juice“ (juice of the fruit of Morinda citrifolia L.) as a novel food ingredient under Regulation (EC) Nr. 258/97 of the European Parliament and of the Council.* (2003) *Official Journal of the European Union: L 144/12, 12. 6.2003*

9. Food Standards Agency. Responses on Goji berries reviewed. 15 June 2007. Available at <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/gojiberriesrep.pdf>. Accessed August 7, 2009
10. Huang LJ, Tian GY, Ji GZ. Structure elucidation of glycan of glycoconjugate LbGp3 isolated from the fruit of *Lycium barbarum* L. *J (1999) Asian Nat Prod Res.*;1(4):259–267.
11. Peng X, Tian G. Structural characterization of the glycan part of glycoconjugate LbGp2 from *Lycium barbarum* L. (2001) *Carbohydr Res.*; 331(1): 95–99.
12. Qi H.C., L.J. Huang, Y.X. Zhang, X.N. Zhao, G.Y. Tian, X.B. Ru, B.F. Shen, (2001) *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology* 15: 185–190.
13. Trieschmann, M., Beatty, S., Nolan, J. M., Hense, H. W., Heimes, B., Austermann, U., et al. Changes in macular pigment optical density and serum concentrations of its constituent carotenoids following supplemental lutein and zeaxanthin. (2007). *Experimental Eye Research*, 84(4), 718–728.
14. Harsh ML. Tropane alkaloids from *Lycium barbarum* Linn., in vivo and in vitro. (1989) *Curr Sci*; 58: 817–818
15. Adams M, Wiedenmann M, Tittel G, Bauer R. HPLC-MS trace analysis of atropine in *Lycium barbarum* berries. (2006) *Phytochem Anal*; 17: 279– 283
16. Yahara S, Shigeyama C, Ura T, Wakamatsu K, Yasuhara T, Nohara T. Cyclic peptides, acyclic diterpene glycosides and other compounds from *Lycium chinense* Mill. (1993) *Chem Pharm Bull*; 41: 703–709
17. Jin M, Huang Q, Zhao K, Shang P. Biological activities and potential health benefit effects of polysaccharides isolated from *Lycium barbarum* L. (2013) *Int J Biol Macromol.*; 54: 16–23.
18. Long YC, Tan TM, Takao I, Tang BL. The biochemistry and cell biology of aging: metabolic regulation through mitochondrial signaling. (2014) *Am J Physiol Endocrinol Metab.*; 306(6): E581–E591.
19. Dai DF, Chiao YA, Marcinek DJ, Szeto HH, Rabinovitch PS. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. (2014) *Longev Healthspan.*; 3: 6.
20. Li XM, Ma YL, Liu XJ. Effect of the *Lycium barbarum* polysaccharides on age-related oxidative stress in aged mice. (2007) *J Ethnopharmacol.*; 111(3): 504–511.
21. Ibrahim W., Lee U.S., Yeh C.C., Szabo J., Bruckner G., Chow C.K., (1997) *Journal of Nutrition* 127: 1401–1406.

22. Cui B.K., Liu S., Lin X.J. Wang, J., Li S.H., Wang Q.B., Li S.P., (2011) *Molecules* 16: 9116–9128.
23. Wu HT, He XJ, Hong YK, Ma T, Xu YP, Li HH. *Chemical characterization of Lycium barbarum polysaccharides and its inhibition against liver oxidative injury of high-fat mice.* (2010) *Int J Biol Macromol*; 46(5): 540–543.
24. Ma M., Liu G., Yu Z., Chen G., Zhang X., (2009) *Food Chemistry* 113: 872–877.
25. Li XM. *Protective effect of Lycium barbarum polysaccharides on streptozotocin-induced oxidative stress in rats.* (2007) *Int J Biol Macromol.*;40(5): 461–465.
26. Shan X., Zhou J., Ma T., Chai Q., (2011) *International Journal of Molecular Sciences* 12: 1081–1088.
27. Niu AJ, Wu JM, Yu DH, Wang R. *Protective effect of Lycium barbarum polysaccharides on oxidative damage in skeletal muscle of exhaustive exercise rats.* (2008) *International Journal of Biological Macromolecules*; 42(5): 447–449.
28. Dall’Olio F, Vanhooren V, Chen CC, Slagboom PE, Wuhrer M, Franceschi C. , *N-glycomic biomarkers of biological aging and longevity: a link with inflammaging.* (2013) *Ageing Res Rev.*;12(2): 685–698.
29. Yi R, Liu XM, Dong Q. *A study of Lycium barbarum polysaccharides (LBP) extraction technology and its anti-aging effect.* (2013) *Afr J Tradit Complement Altern Med.*;10(4):171–174.
30. Tang T, He B. *Treatment of d-galactose induced mouse aging with Lycium barbarum polysaccharides and its mechanism study.* (2013) *Afr J Tradit Complement Altern Med.*;10(4):12–17.
31. Deng HB, Cui DP, Jiang JM, Feng YC, Cai NS, Li DD. *Inhibiting effects of Achyranthes bidentata polysaccharide and Lycium barbarum polysaccharide on nonenzyme glycation in d-galactose induced mouse aging model.* (2003) *Biomed Environ Sci.*;16(3): 267–275.
32. Amagase H, Nance DM. *A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical study of the general effects of a standardized Lycium barbarum (Goji) Juice, GoChi.* (2008) *J Altern Complement Med.*;14(4): 403–412.
33. Amagase H, Sun B, Borek C. *Lycium barbarum (goji) juice improves in vivo antioxidant biomarkers in serum of healthy adults.* (2009) *Nutr Res.*;29(1): 19–25.

34. Paul Hsu CH, Nance DM, Amagase H. A meta-analysis of clinical improvements of general well-being by a standardized *Lycium barbarum*. (2012) *J Med Food.*; 15(11): 1006–1014.
35. Xia G, Xin N, Liu W, Yao H, Hou Y, Qi J. Inhibitory effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on cell apoptosis and senescence is potentially mediated by the p53 signaling pathway. (2014) *Mol Med Rep.*; 9(4): 1237–1241.
36. Liu L, Wang XN, Liu Z, et al. [Effect of *Lycium bararum* polysaccharides on angiotensin II-induced senescence of human umbilical vein endothelial cells and expressions of p53 and p16]. (2011) *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.*;31(7):1212–1215.
37. Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. (2012) *Int J Cancer.*;130(8): 1715–1725.
38. Li G, Sepkovic DW, Bradlow HL, Telang NT, Wong GY. *Lycium barbarum* inhibits growth of estrogen receptor positive human breast cancer cells by favorably altering estradiol metabolism. (2009) *Nutr Cancer.*; 61(3): 408–414.
39. Shen L, Du G. *Lycium barbarum* polysaccharide stimulates proliferation of MCF-7 cells by the ERK pathway. (2012) *Life Sci.*; 91(9–10): 353–357.
40. Hu Q, Gao T, Zhao C, et al. The effect of active components of *Lycium barbarum* and garlic (LB-GO) on the synthesis of DNA and ultrastructure of u14 cervix cancer cells in mice. (1994) *Chin J Cancer Res.*; 6(4): 266–273.
41. Zhu CP, Zhang SH. *Lycium barbarum* polysaccharide inhibits the proliferation of HeLa cells by inducing apoptosis. (2013) *J Sci Food Agric.*; 93(1): 149–156.
42. Miao Y, Xiao B, Jiang Z, et al. Growth inhibition and cell-cycle arrest of human gastric cancer cells by *Lycium barbarum* polysaccharide. (2010) *Med Oncol.*; 27(3): 785–790.
43. Gan L, Wang J, Zhang S. [Inhibition the growth of human leukemia cells by *Lycium barbarum* polysaccharide]. (2001) *Wei Sheng Yan Jiu.*; 30(6): 333–335.
44. Zhang M, Chen H, Huang J, Li Z, Zhu C, Zhang S. Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on human hepatoma QGY7703 cells: inhibition of proliferation and induction of apoptosis. (2005) *Life Sci.*; 76(18): 2115–2124.
45. Chao JC, Chiang SW, Wang CC, Tsai YH, Wu MS. Hot water-extracted *Lycium barbarum* and *Rehmannia glutinosa* inhibit proliferation and induce apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. (2006) *World J Gastroenterol.*; 12(28): 4478–4484.

46. Zhang M, Tang X, Wang F, Zhang Q, Zhang Z. Characterization of *Lycium barbarum* polysaccharide and its effect on human hepatoma cells. (2013) *Int J Biol Macromol.*; 61: 270–275.
47. Gan L, Hua Zhang S, Liang Yang X, Bi Xu H. Immunomodulation and antitumor activity by a polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum*. (2004) *Int Immunopharmacol.*; 4(4): 563–569.
48. Luo Q, Li Z, Yan J, Zhu F, Xu RJ, Cai YZ. *Lycium barbarum* polysaccharides induce apoptosis in human prostate cancer cells and inhibits prostate cancer growth in a xenograft mouse model of human prostate cancer. (2009) *J Med Food.*; 12(4): 695–703.
49. Cao GW, Yang WG, Du P. Observation of the effects of LAK/IL-2 therapy combining with *Lycium barbarum* polysaccharides in the treatment of 75 cancer patients. (1994) *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.*; 16(6): 428–431.
50. Chen Z, Kwong Huat Tan B, Chan SH. Activation of T lymphocytes by polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* L. (2008) *Int Immunopharmacol.*; 8(12): 1663–1671
51. Zhang XR, Zhou WX, Zhang YX, et al. Macrophages, rather than T and B cells are principal immunostimulatory target cells of *Lycium barbarum* L. polysaccharide LBPF4-OL. (2011) *J Ethnopharmacol.*; 136(3): 465–472.
52. Z. Chen, M.Y. Soo, N. Srinivasan, B.K. Tan, S.H. Chan, *Phytotherapy Research* 23 (2009) 1116–1122
53. L. Gan, S.H. Zhang, Q. Liu, H.B. Xu, *European Journal of Pharmacology* (2003) 471: 217–222.
54. Zhu J, Zhao LH, Zhao XP, Chen Z. *Lycium barbarum* polysaccharides regulate phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells. (2007) *Cell Biol Int.*; 31(6): 615–619.
55. Chen Z, Lu J, Srinivasan N, Tan BK, Chan SH. Polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* L. is a novel stimulus of dendritic cell immunogenicity. (2009) *J Immunol.*; 182(6): 3503–3509.
56. Luo Q, Yan J, Zhang S. Isolation and purification of *Lycium barbarum* polysaccharides and its antifatigue effect. ( 2000) *Wei Sheng Yan Jiu.*; 29(2): 115–117. Chinese.
57. Wang J, Hu Y, Wang D, et al. *Lycium barbarum* polysaccharide inhibits the infectivity of Newcastle disease virus to chicken embryo fibroblast. (2010) *Int J Biol Macromol.*; 46(2): 212–216.

58. Luo Q, Cai Y, Yan J, Sun M, Corke H. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. (2004) *Life Sci.*; 76(2): 137–149.
59. Lu SP, Zhao PT. Chemical characterization of *Lycium barbarum* polysaccharides and their reducing myocardial injury in ischemia/reperfusion of rat heart. (2010) *Int J Biol Macromol.*; 47(5): 681–684.
60. Xin Y.F., Wan L.L., Peng J.L., Guo C., (2011) *Food and Chemical Toxicology* 49: 259–264.
61. Xin YF, Zhou GL, Deng ZY, et al. Protective effect of *Lycium barbarum* on doxorubicin-induced cardiotoxicity. (2007) *Phytother Res.*; 21(11): 1020–1024.
62. Xin YF, Wan LL, Peng JL, Guo C. Alleviation of the acute doxorubicin-induced cardiotoxicity by *Lycium barbarum* polysaccharides through the suppression of oxidative stress. (2011) *Food Chem Toxicol*; 49(1): 259–264.
63. Xin Y, Zhang S, Gu L, et al. Electrocardiographic and biochemical evidence for the cardioprotective effect of antioxidants in acute doxorubicin-induced cardiotoxicity in the beagle dogs. (2011) *Biol Pharm Bull*; 34(10): 1523–1526.
64. Zhao L, Wu H, Zhao A, et al. The *in vivo* and *in vitro* study of polysaccharides from a two-herb formula on ulcerative colitis and potential mechanism of action. (2014) *J Ethnopharmacol.*; 153(1): 151–159.
65. Yang X, Bai H, Cai W, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides reduce intestinal ischemia/reperfusion injuries in rats. (2013) *Chem Biol Interact.*; 204(3): 166–172.
66. Li SY, Yang D, Yeung CM, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides reduce neuronal damage, blood–retinal barrier disruption and oxidative stress in retinal ischemia/reperfusion injury. (2011) *PLoS One*; 6(1): e16380.
67. He M, Pan H, Chang RC, So KF, Brecha NC, Pu M. Activation of the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway contributes to the protective effects of *Lycium barbarum* polysaccharides in the rodent retina after ischemia-reperfusion-induced damage. (2014) *PLoS One.*; 9(1): e84800.
68. Mi XS, Feng Q, Lo AC, et al. Protection of retinal ganglion cells and retinal vasculature by *Lycium barbarum* polysaccharides in a mouse model of acute ocular hypertension. (2012) *PLoS One.*; 7(10): e45469.

69. Chan HC, Chang RC, Koon-Ching Ip A, et al. Neuroprotective effects of *Lycium barbarum* Lynn on protecting retinal ganglion cells in an ocular hypertension model of glaucoma. (2007) *Exp Neurol.*; 203(1): 269–273.
70. Chiu K, Chan HC, Yeung SC, et al. Modulation of microglia by Wolfberry on the survival of retinal ganglion cells in a rat ocular hypertension model. (2009) *J Ocul Biol Dis Infor.*; 2(2): 47–56.
71. Chiu K, Zhou Y, Yeung SC, et al. Up-regulation of crystallins is involved in the neuroprotective effect of wolfberry on survival of retinal ganglion cells in rat ocular hypertension model. (2010) *J Cell Biochem*; 110(2): 311–320.
72. Miranda M, Arnal E, Ahuja S, et al. Antioxidants rescue photoreceptors in *rd1* mice: relationship with thiol metabolism. (2010) *Free Radic Biol Med*; 48(2): 216–222
73. Li H, Liang Y, Chiu K, et al. *Lycium barbarum* (wolfberry) reduces secondary degeneration and oxidative stress, and inhibits JNK pathway in retina after partial optic nerve transection. (2013) *PLoS One.*; 8(7): e68881.
74. Chu PH, Li HY, Chin MP, So KF, Chan HH. Effect of *Lycium barbarum* (wolfberry) polysaccharides on preserving retinal function after partial optic nerve transection. (2013) *PLoS One*; 8(12): e81339.
75. Cheng D, Kong H. The effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on alcohol-induced oxidative stress in rats. (2011) *Molecules.*; 16(3): 2542–2550.
76. Xiao J, Liong EC, Ching YP, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides protect rat liver from non-alcoholic steatohepatitis-induced injury. (2013) *Nutr Diabetes*; 3: e81.
77. Xiao J, Xing F, Huo J, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides therapeutically improve hepatic functions in non-alcoholic steatohepatitis rats and cellular steatosis model. (2014) *Sci Rep.*; 4: 5587.
78. Li W, Li Y, Wang Q, Yang Y. Crude extracts from *Lycium barbarum* suppress SREBP-1c expression and prevent diet-induced fatty liver through AMPK activation. (2014) *Biomed Res Int*; 2014: 196198.
79. Xiao J, Liong EC, Ching YP, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides protect mice liver from carbon tetrachloride-induced oxidative stress and necroinflammation. (2012) *J Ethnopharmacol.*; 139(2): 462–470.
80. Ahn M, Park JS, Chae S, et al. Hepatoprotective effects of *Lycium chinense* Miller fruit and its constituent betaine in CCl<sub>4</sub>-induced hepatic damage in rats. (2014) *Acta Histochem*; 116(6): 1104–1112.

81. Zhu J, Liu W, Yu J, et al. Characterization and hypoglycemic effect of a polysaccharide extracted from the fruit of *Lycium barbarum* L. (2013) *Carbohydr Polym.*; 98(1): 8–16.
82. Yang Y, Li W, Li Y, Wang Q, Gao L, Zhao J. Dietary *Lycium barbarum* polysaccharide induces Nrf2/ARE pathway and ameliorates insulin resistance induced by high-fat via activation of PI3K/AKT signaling. (2014) *Oxid Med Cell Longev.*; 2014: 145641.
83. Zhao R, Li Q, Xiao B. Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on the improvement of insulin resistance in NIDDM rats. (2005) *Yakugaku Zasshi.*; 125(12): 981–988.
84. Wu H, Guo H, Zhao R. Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on the improvement of antioxidant ability and DNA damage in NIDDM rats. (2006) *Yakugaku Zasshi.*; 126(5):3 65–371.
85. Li XM. Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on streptozotocin-induced oxidative stress in rats. (2007) *Int J Biol Macromol.*; 40(5): 461–465.
86. Zhang YK, Wang J, Liu L, Chang RC, So KF, Ju G. The effect of *Lycium barbarum* on spinal cord injury, particularly its relationship with M1 and M2 macrophage in rats. (2013) *BMC Complement Altern Med.*; 13:67.
87. Chen W, Cheng X, Chen J, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides prevent memory and neurogenesis impairments in scopolamine-treated rats. (2014) *PLoS One.*; 9(2): e88076.
88. Yang D, Li SY, Yeung CM, et al. *Lycium barbarum* extracts protect the brain from blood–brain barrier disruption and cerebral edema in experimental stroke. (2012) *PLoS One.*; 7(3): e33596.
89. Wang T, Li Y, Wang Y, et al. *Lycium barbarum* polysaccharide prevents focal cerebral ischemic injury by inhibiting neuronal apoptosis in mice. (2014) *PLoS One.*; 9(3): e90780.
90. Yu MS, Leung SK, Lai SW, et al. Neuroprotective effects of anti-aging oriental medicine *Lycium barbarum* against b-amyloid peptide neurotoxicity. (2005) *Exp Gerontol.*; 40(8–9): 716–727.
91. Yu MS, Lai CS, Ho YS, et al. Characterization of the effects of anti-aging medicine *Fructus lycii* on  $\beta$ -amyloid peptide neurotoxicity. (2007) *Int J Mol Med.*; 20(2): 261–268.
92. Lau BW, Lee JC, Li Y, et al. Polysaccharides from wolfberry prevents corticosterone-induced inhibition of sexual behavior and increases neurogenesis. (2012) *PLoS One.*; 7(4): e33374.



93. Rui C, Yuxiang L, Yinju H, et al. Protective effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on neonatal rat primary cultured hippocampal neurons injured by oxygen-glucose deprivation and reperfusion. (2012) *J Mol Histol*; 43(5): 535–542.
94. Wang HB, Li YX, Hao YJ, et al. Neuroprotective effects of LBP on brain ischemic reperfusion neurodegeneration. (2013) *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*; 17(20): 2760–2765.
95. Ho YS, Yu MS, Yik SY, So KF, Yuen WH, Chang RC. Polysaccharides from wolfberry antagonizes glutamate excitotoxicity in rat cortical neurons. (2009) *Cell Mol Neurobiol*; 29(8): 1233–1244.
96. Wen J, Yang BN, Ren D. Effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on neurogenesis and learning and memory in manganese poisoning mice. (2010) *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.*; 30(3): 295–298. Chinese.
97. Hall JR, Wiechmann AR, Johnson LA, et al. Biomarkers of vascular risk, systemic inflammation, and microvascular pathology and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. (2013) *J Alzheimers Dis*; 35(2): 363–371.
98. Zhuo JM, Wang H, Pratico D. Is hyperhomocysteinemia an Alzheimer's disease (AD) risk factor, an AD marker, or neither? (2011) *Trends Pharmacol Sci.*; 32(9): 562–571.
99. Ho YS, Yu MS, Yang XF, So KF, Yuen WH, Chang RC. Neuroprotective effects of polysaccharides from wolfberry, the fruits of *Lycium barbarum*, against homocysteine-induced toxicity in rat cortical neurons. (2010) *J Alzheimers Dis.*; 19(3): 813–827.
100. Fan H, Deng C, Fu J, Ding L, Yin G, Ma Y. Effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on formation of traumatic neuroma and pain after transection of sciatic nerve in rats. (2010) *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*; 24(11): 1298–1301.
101. Hai-Yang G, Ping S, Li JI, Chang-Hong X, Fu T. Therapeutic effects of *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP) on mitomycin C (MMC)-induced myelosuppressive mice. (2004) *J Exp Ther Oncol.*; 4(3): 181–187.
102. Gong H, Shen P, Jin L, Xing C, Tang F. Therapeutic effects of *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP) on irradiation or chemotherapy-induced myelosuppressive mice. (2005) *Cancer Biother Radiopharm*; 20(2): 155–162.
103. Zhang C, Wang A, Sun X, et al. Protective effects of *Lycium barbarum* polysaccharides on testis spermatogenic injury induced by bisphenol A in mice. (2013) *Evid Based Complement Alternat Med.*; 2013: 690808.

104. Luo Q, Li Z, Huang X, Yan J, Zhang S, Cai YZ. *Lycium barbarum polysaccharides: protective effects against heat-induced damage of rat testes and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage in mouse testicular cells and beneficial effect on sexual behavior and reproductive function of hemicastrated rats.* (2006) *Life Sci.*; 79(7): 613–621.
105. Tan QH, An CX, Xiao Y, Liao ZM. *Protective effect of Lycium barbarum polysaccharides against heat stress-induced germ cell apoptosis in rats and its mechanism.* (2012) *Zhonghua Nan Ke Xue*; 18(1): 88–92. Chinese.
106. Zhang WX, Wang HL, Wang R, Li R, He W, Zhang TB. *Chinese medicinal monomer and compound for 60Co- $\gamma$ -induced spermatogenic disturbance in mice.* (2010) *Zhonghua Nan Ke Xue*; 16(5): 474–479. Chinese.
107. Luo Q, Cui X, Yan J, et al. *Antagonistic effects of Lycium barbarum polysaccharides on the impaired reproductive system of male rats induced by local subchronic exposure to 60Co- $\gamma$  irradiation.* (2011) *Phytother Res.*; 25(5): 694–701.
108. Wei M, Zheng SZ, Ma H, Lv Y. *Discussion of protective mechanism of Lyceum barbarum polysaccharides on ovarian tissue in female senile rats.* (2011) *Zhong Yao Cai.*; 34(12): 1915–1918. Chinese.
109. Inagaki, I., Shimada, H., Shimano, T., & Nagasawa, M. *Lycii fructus. Pharmacognosy* (pp. 145). (1979). Tokyo, Japan: Nankodo.
110. Wang, Z. *The Magic Lycium Barbarum from Ningxia Province.* (2006). China 58–128
111. Wang, Q., & Dong, Z. *Modern clinic necessities for traditional Chinese medicine — Teaching materials for international advanced training course in Europe.* (1990). Beijing: China Ocean Press
112. Bensky, D., & Gamble, A. *Gou Qi Zi. Chinese Herbal Medicine, Materia Medica* (pp. 333–334). (revised ed). (1993). Seattle, Washington: Eastland Press, Inc.
113. Chang, H. M., & But, P. P. H.. *Gouqizi. Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica, vol. 2.* (pp. 852–854) (2001) Singapore: World Scientific
114. Zhu, Y. P. *Gou Qi Zi. Chinese Materia Medica Chemistry, Pharmacology and Applications* (pp. 642–646). (1998). Amsterdam, Netherlands: Harwood Academic Publishers.
115. Dharmananda, S. *LYCIUM FRUIT.* (2007, August). Portland, Oregon: Food and Medicine, Institute for Traditional Medicine <http://www.itmonline.org/arts/lycium.htm>.

116. Amagase, H., & Hsu, C. H. P. *Meta-analysis of the general effects of a standardized Lycium barbarum fruit juice shown in randomized, double-blind, placebo-controlled human clinical studies.* (2009). *FASEB Journal*, 23, 716.1.
117. Amagase, H., & Nance, D. M. *A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical study of the general effects of a standardized Lycium barbarum (Goji) juice, GoChi™.* (2008a) *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 14, 403–412
118. Amagase, H., & Nance, D. M. (2008b). *Improvement of Sleep Quality by a Standardized Lycium barbarum Fruit Juice Shown in a Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Human Clinical Study at 7th Joint Meeting of GA, AFERP, ASP, PSI & SIF in Athens, Greece, August 3–8.*
119. Chang HM, But PPH, Yao SC, Wang L, Yeung SCS. *Pharmacology and applications of Chinese Materia Medica, volume 2.* (2001) New Jersey, London, Singapore, Hong Kong: World Scientific.
120. Martinez A.Q, Saenz, MJ; Arias F.A. , Acosta, M. S, *Lycium barbarum: A new hepatotoxic "natural" agent?* (2011) *Digestive and liver disease*; 43 (9): 749
121. Lam AY, Elmer GW, Mohutsky MA. *Possible interaction between warfarin and Lycium barbarum L.* (2001) *Ann Pharmacother*; 35: 1199–1201
122. Leung H, Hung A, Hui ACF, Chan TYK. *Warfarin overdose due to the possible effects of Lycium barbarum L.* (2008) *Food Chem Toxicol*; 46: 1860–1862
123. Larramendi CH, García-Abujeta JL, Vicario S, García-Endrino A, López-Matas MA, García-Sedeño MD, Carnés J. *Goji Berries (Lycium barbarum): Risk of Allergic Reactions in Individuals With Food* (2012) *Allergy J Investig Allergol Clin Immunol*; 22(5): 345-350