

Articolo

Una Formulazione Nutraceutica Contenente Alghe Brune Riduce L'accumulo Di Lipidi Epatici Modulando il Metabolismo Lipidico e l'infiammazione in Modelli Sperimentali di NAFLD e NASH

Daniela Gabbia ¹, Marco Roverso ², Iliara Zanotto ¹, Martina Colognesi ¹, Katia Sayaf ³, Samantha Sarcognato ⁴, Diletta Arcidiacono ⁵, Alice Zaramella ^{3,5}, Stefano Realdon ⁵, Nicola Ferri ⁶, Maria Guido ^{4,6}, Francesco Paolo Russo ³, Sara Bogianni ², Maria Carrara ¹ and Sara De Martin ^{1,*} 

¹ Dipartimento di Scienze Farmaceutiche e Farmacologiche, Università di Padova, 35131 Padova, Italia
² Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Padova, 35131 Padova, Italia
³ Dipartimento di Chirurgia, Oncologia e Gastroenterologia, Università di Padova, 35131 Padova, Italia
⁴ Reparto di Patologia, Azienda ULSS2 Marca Trevigiana, 31100 Treviso, Italia
⁵ Unità di Gastroenterologia, Istituto Veneto di Oncologia IOV-IRCCS, 35131 Padova, Italia
⁶ Dipartimento di Medicina, Università di Padova, 35131 Padova, Italia
* Contatti: sara.demartin@unipd.it; Tel.: +39-0498275077



Riferimenti: Gabbia, D.; Roverso, M.; Zanotto, I.; Colognesi, M.; Sayaf, K.; Sarcognato, S.; Arcidiacono, D.; Zaramella, A.; Realdon, S.; Ferri, N.; et al. Una Formula Nutraceutica Contenente Alghe Brune Riduce l'accumulo di Lipidi Epatici Modulando il Metabolismo Lipidico e l'Infiammazione in Modelli Sperimentali di NAFLD e NASH. *Mar. Drugs* **2022**, *20*, 572. <https://doi.org/10.3390/md20090572>

Redattore accademico: Ralph Urbatzka

Ricevuto: 7 agosto 2022
Approvato: 5 settembre 2022
Pubblicato: 8 settembre 2022

Nota dell'editore: MDPI rimane neutrale per quanto riguarda le rivendicazioni giurisdizionali nelle mappe pubblicate e le affiliazioni istituzionali.



Copyright: © 2022 dagli autori. Licenza MDPI, Basilea, Svizzera. Questo articolo è un articolo ad accesso libero distribuito secondo i termini e le condizioni della licenza Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Recentemente, alcuni studi preclinici e clinici hanno dimostrato la capacità delle alghe brune di ridurre i fattori di rischio della sindrome metabolica. In questa sede, abbiamo analizzato l'effetto benefico di una formulazione nutraceutica contenente un fitocomplesso estratto da alghe marine e cromo picolinato in modelli animali affetti da steatosi epatica di diversa gravità (ratti con steatosi epatica non alcolica (NAFLD) e la sua complicanza, la steatoepatite non alcolica (NASH)). Questo trattamento ha portato a un calo significativo del deposito di grasso epatico in entrambi i modelli ($p < 0,01$ rispetto agli animali non trattati), accompagnato da una riduzione delle citochine infiammatorie plasmatiche, come l'interleuchina 6, il fattore di necrosi tumorale α e la proteina C reattiva, e dell'espressione della mieloperossidasi nel tessuto epatico. Inoltre, è stata dimostrata una modulazione delle vie molecolari coinvolte nel metabolismo e nell'immagazzinamento dei lipidi, poiché abbiamo osservato una riduzione significativa dei livelli di mRNA della sintasi degli acidi grassi, della diacilglicerolo aciltransferasi, della proteina SREBP-1 che lega gli steroli e del trasportatore di lipidi perilipina 2, sia nei ratti NAFLD sia in quelli NASH trattati rispetto a quelli non trattati. In conclusione, questo prodotto nutraceutico è stato efficace nel ridurre la steatosi epatica e ha mostrato ulteriori effetti benefici sull'infiammazione epatica e sul controllo glicemico, particolarmente evidenti nei ratti caratterizzati da una condizione più grave, rappresentando così un'alternativa terapeutica per il trattamento dei pazienti affetti da NAFLD e NASH.

Parole chiave: NAFLD; NASH; alga bruna; estratto algale; steatosi; *Ascophyllum nodosum*; *Fucus vesiculosus*

1. Introduzione

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) è la manifestazione epatica della sindrome metabolica (MetS) ed è associata ad altre patologie, come ipertensione, obesità, dislipidemia e diabete mellito di tipo 2 [1]. La NAFLD è caratterizzata da un accumulo progressivo di lipidi negli epatociti in vescicole intracellulari chiamate goccioline lipidiche. L'aumento del rischio di mortalità associato alla NAFLD nei pazienti affetti è principalmente legato all'insorgenza di disturbi cardiovascolari o di complicanze epatiche, tra cui il carcinoma epatocellulare (HCC) [2].

L'accumulo di acidi grassi (FA) contribuisce al declino della funzione epatica, aumentando l'infiammazione e lo stress ossidativo negli epatociti e favorendo la loro apoptosi [3]. L'accumulo di FA liberi (FFA) nel fegato dipende essenzialmente dall'equilibrio di tre fonti principali: l'assorbimento epatico di acidi grassi non esterificati (NEFA) dal plasma, che rappresenta quasi il 60%, la lipogenesi de novo (25%) e l'assorbimento di FA alimentari dalla circolazione portale (15%) [4]. Di solito nei pazienti affetti da NAFLD l'eccessivo apporto di FA alimentari, combinato con uno squilibrio delle altre due fonti, è responsabile dell'accumulo patologico di FFA. Inoltre, altre disfunzioni metaboliche, come l'obesità e l'insulino resistenza, portano a un surplus energetico che satura la capacità di immagazzinamento del tessuto adiposo, aumentando così il rilascio di FFA nel flusso sanguigno, dal quale vengono assorbiti dal fegato per la sintesi dei trigliceridi. Inoltre, la lipogenesi de novo a digiuno è 3 volte superiore nei pazienti con NAFLD rispetto ai soggetti sani [4] poiché in tali pazienti l'insulina stimola in modo anomalo questo processo attraverso le proteine leganti gli elementi regolatori degli steroli (SREBP) [5].

Sebbene siano in corso numerosi studi clinici che valutano diversi candidati farmaci, ad oggi non esiste alcun farmaco approvato per la terapia dei pazienti affetti da NAFLD. Inoltre, questa malattia di solito non presenta manifestazioni cliniche evidenti al primo stadio, rendendo difficile una diagnosi tempestiva [6]. I principali interventi clinici si basano attualmente su un approccio nutrizionale e su modifiche dello stile di vita, ad esempio una dieta ipocalorica restrittiva e la perdita di peso, con l'obiettivo di ridurre i fattori di rischio della MetS e di prevenire e/o ridurre la progressione della NAFLD verso un'insufficienza epatica grave. A causa dell'aumento della prevalenza della NAFLD in tutto il mondo e delle conseguenze dannose della transizione dalla NAFLD alla steatoepatite non alcolica (NASH) e al carcinoma epatocellulare (HCC), l'identificazione di strategie terapeutiche efficaci per curare la NAFLD e prevenirne la progressione rappresenta un'importante esigenza medica non ancora soddisfatta.

Diverse molecole/estratti di origine naturale esercitano effetti benefici sulla funzione epatica e riducono i fattori di rischio associati al metabolismo. Tra queste, le alghe brune sono ben note per il loro contenuto di macro e micronutrienti. Le alghe brune, come *Ascophyllum nodosum* e *Fucus vesiculosus*, sono note per contenere elevate quantità di composti bioattivi come polisaccaridi e polifenoli e sono in grado di rallentare la digestione dei carboidrati complessi, migliorare la resistenza all'insulina e abbassare il picco glicemico postprandiale [7]. A ulteriore sostegno dell'efficacia delle alghe nel trattamento e nella prevenzione delle malattie associate alla MetS, l'evidenza epidemiologica ha dimostrato una maggiore incidenza dell'obesità e delle patologie metaboliche indotte dalla dieta nei Paesi occidentali rispetto ai Paesi orientali, dove le alghe sono regolarmente consumate in molte diete [7].

L'assunzione di alghe brune in volontari sani ha portato a una riduzione significativa dei trigliceridi plasmatici rispetto al gruppo trattato con placebo [8].

Il cromo è un elemento essenziale coinvolto in molti processi metabolici e risposte biochimiche e può migliorare la resistenza all'insulina, la disregolazione del metabolismo lipidico e il danno epatico [9,10]. Gli integratori contenenti cromo picolinato migliorano i parametri del diabete, dell'obesità e della sindrome dell'ovaio policistico, regolando il metabolismo lipidico e riducendo l'insulino resistenza e lo stress ossidativo, tutti processi coinvolti nella patogenesi della NAFLD [11]. A seguito di questi effetti peculiari, recenti studi preclinici e clinici hanno indagato il suo ruolo nella gestione della NAFLD/NASH, osservando che l'integrazione con questo elemento è utile per ridurre il peso corporeo, la steatosi epatica e lo stress ossidativo nella NAFLD [11-13].

Alla luce di queste considerazioni, lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'efficacia di una formulazione nutraceutica disponibile in commercio (Gdue®), contenente estratto di alga bruna e cromo picolinato, in relazione all'accumulo di lipidi epatici in due modelli animali con diversi gradi di steatosi epatica, attivati mediante la somministrazione a ratti maschi Sprague Dawley di una dieta ad alto contenuto di grassi (HFD, 60% di grassi) e del 30% di fruttosio nell'acqua potabile per 12 settimane (per i ratti NAFLD) o 18 settimane (per i ratti NASH)[14].

2. Risultati

2.1. Effetto In Vitro Della Formulazione Nutraceutica Sugli Enzimi Digestivi

Poiché le alghe contengono molecole in grado di inibire gli enzimi digestivi dedicati alla digestione di carboidrati e lipidi complessi per consentirne l'assorbimento nel tratto intestinale, è stata studiata l'attività inibitoria della formulazione nutraceutica sugli enzimi intestinali α -lipasi, α -glucosidasi e α -amilasi. Abbiamo confermato che la formulazione nutraceutica era in grado di inibire efficacemente sia l' α -glucosidasi sia l' α -amilasi (Figura 1A,B), come già dimostrato per l'estratto d'acqua puro di *F. vesiculosus* e di *A. nodosum* [15], mentre non è stato osservato alcun effetto inibitorio sull'attività dell' α -lipasi (Figura 1C), indicando che questa formulazione nutraceutica agisce direttamente sulla digestione dei carboidrati, ma non ha probabilmente alcun effetto diretto sulla digestione dei lipidi alimentari.

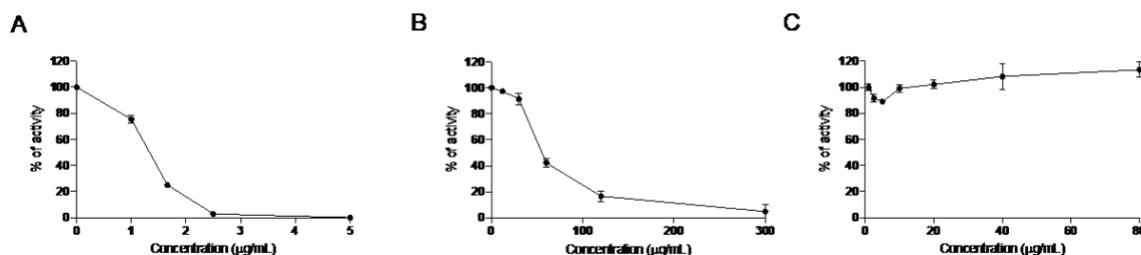


Figura 1. Inibizione dose-dipendente dell'attività di α -glucosidasi (A), α -amilasi (B) e α -lipasi (C), da parte della formulazione nutraceutica. I dati sono presentati come medie \pm SEM. I risultati sono ottenuti da tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato.

2.2. Valutazione della Sicurezza In Vivo della Formulazione Nutraceutica sul Fegato

Abbiamo quindi condotto uno studio preliminare su ratti maschi Sprague Dawley sani nutriti con una dieta standard per valutare la potenziale epatotossicità di un trattamento di 12 settimane con la formulazione nutraceutica, somministrata una volta al giorno tramite sondino orale. Come illustrato nella Figura 2, non sono state osservate differenze nell'aumento del peso corporeo e nell'istologia epatica al momento della dissezione tra i ratti di controllo e quelli trattati. L'assenza di differenze significative nei parametri biochimici plasmatici, tra cui l'aspartato aminotransferasi (AST), l'alanina aminotransferasi (ALT) e la fosfatasi alcalina (ALP), dei ratti non trattati e di quelli trattati (Tabella 1), conferma che la formulazione nutraceutica non ha causato effetti epatotossici. Inoltre, abbiamo valutato la concentrazione di tre marcatori infiammatori plasmatici, ossia interleuchina 6 (IL-6), fattore di necrosi tumorale α (TNF- α) e proteina C reattiva (CRP), che non sono stati alterati dal trattamento.

Tabella 1. Analisi biochimiche di campioni di plasma raccolti da ratti nutriti con dieta standard e trattati con veicolo o con la formulazione nutraceutica per 12 settimane.

Parametro	Ratti sani (Veicolo)	Ratti sani (Formulazione nutraceutica)
Glicemia (mg/dL)	147.5 \pm 13.1	140.3 \pm 8.1
Urea (mmol/L)	5.4 \pm 0.5	5.1 \pm 0.2
Creatinina (μ mol/L)	14.5 \pm 1.9	12.7 \pm 1.5
Sodio (mmol/L)	143 \pm 2.2	142 \pm 1.0
Potassio (mmol/L)	4.3 \pm 0.5	4.2 \pm 0.4
Cloruro (mmol/L)	100.0 \pm 2.4	100.7 \pm 1.2
Bilirubina totale (μ mol/L)	0.7 \pm 0.3	0.8 \pm 0.1
Albumina (g/L)	12.0 \pm 0.0	12.3 \pm 0.6
Calcio (mmol/L)	2.6 \pm 0.1	2.6 \pm 0.1
Fosfato inorganico (mmol/L)	1.9 \pm 0.2	1.8 \pm 0.1
AST (U/L)	103.3 \pm 17.1	94.3 \pm 7.6
ALT (U/L)	29.8 \pm 3.0	17.0 \pm 9.5
ALP (U/L)	156.5 \pm 31.4	119.0 \pm 22.3
Colesterolo totale (mg/dL)	66.0 \pm 10.2	70.0 \pm 13.5
TG (mg/dL)	89.0 \pm 12.8	114.7 \pm 23.6

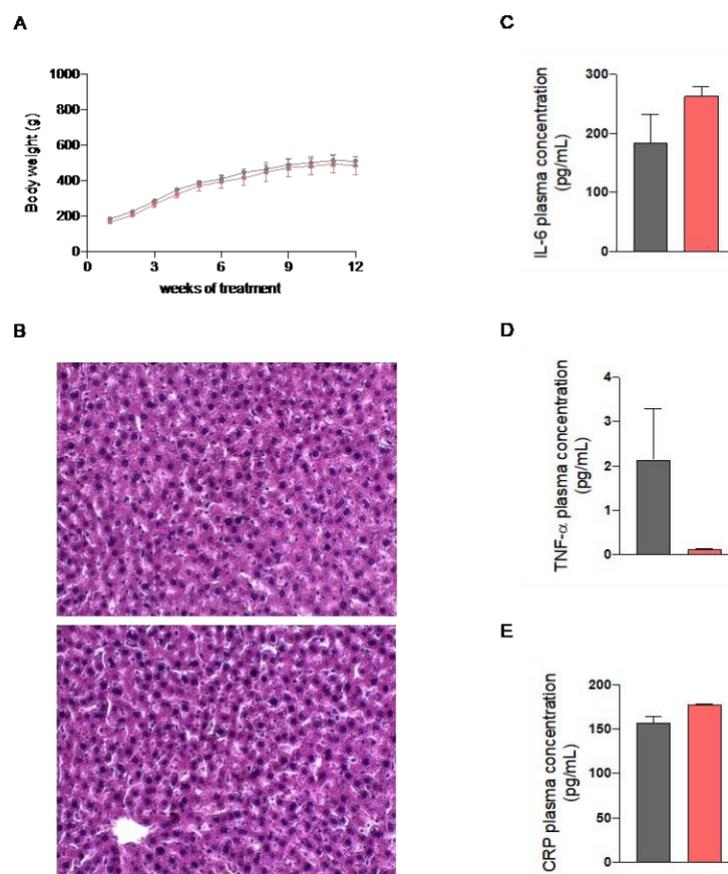


Figura 2. Aumento del peso corporeo in ratti sani trattati con veicolo (grigio) o con la formulazione nutraceutica (rosso chiaro) (A). Immagini istologiche del tessuto epatico, non trattato (riquadro superiore) e trattato (riquadro inferiore), colorato con H&E (B). Livelli plasmatici dei tre marcatori infiammatori IL6 (C), TNF- α (D) e proteina C reattiva (E). I dati sono presentati come medie \pm SEM di 10 ratti per gruppo.

2.3. Valutazione In Vivo dell'Efficacia della Formulazione Nutraceutica contro la Steatosi Epatica

2.3.1. Effetto sul Peso Corporeo

Per valutare la sua efficacia nel ridurre la steatosi epatica, la formulazione nutraceutica è stata testata in vivo su un modello di ratto affetto da NAFLD e NASH. Per indurre una steatosi epatica di diversa gravità, è stata somministrata una dieta modificata ad alto contenuto di grassi (HFD, 60% di grassi) con 30% di fruttosio nell'acqua potabile a ratti maschi Sprague Dawley per 12 settimane per indurre la NAFLD o per 18 settimane per indurre la progressione della NAFLD in NASH [16]. Come riportato nella Figura 3 e nella Tabella 2, il trattamento con la formulazione nutraceutica ha causato una riduzione generale del peso corporeo ($p < 0,05$ in entrambe le cavie, effetto del trattamento), che è aumentato significativamente durante lo studio ($p < 0,0001$, effetto del tempo). Un'analisi a posteriori ha rivelato che la differenza tra i gruppi trattati e non trattati (effetto combinato di tempo e trattamento) è risultata significativa dopo 16 settimane di somministrazione nei ratti NASH (Figura 3B).

Tabella 2. Analisi statistica del peso corporeo eseguita utilizzando un Modello a Effetti Misti (REML).

Parametro	Ratti NAFLD	Ratti NASH
Tempo	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
Trattamento	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Tempo X Trattamento	ns	$p < 0,0001$

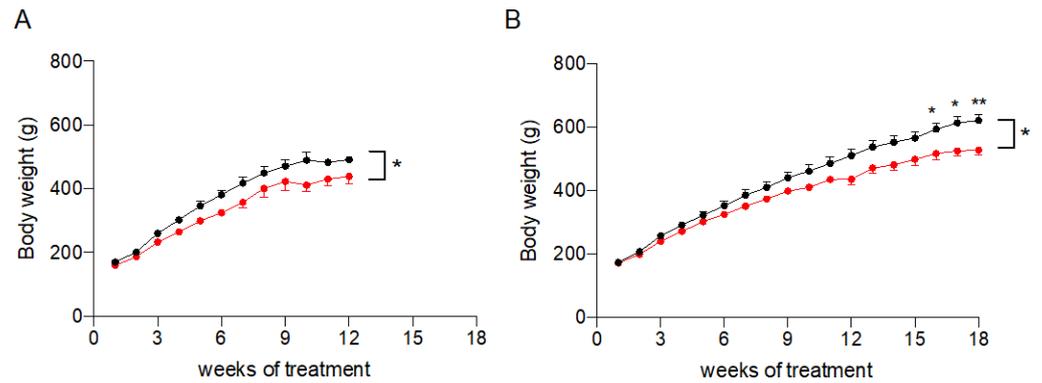


Figura 3. Aumento del peso corporeo dei ratti NAFLD (A) e NASH (B) trattati con veicolo (nero) o con la formula nutraceutica (rosso). I dati sono presentati come medie \pm SEM di 10 ratti per gruppo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ rispetto ai ratti non trattati.

2.3.2. Effetto sulle Prestazioni Fisiche

Per verificare se il trattamento avesse un impatto sulle prestazioni fisiche dei ratti, abbiamo valutato la loro coordinazione e resistenza alla fatica mediante il test del rotarod, eseguito una volta alla settimana durante il trattamento. Come mostrato nella Figura 4, gli animali trattati con la formula nutraceutica hanno trascorso in media più tempo sul dispositivo rotarod rispetto ai ratti non trattati, ma la differenza tra i due gruppi non ha raggiunto un livello di significatività statistica, probabilmente a causa dell'elevata variabilità interindividuale. Tuttavia, questo risultato suggerisce che il trattamento può contribuire al miglioramento della resistenza alla fatica nella NAFLD e nella NASH.

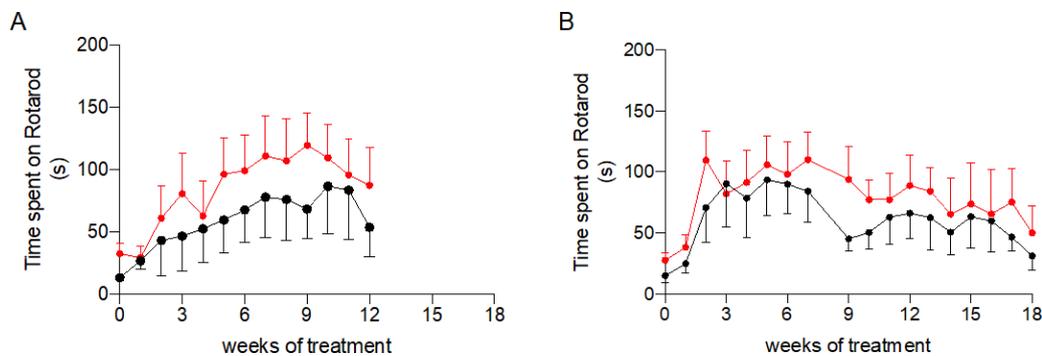


Figura 4. Prestazioni fisiche al test del rotarod dei ratti NAFLD (A) e NASH (B) trattati con veicolo (nero) o con la formulazione nutraceutica (rosso). I dati sono presentati come medie \pm SEM di 10 ratti per gruppo.

2.3.3. Effetto sul Controllo Glicemico

Il giorno precedente al sacrificio, gli animali sono stati nutriti dopo 12 ore di digiuno con amido di mais in olio di girasole al 50%-50% per simulare un pasto completo con un alto contenuto di carboidrati complessi, in combinazione o meno con la formulazione nutraceutica, somministrata alla dose di 7,5 mg/kg. Come mostrato nella Figura 5, il trattamento ha indotto una riduzione significativa della glicemia postprandiale solo negli animali NASH. L'effetto sulla glicemia postprandiale dopo 18 settimane di trattamento è confermato da una diminuzione significativa dell'area sotto la curva glicemica (AUC) e della concentrazione massima (Cmax) del glucosio nel sangue (Figura 5C). Questi risultati confermano l'efficacia della formulazione nutraceutica nella riduzione dell'assorbimento del glucosio assunto con la dieta.

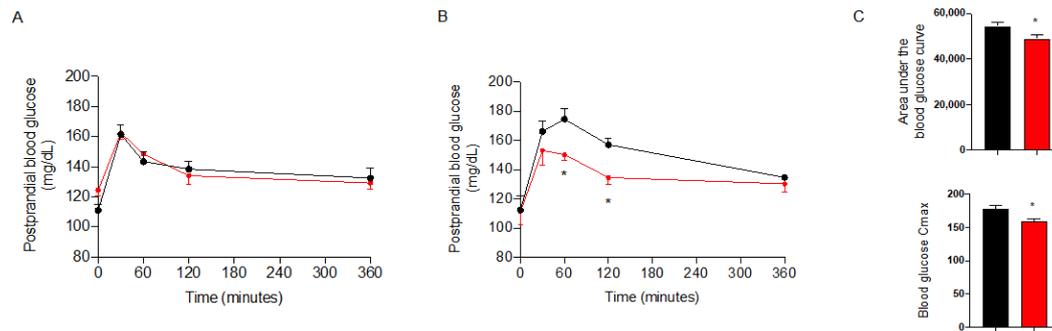


Figura 5. Glicemia postprandiale in ratti NAFLD (A) e NASH (B) trattati con veicolo (nero) o con la formulazione nutraceutica (rosso). Area sotto la curva e Cmax dei ratti NASH (C). I dati sono presentati come medie \pm SEM di 10 ratti per gruppo. * $p < 0,05$ rispetto ai ratti NASH non trattati.

Poiché l'estratto di *A. nodosum* e *F. vesiculosus* ha migliorato i livelli di glucosio nel sangue a digiuno in studi sia preclinici che clinici [8,17-19], abbiamo valutato l'effetto della formulazione nutraceutica sulla glicemia a digiuno, sul colesterolo e sui trigliceridi nei ratti con NAFLD e NASH al momento del sacrificio. Come illustrato nella Figura 6, il trattamento ha ridotto significativamente la glicemia e i trigliceridi plasmatici nei ratti con NAFLD e NASH. L'effetto della formulazione nutraceutica sul colesterolo totale è stato significativo nei ratti NAFLD, mentre nei ratti NASH questo parametro non risulta essere stato influenzato dal trattamento.

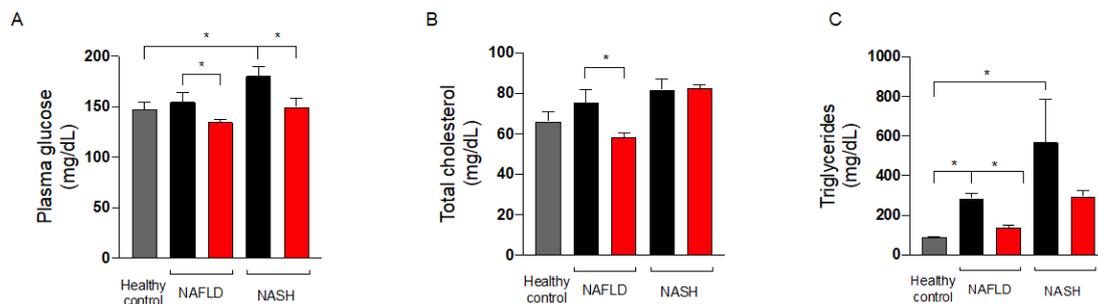


Figura 6. Livelli plasmatici di glucosio (A), colesterolo totale (B) e trigliceridi (C) in ratti sani (grigio) e in ratti NAFLD e NASH trattati con veicolo (nero) o con la formulazione nutraceutica (rosso). I dati sono presentati come medie \pm SEM di 10 ratti per gruppo. * $p < 0,05$.

2.3.4. Effetto sulla Funzione Epatica

Per valutare l'effetto della formulazione nutraceutica sulla funzione epatica, sono stati misurati nel plasma dei ratti alcuni parametri biochimici, in particolare ALT, ALP e bilirubina totale. Come mostrato nella Figura 7, i tre marcatori biochimici tendevano ad aumentare o aumentavano significativamente nei ratti NAFLD e NASH e il trattamento con la formulazione nutraceutica ha portato alla loro normalizzazione. Inoltre, il trattamento ha ridotto l'accumulo lipidico epatico sia nei ratti NAFLD che in quelli NASH, come dimostrato dalla quantificazione dei trigliceridi negli estratti ottenuti dai tessuti epatici (Figura 7D) e dalla valutazione istologica del numero e delle dimensioni delle goccioline lipidiche presenti nel parenchima epatico, colorate mediante Oil Red O (ORO) (Figura 7E).

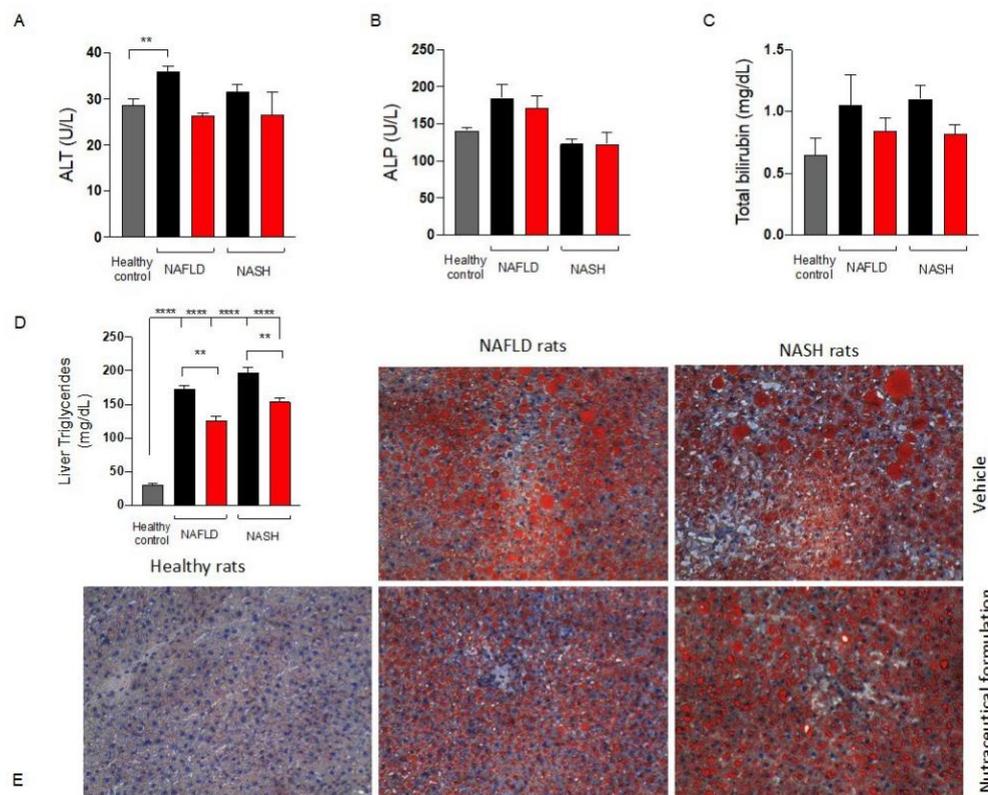


Figura 7. Livelli di alanina aminotransferasi (ALT) (A), fosfatasi alcalina (ALP) (B) e bilirubina totale (C) nel plasma e trigliceridi nel fegato (D) di soggetti sani (grigio) e NAFLD e NASH trattati con veicolo (nero) o formulazione nutraceutica (rosso). Esame istologico della steatosi epatica mediante colorazione ORO (E), ingrandimento 10X. I dati sono presentati come medie \pm SEM di 10 ratti per gruppo. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

2.3.5. Effetto sull'Infiammazione

Poiché lo sviluppo della NAFLD/NASH è associato all'infiammazione sistemica [20], sono stati valutati i livelli plasmatici dei tre marcatori infiammatori IL-6, TNF- α e CRP. I risultati riportati nella Figura 8 mostrano un aumento dei tre indici di infiammazione nei ratti NAFLD. Il trattamento è stato in grado di contrastare questo aumento, ripristinando i loro livelli fisiologici. Per valutare l'effetto del trattamento sull'infiammazione epatica, abbiamo misurato anche l'espressione proteica della mieloperossidasi (MPO), una proteina prodotta dai neutrofili, cellule immunitarie attivate dal fegato in condizioni di infiammazione [21]. Come previsto, i ratti NAFLD e NASH hanno mostrato un aumento significativo dell'espressione di MPO nel tessuto epatico, particolarmente evidente nei ratti con NASH. Il trattamento è stato in grado di contrastare l'infiammazione, poiché l'espressione della proteina MPO è stata significativamente ridotta nel parenchima epatico dei ratti trattati.

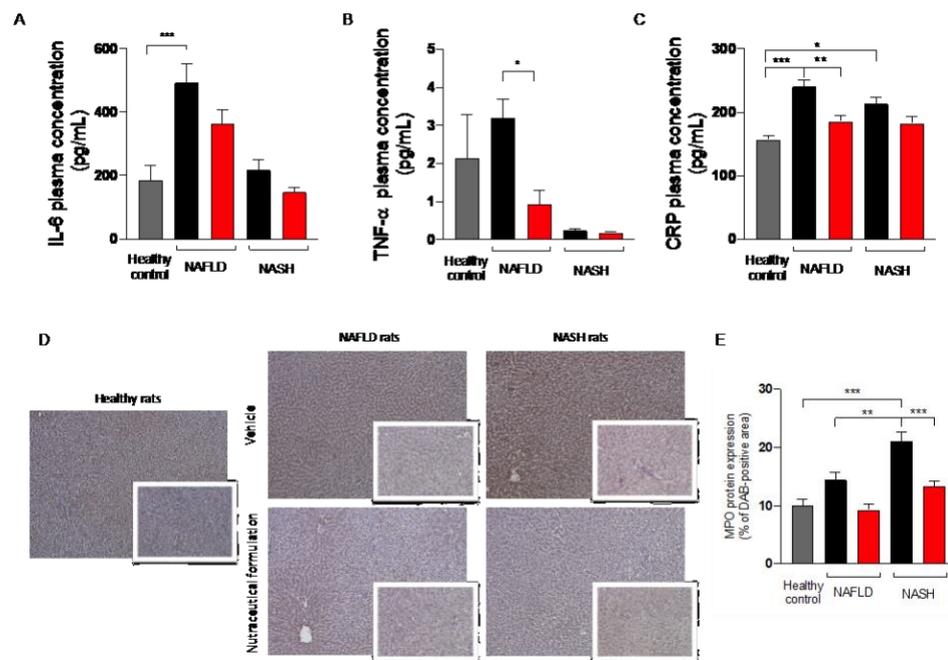


Figura 8. Livelli plasmatici di IL-6 (A), TNF- α (B) e proteina C reattiva (C) in ratti sani (grigio) e in ratti NAFLD e NASH trattati con veicolo (nero) o con la formulazione nutraceutica (rosso). Immagini immunohistochemiche rappresentative dell'espressione proteica epatica di MPO (D) e loro quantificazione (E). I dati sono presentati come medie \pm SEM di 10 ratti per gruppo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

2.3.6. Effetto sul Metabolismo Lipidico Epatico

Dato che la disregolazione del metabolismo lipidico e della lipogenesi de novo accompagna la steatosi epatica, abbiamo valutato l'effetto del trattamento sull'espressione di un pannello di geni coinvolti in questi percorsi cellulari (Figura 9A–D). L'espressione di mRNA delle due isoforme di diacilglicerolo aciltransferasi, DGAT-1 e DGAT-2, coinvolte nella formazione delle goccioline lipidiche, è aumentata nei ratti NAFLD e NASH rispetto a quelli di controllo. La somministrazione della formulazione nutraceutica ha sottoregolato in maniera significativa i due geni, ripristinando i loro livelli fisiologici (Figura 9A, B). Abbiamo misurato l'espressione di mRNA della sintasi degli acidi grassi (FASN), osservando una sovraregolazione significativa negli animali NAFLD e NASH rispetto al gruppo di controllo. Il trattamento ha agito positivamente sulla sovraregolazione della FASN, riducendo in maniera significativa la sua espressione di mRNA (Figura 9C). Inoltre, la proteina legante gli elementi regolatori degli steroli SREBP-1, un fattore di trascrizione che regola l'omeostasi lipidica, era stata sovraregolata nei ratti NAFLD e il suo livello fisiologico è stato ripristinato dalla formula nutraceutica (Figura 9D). Abbiamo valutato infine l'espressione proteica della perilipina 2 (PLIN-2) nei tessuti epatici mediante immunohistochimica. La PLIN-2 è coinvolta nell'immagazzinamento dei lipidi neutri nelle goccioline lipidiche e il suo aumento è stato osservato in molte patologie metaboliche [22]. Come mostrato nelle Figure 9E e F, i ratti NAFLD e NASH hanno evidenziato un aumento significativo nell'espressione della proteina PLIN-2 nel tessuto epatico. È interessante notare che il trattamento nutraceutico ha ridotto significativamente l'espressione della proteina PLIN-2 nel parenchima epatico, specialmente nei ratti con NASH, confermando ulteriormente l'effetto del trattamento nutraceutico sull'accumulo e sul metabolismo lipidico.

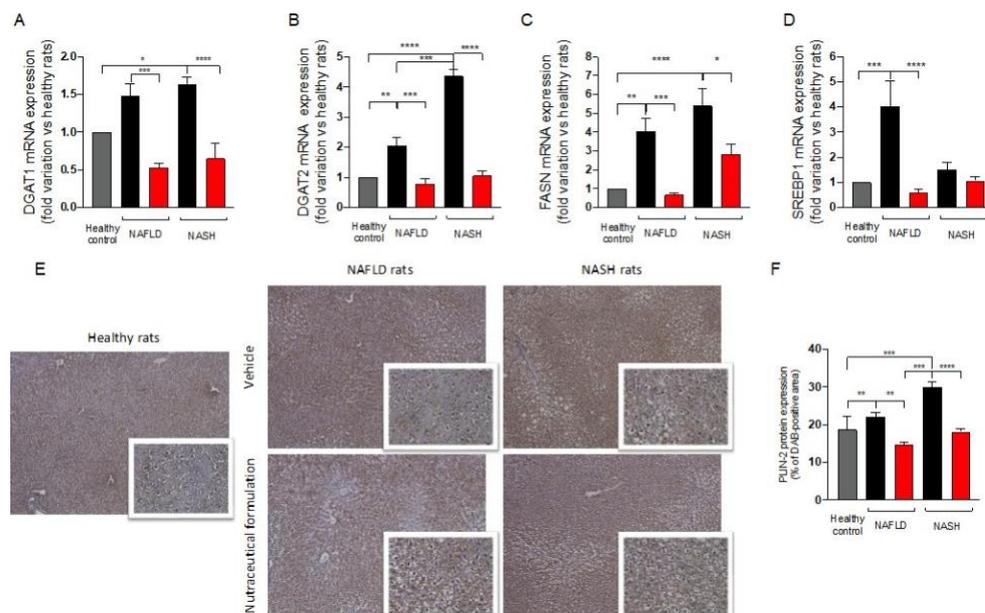


Figura 9. Espressione di mRNA nel tessuto epatico di DGAT1 (A), DGAT2 (B), FASN (C), SREBP1 (D), misurata tramite qRT-PCR in ratti sani (grigio) e in ratti NAFLD e NASH trattati con veicolo (nero) o con formulazione nutraceutica (rosso). I dati sono presentati come medie \pm SEM di variabilità normalizzata su ratti sani usati come controllo ($n = 10$). Immagini immunohistochemiche rappresentative dell'espressione proteica epatica di PLIN-2 (E) e relativa quantificazione (F). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

3. Discussione

La NAFLD rappresenta una delle epatopatie croniche più comuni nei paesi occidentali, con un'incidenza in costante aumento in tutto il mondo [23]. Sebbene nelle fasi iniziali la NAFLD sia una condizione benigna e reversibile, può progredire in forme più gravi come NASH, cirrosi e HCC. Questa transizione si verifica in seguito al "secondo colpo", in genere una lesione pro-infiammatoria del fegato [14]. L'accumulo epatico di FFA e colesterolo induce una disfunzione mitocondriale e uno stress del reticolo endoplasmatico (ER), che porta ad un danno epatico collegato al TNF- α e all'aumento della produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Nello sviluppo dell'obesità collegata alla NAFLD, fegato e tessuto adiposo interagiscono, essendo il tessuto adiposo un organo endocrino ed immunitario in grado di rilasciare nel sistema circolatorio una serie di chemochine e adipochine pro-infiammatorie, come ad esempio la leptina, la IL-6 e il TNF- α , che organizzano e coordinano lo sviluppo della NAFLD [14].

Poiché non esiste una terapia farmacologica approvata per il trattamento della NAFLD, attualmente si consigliano approcci non farmacologici e cambiamenti allo stile di vita, come ad esempio l'incrementare l'attività fisica e seguire una dieta alimentare [23], compreso l'uso di prodotti nutraceutici [7]. Uno studio precedente ha dimostrato che l'estratto acquoso di *Ascophyllum nodosum* e *Fucus vesiculosus* ha migliorato la funzione epatica nella steatosi microvescicolare di un modello di ratto [24]. Nello studio presente si è valutata l'efficacia della formulazione nutraceutica contenente un fitocomplesso estratto dalle stesse due alghe brune con aggiunta di cromo picolinato su steatosi epatica a diversi livelli di gravità, ottenuta somministrando a ratti maschi Sprague Dawley una dieta ad alto contenuto di grassi e di fruttosio per 12 o 16 settimane.

La formulazione nutraceutica testata in questo studio conteneva un estratto di alghe brune titolato in polifenoli al 20% e cromo picolinato (0,26 mg/g). La presenza di polisaccaridi, polifenoli e solfolipidi è stata confermata dall'analisi DI-HRMS dell'estratto acquoso e metanolico della formula nutraceutica (si vedano i Materiali Supplementari per ulteriori dettagli). Come già dimostrato da molti studi preclinici e clinici, anche questo studio ha dimostrato che l'estratto algale presente nel prodotto è in grado di inibire l' α -amilasi e l' α -glucosidasi, due enzimi chiave nel metabolismo, riducendo così l'assorbimento dell'amido e dei carboidrati complessi. L' α -amilasi, secreta dal pancreas e dalle ghiandole salivari, catalizza la scissione dei legami α -D-glicosidici (1,4) dei carboidrati complessi, ad es. amido e glicogeno, lisandoli in oligosaccaridi più corti, mentre l' α -glucosidasi, presente sulla membrana superficiale dell'orletto a spazzola delle cellule intestinali, attiva la fase finale del processo digestivo catalizzando l'idrolisi dei carboidrati e dei disaccaridi in monosaccaridi assorbibili [25,26].

L'inibizione di questi due enzimi determina una minore assimilazione dei polisaccaridi con la conseguente riduzione dei livelli glicemici postprandiali, come dimostrato negli animali NASH trattati. Questo effetto inibitorio non è stato osservato per l' α -lipasi, un enzima gastrointestinale che riveste un ruolo fondamentale nell'assorbimento dei grassi alimentari idrolizzando i trigliceridi in monogliceridi e acidi grassi liberi, che vengono poi assorbiti attraverso la mucosa duodenale [27]. La formula nutraceutica non ha inibito l' α -lipasi nelle nostre condizioni sperimentali, suggerendo in tal modo che l'effetto di questo prodotto è dovuto principalmente alla riduzione dell'assorbimento dei carboidrati complessi e non dei grassi alimentari.

I risultati ottenuti nei nostri modelli animali di NAFLD e NASH hanno confermato che il trattamento riduce l'aumento di peso corporeo, ed è probabile che tale riduzione sia correlata al miglioramento nella coordinazione e nella resistenza alla fatica osservate nei ratti trattati come dimostrato dai risultati del test rotarod.

I risultati della curva glicemica postprandiale confermano inoltre l'efficacia della formulazione nutraceutica nel ridurre l'assorbimento di glucosio negli animali caratterizzati da condizioni epatiche più gravi. Il trattamento nutraceutico, infatti, riduce negli animali NASH l'indice glicemico, abbassando sia l'AUC che il Cmax della curva glicemica postprandiale, e confermando così i dati precedenti [15]. Interessante è anche il fatto che altri dati supportano l'effetto di *F. vesiculosus* nel ridurre la glicemia inibendo la dipeptidil-peptidasi IV, l'enzima responsabile della degradazione delle incretine [28]. Inoltre, la formulazione nutraceutica ha ridotto significativamente i livelli plasmatici a digiuno del glucosio e dei trigliceridi, che erano aumentati sia nei ratti NAFLD che nei ratti NASH, e ha ripristinato i livelli fisiologici di AST, ALP e bilirubina totale, confermando la sua azione benefica sulla funzione epatica. Abbiamo inoltre dimostrato una riduzione del colesterolo totale nei ratti con NAFLD. È interessante notare che diversi studi preclinici [29] avevano studiato gli effetti delle alghe brune sui livelli lipidici, ed analizzato il possibile impatto sulla biosintesi del colesterolo. È stato dimostrato peraltro che le alghe brune aumentano l'escrezione del colesterolo nelle feci, a causa della capacità dei composti algali di legarsi al colesterolo alimentare [29]. Nonostante non si sia ancora compreso del tutto il meccanismo di questo effetto di riduzione del colesterolo, si ritiene che i composti coinvolti in questo effetto siano i carotenoidi, i polisaccaridi e i florotannini, e, più recentemente, le proteine e i peptidi presenti nelle alghe brune. Sono necessari ulteriori studi per capire il meccanismo dell'attività di riduzione sul colesterolo plasmatico, che nelle nostre condizioni sperimentali si è potuto osservare solo nei ratti NAFLD.

Pochi studi hanno analizzato il profilo di sicurezza dei florotannini algali; tuttavia, tutti concordano sulla bassa tossicità che hanno per le colture cellulari, gli invertebrati, gli animali e gli esseri umani [30]. In questo studio, la valutazione della potenziale epatotossicità rilevata in ratti sani trattati quotidianamente con la formula nutraceutica per 12 settimane non ha evidenziato alcun segnale di tossicità sul tessuto epatico, confermando così la sicurezza di un trattamento prolungato.

Per valutare l'effetto di questo nutraceutico sulla steatosi epatica, si è effettuato un esame istologica del tessuto epatico tramite la colorazione ORO, che evidenzia le goccioline lipidiche presenti nel parenchima epatico. Si è osservato un aumento del numero e dimensioni delle goccioline lipidiche negli animali sia NAFLD che NASH

rispetto al gruppo di controllo. Nei fegati NASH erano visibili negli epatociti vescicole lipidiche più grandi, e questo accumulo era efficacemente contrastato dal trattamento. Abbiamo valutato il suo effetto sull'espressione genica coinvolta nel metabolismo lipidico e nella lipogenesi de novo, che sono due noti percorsi di disregolazione implicati nello sviluppo e nella progressione della NAFLD [31]. In particolare, la somministrazione del nutraceutico ha sottoregolato significativamente i DGAT1 e DGAT2 negli animali NAFLD e NASH, ripristinando i livelli fisiologici. Questi due enzimi contribuiscono alla sintesi dei trigliceridi negli adipociti e rivestono un ruolo importante nella formazione delle goccioline lipidiche. In particolare, il DGAT-2 si trova in prossimità della superficie delle goccioline lipidiche e consente il trasporto dei trigliceridi dal sito della sintesi alle goccioline, dove si accumulano e portano alla loro espansione [32]. Inoltre, il trattamento ha ridotto significativamente l'espressione genica di FASN e di SREBP1, che erano sovraregolati nella steatosi. L'enzima FASN è fondamentale nel percorso della lipogenesi endogena e catalizza principalmente la sintesi degli acidi grassi a catena lunga [33], mentre gli SREBP regolano l'omeostasi lipidica controllando la trascrizione di molti enzimi coinvolti nella sintesi del colesterolo endogeno, degli acidi grassi, dei trigliceridi e dei fosfolipidi [34]. Per riassumere, i nostri risultati indicano che nella steatosi l'espressione epatica di DGAT-1, DGAT-2, FASN, e SREBP-1 è aumentata in modo significativo, e questo incremento è stato contrastato dal trattamento con la formulazione nutraceutica. Un effetto simile è stato osservato sulla proteina adipofillina, chiamata anche PLIN-2, che rappresenta una delle cinque proteine della famiglia della perilipina ed è collegata alla differenziazione degli adipociti. Queste proteine sono espresse negli epatociti e sono associate alla formazione, stabilizzazione e degradazione delle goccioline lipidiche [35,36]. La PLIN-2 è sovraregolata negli animali e pazienti NAFLD e promuove l'accumulo di trigliceridi, inibisce l'ossidazione dei FFA, ed altera la tolleranza al glucosio [35]. La PLIN-2 è sovraregolata nella NAFLD e NASH, e la formulazione nutraceutica è riuscita a ridurre l'espressione proteica della PLIN-2, in particolar modo nel modello NASH.

Un altro processo coinvolto nella progressione della steatosi in NASH ed in patologie epatiche più gravi è l'aumento dello stress ossidativo e l'infiammazione [37]. È stato quindi dimostrato che l'aumento del grasso ectopico e del tessuto adiposo viscerale promuove la secrezione di alcuni marcatori pro-infiammatori, tra cui IL-6, TNF- α e PCR [38]. Uno studio di Wang et al. ha dimostrato che il cromo riduce il contenuto di citochine pro-infiammatorie, quali ad esempio IL-1 β e TNF- α , in un modello murino di steatosi epatica [39]. Anche molti altri studi hanno dimostrato che l'integrazione con questo elemento essenziale è utile per ridurre l'infiammazione e la lesione epatica, e per esercitare attività ipoglicemiche e ipolipidemiche in pazienti e modelli NAFLD [40,41]. Inoltre, molti studi hanno dimostrato le proprietà antinfiammatorie dei florotannini algali contenuti anche in questo fitocomplesso algale [42–45], così come la loro attività antiossidante [46–48]. L'estratto di *A. nodosum* ha mostrato un effetto antinfiammatorio sulle cellule Caco-2 stimulate da TNF- α , sottoregolando le chemochine TNF- α , IL-1 β , IL-8, e IL-18 [49].

Per analizzare l'effetto della nostra formulazione nutraceutica sulla infiammazione del tessuto epatico associata alla NAFLD, si è misurato nel plasma dei ratti un ristretto pannello di citochine pro-infiammatorie. IL-6 è una citochina pro-infiammatoria, il cui rilascio nel sistema circolatorio è stato collegato all'obesità e allo sviluppo del diabete di tipo 2 e per questo motivo è stata causalmente collegata alle malattie metaboliche [50]. TNF- α è un mediatore chiave dell'infiammazione sistemica sovraespresso nell'obesità, ed è considerato un mediatore di insulino resistenza [51]. Per questa citochina è stato inoltre ipotizzato un ruolo causale di grande contributo allo sviluppo della NASH [52]. La CRP è una proteina prodotta principalmente dal fegato associata ad una fase infiammatoria acuta. La sua induzione trascrizionale avviene negli epatociti in risposta all'aumento dei livelli sierici delle altre citochine infiammatorie, tra cui IL-6 e TNF- α [53]. Abbiamo mostrato come il trattamento riduca i livelli plasmatici di questi marcatori infiammatori, che erano aumentati in modo significativo negli animali NAFLD e NASH. Oltre all'infiammazione sistemica, l'infiammazione locale nel fegato è stata associata alla transizione NAFLD–NASH. Il MPO è un enzima che appartiene alla famiglia delle perossidasi, espresso abbondantemente nelle cellule immunitarie come ad esempio i neutrofili. Queste cellule

di norma si degranulano nel sito di infezione per contrastare i diversi tipi di patologie indotte dai microbi. Nel fegato, i neutrofili aumentano lo stress ossidativo intracellulare durante la lesione epatica. Sebbene la MPO sia tradizionalmente considerata come un marcatore di neutrofili, andrebbe notato che anche le cellule stellate epatiche e le cellule di Kupffer esprimono la MPO [21]. Nei ratti NAFLD/NASH abbiamo osservato un forte incremento, contrastato dal trattamento, dell'espressione della MPO nel tessuto epatico, il che suggerisce che la sua attività riduca i processi infiammatori e il reclutamento dei neutrofili. In sintesi, è probabile che la formulazione nutraceutica riduca l'infiammazione epatica e normalizzi il metabolismo e l'immagazzinamento lipidico in entrambi i modelli NAFLD e NASH.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che le alterazioni nella sintesi, nel metabolismo e nel trasporto dei lipidi epatici osservati nei ratti NAFLD e NASH, nonché la presenza di infiammazione epatica, sono ridotte efficacemente dal trattamento, il quale inibisce i due enzimi digestivi α -amilasi and α -glucosidasi, con la conseguente riduzione della digestione ed assorbimento dei carboidrati. Gli animali trattati hanno inoltre mostrato effetti benefici nel fegato, grazie alla riduzione dell'infiammazione e dell'accumulo di lipidi, inibendo in tal modo i meccanismi coinvolti nella progressione della NAFLD e della NASH.

4. Materiali e Metodi

4.1. Valutazione In Vitro dell'Inibizione degli Enzimi Digestivi

Il prodotto nutraceutico commerciale contenente l'estratto algale di *A. nodosum* e di *F. vesiculosus* (20% polifenoli) e cromo picolinato (0,26 mg/g estratto algale) utilizzato in questo studio è stato fornito da Aesculapius. La sua attività inibitoria in vitro su α -amilasi e α -glucosidasi è stata valutata come descritto in precedenza [15]. La formulazione è stata valutata alle concentrazioni crescenti di 0,6, 1,5, 3, 6, 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ per α -amilasi e di 0,6, 0,3, 0,15, 0,10, 0,06 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ per α -glucosidasi. L'inibizione sugli enzimi α -lipasi è stata valutata come segue usando il test basato sul p-nitrofenilbutirrato (PNPB) alle concentrazioni crescenti (1, 2,5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). In breve, l' α -lipasi (Sigma Aldrich) è stato dissolto (0,3 mg/mL) a pH 7,2, in un tampone contenente 100 mM di Tampone Fosfato Salino (PBS), 150 mM di cloruro di sodio, e 0,5% di Triton-X100. Un totale di 25 μL per ogni concentrazione algale è stato incubato in una piastra a 96 pozzetti con 50 μL di soluzione di α -lipasi, 100 μL di PBS, e 25 μL di soluzione PNPB. La piastra è stata incubata per 30 min a 37 °C e il p-nitrofenolo formato, proporzionale all'attività dell' α -lipasi, è stato quantificato misurando l'assorbanza a 400 nm con un lettore multipiastra (Viktor Nivo, Perkin Elmer, Milano, Italia). Per ogni concentrazione di estratto è stato eseguito un campione vuoto senza α -lipasi, mentre la massima attività dell' α -lipasi è stata misurata aggiungendo 25 μL di PBS al posto dell'estratto. La % di inibizione è stata calcolata con la seguente formula:

$$\% \text{ di inibizione} = \frac{(\text{campione Abs} - \text{Abs vuoto})}{\text{controllo Abs}} \times 100$$

4.2. Modelli Animali di NAFLD/NASH

Tutti i protocolli sperimentali sono stati effettuati con la previa autorizzazione dell'Animal Welfare Body (OPBA, Organismo preposto al benessere degli animali) dell'Università di Padova e del Ministero della salute (Aut. No. 101/2020-PR del 17 febbraio 2020) e in conformità con la legislazione nazionale (Decreto Legislativo 26/2014) e le linee guida europee (Direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali usati per scopi scientifici) per la gestione ed utilizzo degli animali da esperimenti. Ratti maschi Sprague Dawley (6 \pm 2 settimane; Charles Rivers, Italia, n = 10 per gruppo) sono stati ospitati in ambiente con temperatura e umidità controllate con ciclo giorno/notte di 12 h e nutriti con dieta standard o con dieta occidentale (dieta ricca di grassi e fruttosio: HFHF): dieta ad alto contenuto di grassi (60% Kcal dai grassi, 23,5% dalle proteine, 18,4% dai carboidrati; Altromin, Lage, Germania) più 30% di fruttosio nell'acqua potabile. L'accesso agli alimenti e all'acqua era concesso ad libitum per la durata dello studio, tranne che prima del rilevamento della curva glicemica postprandiale.

I ratti sono stati randomizzati in gruppi sperimentali (Figura 10) e tenuti quattro per gabbia nella stessa stanza e dallo stesso staff qualificato. Durante la somministrazione della dieta HFHF per 12 o 18 settimane, i ratti hanno ricevuto giornalmente tramite sonda intragastrica l'estratto algale (dose 7,5 mg/kg·bw) o il veicolo.

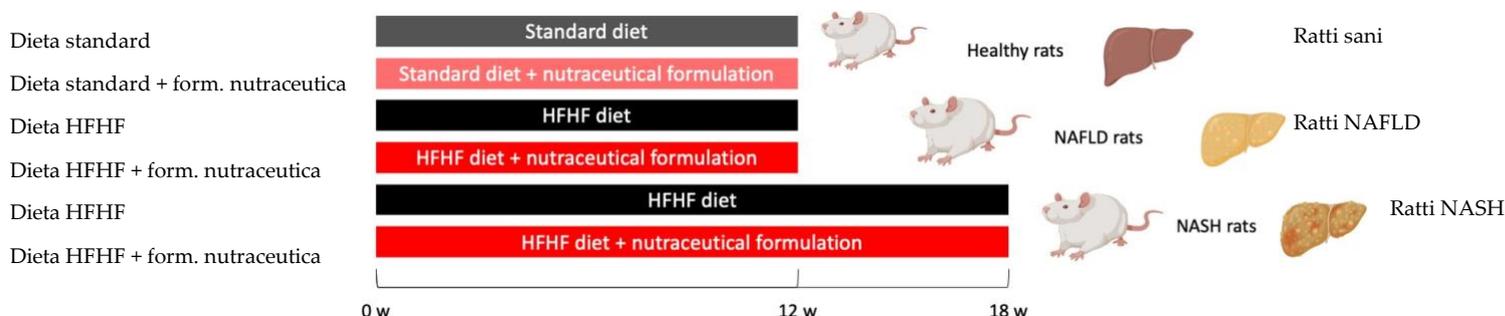


Figura 10. Schema di studio usato per la randomizzazione e il trattamento dei ratti.

4.3. Valori Glicemici Postprandiali, Analisi Biochimica e Istologica

Al termine del trattamento di 12 o 18 settimane, i ratti sono stati tenuti a digiuno per 12 ore e quindi nutriti con una soluzione di amido e olio di girasole al 50%–50% come descritto in precedenza [15]. I valori glicemici sono stati misurati a 30, 60, 120, e 360 min tramite un glucometro (BG Star, MDSS GmbH, Hannover, Germania). Per valutare il grado di steatosi, sono stati dissezionati i fegati e si è effettuato esame istologico tramite colorazione Oil Red O (Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Germania). Al momento del sacrificio, sono stati raccolti campioni di plasma per misurare l'alanina aminotransferasi (ALT), la fosfatasi alcalina (ALP), e la bilirubina totale, i trigliceridi, il colesterolo totale e la glicemia con i metodi di laboratorio standard. La quantificazione dei trigliceridi nel tessuto epatico è stata realizzata tramite un kit disponibile in commercio (ABX Pentra Triglycerides CP, Roma, Italia), seguendo le istruzioni del produttore.

4.4. Analisi dell'Espressione Genica dei Tessuti Epatici

Il tessuto epatico è stato estratto per mezzo del kit commerciale SV Total Isolation System (Promega Corporation, Madison, WI, USA), come descritto precedentemente [54]. Si è effettuata una One-step qRT-PCR utilizzando il kit One Step SYBR PrimeScript RT-PCR II (Takara, Giappone) per mezzo del CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad, Hercules, CA, USA), ed applicando il seguente programma termico: 15 min a 50 °C e 2 min a 95 °C, quindi 40 cicli di 15 s a 95 °C e 60 s a 60°. La tabella 3 riporta le sequenze dei primer, designate per mezzo del Primer-BLAST (NCBI, NIH), e come gene housekeeping si è utilizzata la β -actina. Si è utilizzato il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ per quantificare la relativa espressione genica.

Tabella 3. Sequenze dei primer utilizzate nello studio.

Gene	Primer Forward (5'–3')	Primer Reverse (5'–3')
DGAT-1	TCCTGAATTGGTGGTGGTG	GAAACAGAGACACCACCTGGA
DGAT-2	GCAGCGAGAACAAGAATAAAGGA	CCACCTTGGATCTGTTGAGC
GPAT-4	TGTGGGACGGTGGATTGAAG	GCTCCGGTCCTCATGGTTAC
FASN	GCATTTCACAACCCCAACC	AACGAGTTGATGCCACGAT
SREBP-1	CATGGACGAGCTACCCTTCG	GGGCATCAAATAGGCCAGGG
SREBP-2	CGAACTGGCGATGGATGAGA	TCTCCACTTGATTGCTGACA
β -actin	GCCACCAGTTCGCCATGGA	TTCTGACCCATACCCACCAT

4.5. Quantificazione Proteica di IL-6, TNF- α , e CRP nei Campioni Plasmatici

I livelli plasmatici di IL-6 e TNF- α sono stati misurati usando la tecnologia Luminex xMAP® (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) e il kit “MILLIPLEX® Rat Metabolic Magnetic Bead Panel” (Millipore, Burlington, MA, USA). Ogni misurazione è stata effettuata in duplice copia. Le analisi quantitative sono state compiute con il software Luminex xPONENT 3.1 (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) usando un adattamento per curva logistica a cinque parametri.

La quantificazione della CRP nei campioni di plasma è stata effettuata tramite il kit Rat ELISA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). I campioni sono stati quantificati misurando l'assorbanza a 450 nm con il lettore multipiastra Viktor Nivo (Perkin Elmer). Il valore della CRP nei campioni plasmatici è stato calcolato tramite regressione non lineare utilizzando una curva di calibrazione ottenuta con gli standard di CRP forniti dal kit.

4.6. Analisi Immunoistochimica di PLIN-2 e MPO nei Tessuti Epatici

Una piccola porzione di tessuto epatico è stata inclusa in paraffina per l'analisi immunoistochimica (IHC) di PLIN-2 e delle proteine mieloperossidasi. Sono state quindi tagliate lamine da 5 μ m con un microtomo MR 2258 (Histo-Line Laboratories, Pantigliate, Milano, Italia). Si è effettuato il recupero dell'antigene in tampone citrato di sodio pH 6 a 63 °C. Successivamente si è proceduto alla permeabilizzazione delle lamine di tessuto con Triton X100 allo 0,2% in PBS. Si è usato un totale del 5% di FBS come tampone di saturazione per 30 min. Sono stati usati i seguenti anticorpi primari: coniglio anti-PLIN-2 (ABclonal, Woburn, MA, USA) e coniglio anti-MPO (Abcam, Cambridge, UK). È stato usato l'anticorpo secondario anti-coniglio policlonale coniugato con HRP IGg (KPL, Seracare, Milford, MA, USA). Per colorazione di contrasto, si è usata l'ematossilina per i nuclei. Le immagini IHC sono state acquisite per mezzo di microscopio ottico (Optika, Ponteranica, Bergamo, Italy) ed analizzate tramite software ImageJ (ver. 1.52t, NIH, Bethesda, MD, USA).

4.7. Analisi Statistiche

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.; San Diego, CA, USA) ver. 8.0. per mezzo del test *t* di Student, del test ANOVA a una e due vie, seguiti dagli opportuni test post-hoc, fissando la significatività statistica a $p < 0,05$. I dati sono riportati come medie \pm S.E.M.

5. Conclusioni

Questo studio ha confermato l'efficacia contro la steatosi epatica di un prodotto nutraceutico con effetto inibitorio sui due enzimi digestivi α -amilasi e α -glucosidasi, contenente un fitocomplesso estratto dalle alghe brune in cui sono presenti polisaccaridi, florotannini ed altri polifenoli, e solfolipidi. L'effetto sull'accumulo dei lipidi è accompagnato dalla modulazione dei percorsi metabolici ed infiammatori, particolarmente evidenti nel fegato dei ratti NASH. Non è stato rilevato nello studio alcun segnale di tossicità collegato al trattamento.

In conclusione, i dati attualmente disponibili dimostrano che questo prodotto rappresenta un valido supporto nutraceutico per il controllo e trattamento della steatosi epatica, offrendo supporto alla progettazione di una sperimentazione clinica volta a confermare i nostri risultati anche nei pazienti NAFLD e NASH.

Materiali Supplementari: Le seguenti informazioni di supporto possono essere scaricate da: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/md20090572/s1>, Figura S1: DI-HRMS spettro, in modalità di ionizzazione positiva elettrospray, dell'estratto acquoso del prodotto nutraceutico.; Figura S2: Spettro DI- HRMS (zoom nel range 500-1100 m/z), in modalità di ionizzazione negativa elettrospray, dell'estratto metanolico del prodotto nutraceutico. Figura S3: Spettri MS/MS delle analogie SQDG rilevate. I dati sono stati acquisiti fissando una energia di collisione normalizzata (NCE) di 40 in modalità HCD. Figura S4: spettri MS/MS ottenuti per a) nobiletina e b) niranina I dati sono stati acquisiti fissando una energia di collisione normalizzata (NCE) di 30 in modalità HCD.

Contributi dell'Autore: Concettualizzazione, S.D.M.; metodologia, D.G., D.A., S.S., M.R.; analisi formale, S.D.M., M.G.; indagini, D.G., K.S., I.Z., M.C. (Martina Colognesi), S.S., A.Z., M.R.; cura dei dati, D.G., S.D.M., M.R.; stesura—elaborazione progetto iniziale, D.G.; stesura—revisione e editing,

M.C. (Maria Carrara); acquisizione fondi, S.D.M. Tutti gli autori hanno letto e confermato la versione pubblicata del manoscritto.

Finanziamento: Questa ricerca è stata sostenuta da Aesculapius Farmaceutici S.r.L, Brescia, Italia.

Dichiarazione dell'Institutional Review Board: Il protocollo dello studio sugli animali è stato approvato dall'Institutional Review Board (Organismo preposto al benessere degli animali, OPBA) dell'Università di Padova e dal Ministero Italiano della Salute (Aut. no 101/2020, approvata il 17 febbraio 2020)

Dichiarazione di Consenso Informato: Non applicabile.

Dichiarazione di Disponibilità dei Dati: i dati non elaborati sono disponibili presso l'autore corrispondente dietro richiesta motivata.

Ringraziamenti: Ringraziamo Mauro Berto e Alessia Bissaco per l'ottimo supporto sperimentale e Simone Teso per il suo aiuto nell'interpretazione delle analisi statistiche.

Conflitto di Interessi: Il finanziatore (Aesculapius Farmaceutici S.r.L.) non ha avuto alcun ruolo nella progettazione dello studio; nella raccolta, analisi od interpretazione dei dati; nella redazione del manoscritto o nella decisione di pubblicare i risultati.

Riferimenti

1. Asrih, M.; Jornayvaz, F.R. Metabolic Syndrome and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Is Insulin Resistance the Link? *Mol. Cell. Endocrinol.* **2015**, *418*, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.02.018>.
2. Burra, P.; Becchetti, C.; Germani, G. NAFLD and Liver Transplantation: Disease Burden, Current Management and Future Challenges. *JHEP Rep.* **2020**, *2*, 100192. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100192>.
3. Del Campo, J.; Gallego-Durán, R.; Gallego, P.; Grande, L. Genetic and Epigenetic Regulation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 911. <https://doi.org/10.3390/ijms19030911>.
4. Machado, M.V. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: What the Clinician Needs to Know. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 12956–12980. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i36.12956>.
5. Gluchowski, N.L.; Becuwe, M.; Walther, T.C.; Farese, R.V. Lipid Droplets and Liver Disease: From Basic Biology to Clinical Implications. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 343–355. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.32>.
6. Cobbina, E.; Akhlaghi, F. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)—Pathogenesis, Classification, and Effect on Drug Metabolizing Enzymes and Transporters. *Drug Metab. Rev.* **2017**, *49*, 197–211. <https://doi.org/10.1080/03602532.2017.1293683>.
7. Gabbia, D.; De Martin, S. Brown Seaweeds for the Management of Metabolic Syndrome and Associated Diseases. *Molecules* **2020**, *25*, 4182. <https://doi.org/10.3390/molecules25184182>.
8. Keleszade, E.; Patterson, M.; Trangmar, S.; Guinan, K.J.; Costabile, A. Clinical Efficacy of Brown Seaweeds *Ascophyllum Nodosum* and *Fucus Vesiculosus* in the Prevention or Delay Progression of the Metabolic Syndrome: A Review of Clinical Trials. *Molecules* **2021**, *26*, 714. <https://doi.org/10.3390/molecules26030714>.
9. Cefalu, W.T.; Hu, F.B. Role of Chromium in Human Health and in Diabetes. *Diabetes Care* **2004**, *27*, 2741–2751. <https://doi.org/10.2337/diacare.27.11.2741>.
10. Wang, S.; Wang, J.; Zhang, X.; Hu, L.; Fang, Z.; Huang, Z.; Shi, P. Trivalent Chromium Alleviates Oleic Acid Induced Steatosis in SMMC-7721 Cells by Decreasing Fatty Acid Uptake and Triglyceride Synthesis. *Biometals* **2016**, *29*, 881–892. <https://doi.org/10.1007/s10534-016-9960-2>.
11. Kooshki, F.; Moradi, F.; Karimi, A.; Niazkar, H.R.; Khoshbaten, M.; Maleki, V.; Pourghassem Gargari, B. Chromium Picolinate Balances the Metabolic and Clinical Markers in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, *33*, 1298–1306. <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000001830>.
12. Chen, W.-Y.; Chen, C.-J.; Liu, C.-H.; Mao, F.C. Chromium Attenuates High-Fat Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in KK/HIJ Mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *397*, 459–464. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.05.129>.
13. Matt, G.E.; Quintana, P.J.E.; Hoh, E.; Dodder, N.G.; Mahabee-Gittens, E.M.; Padilla, S.; Markman, L.; Watanabe, K. Tobacco Smoke Is a Likely Source of Lead and Cadmium in Settled House Dust. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2021**, *63*, 126656. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126656>.
14. Carreres, L.; Jilková, Z.M.; Vial, G.; Marche, P.N.; Decaens, T.; Lerat, H. Modeling Diet-Induced NAFLD and NASH in Rats: A Comprehensive Review. *Biomedicines* **2021**, *9*, 378. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9040378>.
15. Gabbia, D.; Dall'Acqua, S.; Di Gangi, I.M.; Bogianni, S.; Caputi, V.; Albertoni, L.; Marsilio, I.; Paccagnella, N.; Carrara, M.; Giron, M.C.; et al. The Phytocomplex from *Fucus Vesiculosus* and *Ascophyllum Nodosum* Controls Postprandial Plasma Glucose Levels: An In Vitro and In Vivo Study in a Mouse Model of NASH. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 41. <https://doi.org/10.3390/md15020041>.
16. Van Herck, M.; Vonghia, L.; Francque, S. Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease—A Starter's Guide. *Nutrients* **2017**, *9*, 1072. <https://doi.org/10.3390/nu9101072>.
17. De Martin, S.; Gabbia, D.; Carrara, M.; Ferri, N. The Brown Algae *Fucus Vesiculosus* and *Ascophyllum Nodosum* Reduce Metabolic Syndrome Risk Factors: A Clinical Study. *Nat. Prod. Commun.* **2018**, *13*, 1691–1694. <https://doi.org/10.1177%2F1934578X1801301228>.

18. Nicolucci, A.; Rossi, M.C.; Petrelli, M. Effectiveness of *Ascophyllum Nodosum* and *Fucus Vesiculosus* on Metabolic Syndrome Components: A Real-World, Observational Study. *J. Diabetes Res.* **2021**, *2021*, 3389316. <https://doi.org/10.1155/2021/3389316>.
19. Derosa, G.; Cicero, A.F.G.; D'Angelo, A.; Maffioli, P. *Ascophyllum Nodosum* and *Fucus Vesiculosus* on Glycemic Status and on Endothelial Damage Markers in Dysglycemic Patients. *Phytother. Res.* **2019**, *33*, 791–797. <https://doi.org/10.1002/ptr.6272>.
20. Colognesi, M.; Gabbia, D.; De Martin, S. Depression and Cognitive Impairment-Extrahepatic Manifestations of NAFLD and NASH. *Biomedicines* **2020**, *8*, 229. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8070229>.
21. Khan, A.; Alsahli, M.; Rahmani, A. Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. *Med. Sci.* **2018**, *6*, 33. <https://doi.org/10.3390/medsci6020033>.
22. Okumura, T. Role of Lipid Droplet Proteins in Liver Steatosis. *J. Physiol. Biochem.* **2011**, *67*, 629–636. <https://doi.org/10.1007/s13105-011-0110-6>.
23. Hadizadeh, F.; Faghihmani, E.; Adibi, P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Diagnostic Biomarkers. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* **2017**, *8*, 11–26. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v8.i2.11>.
24. Gabbia, D.; Saponaro, M.; Sarcognato, S.; Guido, M.; Ferri, N.; Carrara, M.; De Martin, S. *Fucus Vesiculosus* and *Ascophyllum Nodosum* Ameliorate Liver Function by Reducing Diet-Induced Steatosis in Rats. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 62. <https://doi.org/10.3390/md18010062>.
25. Kim, K.Y.; Nguyen, T.H.; Kurihara, H.; Kim, S.M. α -Glucosidase Inhibitory Activity of Bromophenol Purified from the Red Alga *Polysiphonia Lancifolia*. *J. Food Sci.* **2010**, *75*, H145–H150. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01629.x>.
26. Sales, P.M.; Souza, P.M.; Simeoni, L.A.; Magalhães, P.O.; Silveira, D. α -Amylase Inhibitors: A Review of Raw Material and Isolated Compounds from Plant Source. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2012**, *15*, 141–183. <https://doi.org/10.18433/j35S3K>.
27. Dechakhamphu, A.; Wongchum, N. Screening for Anti-Pancreatic Lipase Properties of 28 Traditional Thai Medicinal Herbs. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2015**, *5*, 1042–1045. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.012>.
28. Pozharitskaya, O.N.; Obluchinskaya, E.D.; Shikov, A.N. Mechanisms of Bioactivities of Fucoïdan from the Brown Seaweed *Fucus Vesiculosus* L. of the Barents Sea. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 275. <https://doi.org/10.3390/md18050275>.
29. André, R.; Pacheco, R.; Bourbon, M.; Serralheiro, M.L. Brown Algae Potential as a Functional Food against Hypercholesterolemia: Review. *Foods* **2021**, *10*, 234. <https://doi.org/10.3390/foods10020234>.
30. Negara, B.F.S.P.; Sohn, J.H.; Kim, J.-S.; Choi, J.-S. Effects of Phlorotannins on Organisms: Focus on the Safety, Toxicity, and Availability of Phlorotannins. *Foods* **2021**, *10*, 452. <https://doi.org/10.3390/foods10020452>.
31. Gabbia, D.; Roverso, M.; Guido, M.; Sacchi, D.; Scaffidi, M.; Carrara, M.; Orso, G.; Russo, F.P.; Floreani, A.; Bogianni, S.; et al. Western Diet-Induced Metabolic Alterations Affect Circulating Markers of Liver Function before the Development of Steatosis. *Nutrients* **2019**, *11*, 1602. <https://doi.org/10.3390/nu11071602>.
32. Bhatt-Wessel, B.; Jordan, T.W.; Miller, J.H.; Peng, L. Role of DGAT Enzymes in Triacylglycerol Metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **2018**, *655*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.08.001>.
33. Schroeder, B.; Vander Steen, T.; Espinoza, I.; Venkatapoorana, C.M.K.; Hu, Z.; Silva, F.M.; Regan, K.; Cuyàs, E.; Meng, X.W.; Verdura, S.; et al. Fatty Acid Synthase (FASN) Regulates the Mitochondrial Priming of Cancer Cells. *Cell Death Dis.* **2021**, *12*, 977. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04262-x>.
34. Eberlé, D.; Hegarty, B.; Bossard, P.; Ferré, P.; Foufelle, F. SREBP Transcription Factors: Master Regulators of Lipid Homeostasis. *Biochimie* **2004**, *86*, 839–848. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.018>.
35. Carr, R.M.; Ahima, R.S. Pathophysiology of Lipid Droplet Proteins in Liver Diseases. *Exp. Cell Res.* **2016**, *340*, 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.021>.
36. Pawella, L.M.; Hashani, M.; Eiteneuer, E.; Renner, M.; Bartenschlager, R.; Schirmacher, P.; Straub, B.K. Perilipin Discerns Chronic from Acute Hepatocellular Steatosis. *J. Hepatol.* **2014**, *60*, 633–642. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.11.007>.
37. Gabbia, D.; Cannella, L.; De Martin, S. The Role of Oxidative Stress in NAFLD–NASH–HCC Transition—Focus on NADPH Oxidases. *Biomedicines* **2021**, *9*, 687. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9060687>.
38. Ramírez-Moreno, E.; Arias-Rico, J.; Jiménez-Sánchez, R.C.; Estrada-Luna, D.; Jiménez-Osorio, A.S.; Zafra-Rojas, Q.Y.; Ariza-Ortega, J.A.; Flores-Chávez, O.R.; Morales-Castillejos, L.; Sandoval-Gallegos, E.M. Role of Bioactive Compounds in Obesity: Metabolic Mechanism Focused on Inflammation. *Foods* **2022**, *11*, 1232. <https://doi.org/10.3390/foods11091232>.
39. Wang, S.; Wang, J.; Liu, Y.; Li, H.; Wang, Q.; Huang, Z.; Liu, W.; Shi, P. Trivalent Chromium Supplementation Ameliorates Oleic Acid-Induced Hepatic Steatosis in Mice. *Biol. Trace Elem. Res.* **2019**, *187*, 192–201. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1368-0>.
40. Sahin, K.; Tuzcu, M.; Orhan, C.; Sahin, N.; Kucuk, O.; Ozercan, I.H.; Juturu, V.; Komorowski, J.R. Anti-Diabetic Activity of Chromium Picolinate and Biotin in Rats with Type 2 Diabetes Induced by High-Fat Diet and Streptozotocin. *Br. J. Nutr.* **2013**, *110*, 197–205. <https://doi.org/10.1017/S0007114512004850>.
41. Martino, F.; Puddu, P.E.; Pannarale, G.; Colantoni, C.; Martino, E.; Niglio, T.; Zanoni, C.; Barillà, F. Low Dose Chromium-Polynicotinate or Policosanol Is Effective in Hypercholesterolemic Children Only in Combination with Glucomannan. *Atherosclerosis* **2013**, *228*, 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.02.005>.
42. Kim, A.-R.; Shin, T.-S.; Lee, M.-S.; Park, J.-Y.; Park, K.-E.; Yoon, N.-Y.; Kim, J.-S.; Choi, J.-S.; Jang, B.-C.; Byun, D.-S.; et al. Isolation and Identification of Phlorotannins from *Ecklonia Stolonifera* with Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3483–3489. <https://doi.org/10.1021/jf900820x>.

43. Wijesinghe, W.A.J.P.; Ahn, G.; Lee, W.-W.; Kang, M.-C.; Kim, E.-A.; Jeon, Y.-J. Anti-Inflammatory Activity of Phlorotannin-Rich Fermented Ecklonia Cava Processing by-Product Extract in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages. *J. Appl. Phycol.* **2013**, *25*, 1207–1213. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9939-5>.
44. Dong, X.; Bai, Y.; Xu, Z.; Shi, Y.; Sun, Y.; Janaswamy, S.; Yu, C.; Qi, H. Phlorotannins from Undaria Pinnatifida Sporophyll: Extraction, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 434. <https://doi.org/10.3390/md17080434>.
45. Wang, Y.; Wang, K.; Fu, J. HDAC6 Mediates Macrophage INOS Expression and Excessive Nitric Oxide Production in the Blood During Endotoxemia. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1893. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01893>.
46. Ahmadinejad, F.; Geir Møller, S.; Hashemzadeh-Chaleshtori, M.; Bidkhor, G.; Jami, M.-S. Molecular Mechanisms behind Free Radical Scavengers Function against Oxidative Stress. *Antioxidants* **2017**, *6*, 51. <https://doi.org/10.3390/antiox6030051>.
47. Han, J.; Jiang, Y.; Li, Z.; Kravchenko, V.V.; Ulevitch, R.J. Activation of the Transcription Factor MEF2C by the MAP Kinase P38 in Inflammation. *Nature* **1997**, *386*, 296–299. <https://doi.org/10.1038/386296a0>.
48. Besednova, N.N.; Andryukov, B.G.; Zaporozhets, T.S.; Kuznetsova, T.A.; Kryzhanovsky, S.P.; Ermakova, S.P.; Galkina, I.V.; Shchelkanov, M.Y. Molecular Targets of Brown Algae Phlorotannins for the Therapy of Inflammatory Processes of Various Origins. *Mar. Drugs* **2022**, *20*, 243. <https://doi.org/10.3390/md20040243>.
49. Bahar, B.; O'Doherty, J.V.; Smyth, T.J.; Sweeney, T. A Comparison of the Effects of an Ascophyllum Nodosum Ethanol Extract and Its Molecular Weight Fractions on the Inflammatory Immune Gene Expression In-Vitro and Ex-Vivo. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2016**, *37*, 276–285. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.07.027>.
50. Schmidt-Arras, D.; Rose-John, S. IL-6 Pathway in the Liver: From Physiopathology to Therapy. *J. Hepatol.* **2016**, *64*, 1403–1415. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.004>.
51. Dandona, P.; Aljada, A.; Chaudhuri, A.; Mohanty, P.; Garg, R. Metabolic Syndrome: A Comprehensive Perspective Based on Interactions between Obesity, Diabetes, and Inflammation. *Circulation* **2005**, *111*, 1448–1454. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000158483.13093.9D>.
52. Lu, S.; Wang, Y.; Liu, J. Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Nonalcoholic Steatohepatitis and Targeted Therapies. *J. Genet. Genom.* **2022**, *49*, 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.09.009>.
53. Sproston, N.R.; Ashworth, J.J. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 754. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00754>.
54. Gabbia, D.; Dalla Pozza, A.; Albertoni, L.; Lazzari, R.; Zigiotta, G.; Carrara, M.; Baldo, V.; Baldovin, T.; Floreani, A.; De Martin, S. Pregnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor Modulate Differently CYP3A-Mediated Metabolism in Early- and Late-Stage Cholestasis. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 7519–7530. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i42.7519>.