

UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE



DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in  
BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA

---

**RUOLO GLICOSAMINOGLICANI (GAG) DEL LATTE CONTRO IL DANNO  
OSSIDATIVO IN CELLULE INTESTINALI INDOTTO DA METILGLIOSSALE:  
CONFRONTO TRA LATTE UMANO E LATTE VACCINO**

**ROLE OF MILK GLYCOSAMINOGLYCANS (GAGs) AGAINST OXIDATIVE DAMAGE  
IN INTESTINAL CELLS INDUCED BY METHYLGLYOXAL: COMPARISON  
BETWEEN HUMAN AND COW'S MILK**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Laura Giorgi

Relatrice:

Chiar.ma Prof. Tiziana Bacchetti

Correlatrice:

Dott.ssa Camilla Morresi

---

Sessione Luglio 2024

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

# INDICE

<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>4</b>
<b>1 Composizione e funzione fisiologica dei GAG nel latte: confronto tra latte materno e latte vaccino</b>	<b>7</b>
1.1 Il latte umano	7
1.2 Il latte vaccino e il suo utilizzo nelle formule per lattanti	15
1.3 I GAG del latte	20
1.3.1 I GAG: confronto tra latte umano e latte vaccino	23
1.3.2 I GAG del latte: ruoli fisiologici nel tratto gastrointestinale	27
<b>2 Ruolo fisiopatologico della glico-ossidazione a livello intestinale</b>	<b>34</b>
2.1 MGO e i composti di glicazione avanzata	34
2.2 La glicazione non enzimatica	40
2.3 MGO e composti di glicazione avanzata derivati dalla dieta (esogeni)	43
2.4 Effetti fisiopatologici di MGO nell'organismo umano	47
2.5 Effetti fisiopatologici della glico-ossidazione a livello intestinale	53
2.5.1 Effetti dei composti di glicazione avanzata sulla barriera intestinale	54
<b>3 MATERIALI E METODI</b>	<b>58</b>
3.1 Estrazione dei GAG dal latte umano e dal latte vaccino	58
3.2 Modello cell-free: studio dell'effetto protettivo dei GAG da latte materno e latte vaccino sulla glicazione non enzimatica dell'albumina	60

3.3 Studio dell'effetto protettivo dei GAG da latte materno e latte vaccino sul danno indotto da MGO in cellule intestinali Caco-2	63
3.4 Statistica	83
<b>4 RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>84</b>
4.1 Effetto protettivo dei GAG contro la glicazione non enzimatica indotta dal MGO in modello cell-free: confronto tra latte materno e vaccino	86
4.2 Valutazione dell'effetto protettivo dei GAG isolati da latte umano e vaccino contro il danno indotto da MGO in cellule Caco-2	89
4.2.1 Analisi della vitalità cellulare	89
4.2.2 Analisi dello stress ossidativo	91
4.2.3 Analisi della glicazione delle proteine	95
4.2.4 Analisi sull'integrità del monolayer intestinale	99
4.2.5 Analisi espressione delle tight junctions intestinali	103
<b>5 CONCLUSIONE</b>	<b>106</b>
<b>6 BIBLIOGRAFIA</b>	<b>112</b>

## **SCOPO DELLA TESI**

Il latte materno è un elemento fondamentale nella nutrizione neonatale, offrendo un equilibrio ottimale di nutrienti e una protezione immunitaria fondamentale durante i primi stadi della vita. La sua composizione complessa, ricca di macronutrienti, micronutrienti e una vasta gamma di composti bioattivi, è essenziale per promuovere la salute e lo sviluppo del neonato. Il latte vaccino, che costituisce la base predominante degli alimenti destinati all'alimentazione infantile, differisce significativamente dal latte materno in termini di composizione dei macronutrienti e dei composti bioattivi. Nonostante il latte materno sia considerato la migliore fonte di nutrizione infantile, in alcune situazioni l'allattamento al seno può non essere possibile o sufficiente. Pertanto, il latte vaccino viene arricchito con vari ingredienti per avvicinarsi il più possibile alla composizione del latte materno e offrire benefici specifici per la salute del neonato.

Tra i principali composti bioattivi presenti nel latte materno e vaccino, i glicosaminoglicani (GAG) svolgono funzioni cruciali per la protezione contro le infezioni, il supporto del sistema immunitario e lo sviluppo del tratto intestinale. Grazie alle loro proprietà antiossidanti e antinfiammatorie, i GAG del latte possono indurre risposte benefiche contro varie condizioni biologiche, tra cui infiammazione, infezioni batteriche e stress ossidativo. La peculiare composizione dei GAG del latte materno e vaccino è stata caratterizzata ed è

stato dimostrato delle differenze qualitative e quantitative. Le differenze nella composizione e nella struttura dei GAG tra latte umano e vaccino possono influenzare la loro efficacia biologica.

L'attività svolta in questo progetto di tesi si inserisce in questa tematica ed è mirata allo studio degli effetti protettivi esercitati da GAG presenti nel latte materno e vaccino contro il danno glico-ossidativo in cellule intestinali indotto da metilgliossale (MGO). MGO è un dicarbonile altamente reattivo di origine sia endogena che esogena; infatti, la sua sintesi può avvenire sia a livello cellulare che extracellulare, soprattutto in condizioni di iperglicemia oppure può derivare dalla dieta dato che MGO si può formare negli alimenti soprattutto a seguito di processi tecnologici. MGO può reagire con le molecole biologiche e portare alla formazione di prodotti finali della glicazione avanzata (AGE), attraverso una reazione non enzimatica con gruppi amminici presenti nelle proteine, nei lipidi e negli acidi nucleici. La formazione di AGE è associata a numerose disfunzioni cellulari e processi patologici, rendendo cruciale la ricerca di composti che possano contrastare gli effetti deleteri del MGO.

Lo studio degli effetti di MGO a livello intestinale e dei possibili effetti protettivi dei GAG isolati da latte umano e vaccino, ha una rilevanza fisiopatologica, infatti, la mucosa intestinale per la sua continua esposizione alle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e AGE sia endogena che esogena, è soggetta ad un elevato

stress glico-ossidativo che può porre le basi per lo sviluppo di patologie cronico-infiammatorie intestinali (IBD).

Lo studio condotto intende fornire nuove conoscenze sulle proprietà antiossidanti e antiglicanti dei GAG e mira a comprendere le differenze nella capacità dei GAG estratti dal latte materno e dal latte vaccino. I risultati potranno contribuire a migliorare la formulazione delle formule per lattanti e a promuovere la salute intestinale neonatale.

# INTRODUZIONE

## CAPITOLO PRIMO

### **Composizione e funzione fisiologica dei GAG nel latte: confronto tra latte materno e latte vaccino**

#### **1.1 Il latte umano**

Il latte umano è una sostanza biologica complessa, essenziale per il sostentamento e lo sviluppo dei neonati. La sua composizione varia in modo dinamico durante l'allattamento, fornendo un equilibrio ottimale di nutrienti, ormoni, enzimi e fattori di crescita, adattandosi così alle esigenze in continua evoluzione del bambino. Esso è composto da una complessa miscela di componenti, tra cui macronutrienti come proteine, carboidrati e lipidi, oltre a una vasta gamma di micronutrienti, ormoni, enzimi e fattori immunologici.

Il principale costituente del latte è l'acqua, che svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'idratazione ottimale del bambino. La quantità di acqua nel latte materno varia in base alla fase di allattamento: in media, nel latte maturo troviamo circa l'87% di acqua, mentre il colostro, caratterizzato da una consistenza più densa, presenta una percentuale inferiore, oscillante tra il 70% e l'80% (Baker et al. 2023).

I carboidrati principali sono il lattosio, fonte essenziale di energia, e gli oligosaccaridi, noti per le loro proprietà prebiotiche e protettive contro le infezioni. Inizialmente, il colostro presenta una concentrazione elevata di oligosaccaridi, pari a 20-25 g/L; tale concentrazione diminuisce gradualmente nel corso del tempo, stabilizzandosi in un range compreso tra 5 e 15 g/l nella fase matura del latte (Baker et al. 2023).

I lipidi, costituenti cruciali per lo sviluppo del sistema nervoso e la crescita cellulare, sono presenti principalmente sotto forma di trigliceridi, contribuendo al 98% della frazione lipidica. Il resto dei lipidi secreti è costituito prevalentemente da diacilgliceroli, monoacilgliceroli e acidi grassi liberi tra cui gli acidi grassi polinsaturi a lunga catena omega-3 e omega-6, che svolgono un ruolo chiave nello sviluppo cerebrale e visivo del neonato. Il latte umano contiene oltre 200 acidi grassi differenti; tuttavia, molti di questi sono presenti in quantità ridotte, mentre altri svolgono un ruolo dominante, come nel caso dell'acido oleico che costituisce da solo 30-40 g/100 g di grasso nel latte materno (Andreas et al. 2015).

Nel latte umano le proteine sono principalmente rappresentate da caseine e proteine del siero, con una composizione aminoacidica ottimamente bilanciata per il fabbisogno del neonato in crescita. Lattoferrina,  $\alpha$ -lattoalbumina, lisozima, IgA, caseina e albumina sierica sono le proteine predominanti in esso presenti. La composizione proteica del latte materno varia in base alla fase della

lattazione: all'inizio, il rapporto tra le proteine del siero e le caseine nel latte umano è compreso tra 70/30 e 80/20, mentre nella fase avanzata della lattazione questo rapporto scende a 50/50 (Martin et al, 2016). Questa proporzione è significativamente maggiore rispetto a quella presente nel latte di altri mammiferi.

Il latte materno umano contiene quantità adeguate della maggior parte delle vitamine per sostenere la normale crescita del bambino, ad eccezione delle vitamine D e K. I neonati allattati esclusivamente al seno ricevono un apporto di vitamina D inferiore al minimo raccomandato e molto inferiore all'apporto dietetico raccomandato (Martin et al, 2016). Per questo motivo, si consiglia l'esposizione alla luce solare e l'integrazione di vitamina D dopo la nascita, oltre all'integrazione di vitamina K per prevenire carenze.

Diversi studi hanno dimostrato che la composizione del latte materno è altamente variabile, poiché influenzata da molteplici fattori, quali l'età del bambino, le sue caratteristiche fisiologiche e le particolari necessità metaboliche. Di conseguenza si ritiene che il latte prodotto da ciascuna madre rispecchia con precisione le esigenze nutrizionali del suo neonato, e quindi risulta unico e inimitabile (Andreas et al. 2015).

Inoltre si possono osservare cambiamenti nella sua composizione durante l'allattamento, passando dal colostro al latte di transizione e infine al latte maturo, come riportato nella **tabella 1**.

Il colostro, la prima forma di latte secreta dalle ghiandole mammarie, è denso, giallastro, e ricco di anticorpi, cruciali per la difesa immunitaria del bambino appena nato. Successivamente, circa cinque o sei giorni dopo il parto, il latte evolve verso la fase di transizione, caratterizzata da una diminuzione delle proteine e dei sali minerali, mentre aumenta il contenuto di zuccheri e grassi, conferendo al latte una maggiore densità calorica. In questo modo la composizione del latte si adatta al meglio alle differenti necessità energetiche del neonato. Circa quindici giorni dopo il parto, il latte raggiunge la fase "matura", stabilizzando la sua composizione che sarà mantenuta fino al momento dello svezzamento (<https://www.marionegri.it/magazine/allattamento-al-seno>).

Numerosi studi scientifici hanno evidenziato molteplici benefici del latte materno per la crescita e lo sviluppo del neonato (**Fig.1**); in particolare è stato ampiamente dimostrato che i bambini allattati al seno hanno un rischio significativamente ridotto di sviluppare malattie croniche come allergie, asma, diabete, obesità, sindrome dell'intestino irritabile e malattia di Crohn sia durante l'infanzia che nell'età adulta, rispetto ai bambini non allattati al seno (Lyons et al. 2020). Infatti, il latte umano, oltre ad importanti componenti nutrizionali, contiene una vasta gamma di composti bioattivi, tra cui immunoglobuline,

lisozima e lattoferrina, che esercitano documentati effetti protettivi contro le infezioni batteriche e virali (Coppa et al. 2010).

Inoltre, contiene fattori prebiotici che favoriscono la crescita e la colonizzazione di batteri commensali benefici nell'intestino, svolgendo un ruolo cruciale nella maturazione del microbiota intestinale e nell'ottimizzazione della salute gastrointestinale del bambino. In particolare, gli oligosaccaridi del latte umano (HMO) sono selettivi nelle loro interazioni con i microrganismi, poiché alcuni ceppi sono meno capaci di utilizzarli; in questo modo nella mucosa intestinale è favorita la crescita di ceppi selezionati, come *Bifidobacterium Infantis*, che esercitano effetti anti-infiammatori (Baker et al. 2023). Negli ultimi anni è stato determinato che alcuni glicani del latte umano (come glicoproteine, glicolipidi e soprattutto oligosaccaridi), comportandosi come omologhi dei recettori della superficie cellulare, inibiscono il legame con gli agenti patogeni, proteggendo così il neonato da diverse infezioni enteriche (Coppa et al. 2010). Questo meccanismo di azione può spiegare in parte perché i neonati allattati al seno presentano una minore frequenza di colonizzazione da parte di batteri patogeni come *E. coli*, *Klebsiella* e altri ceppi di *Enterobacteriaceae* rispetto ai neonati che non sono allattati al seno (Hanson, 2007). L'effetto sinergico di questi composti fornisce quindi un'ampia protezione dalla colonizzazione di batteri patogeni nel tratto gastrointestinale infantile (Baker et al. 2023).

Numerosi studi hanno esplorato il ruolo dell'allattamento al seno nella prevenzione del sovrappeso e dell'obesità sia durante l'infanzia che in età adulta. Diversi studi europei hanno dimostrato che l'allattamento al seno ha effetti protettivi contro l'obesità con benefici che possono durare fino all'adolescenza (Hanson, 2007). Tuttavia, uno studio norvegese ha rilevato che questo effetto è meno pronunciato in età adulta (Kvaavik et al. 2005). Inoltre, l'allattamento al seno è stato associato a una riduzione del rischio di sviluppare malattie cardiovascolari, come ipertensione, dislipidemia, obesità e insulino-resistenza (Singhal et al. 2004; Singhal & Lucas, 2004) Questi effetti benefici si pensa siano dovuti a specifici componenti del latte materno, quali leptina, grelina e fattore di crescita insulino-simile, che regolano l'appetito e il metabolismo (Hanson, 2007).

Tra i principali componenti bioattivi del latte umano si trovano i GAG, i quali svolgono diverse funzioni cruciali per la salute del bambino. Questi composti sono essenziali per la protezione contro le infezioni, il supporto del sistema immunitario e lo sviluppo del tratto intestinale nel neonato. L'importanza e il ruolo fisiopatologico di questi composti verranno approfonditi nei capitoli successivi.

In conclusione, il latte materno rappresenta un elemento cruciale nella nutrizione neonatale, offrendo un equilibrio ottimale di nutrienti e fornendo protezione immunitaria fondamentale per il bambino durante i primi stadi della vita. La comprensione della sua complessa composizione e delle sue molteplici

funzioni riveste un'importanza fondamentale per la promozione della salute neonatale e dello sviluppo ottimale del bambino.

Componenti	Colostro	Latte maturo
Carboidrati	50-62 g/L	60-70 g/L
Lattosio	20-30 g/L	67-70 g/L
Oligosaccaridi	20-24 g/L	12-14 g/L
Proteine totali	14-16 g/L	8-10 g/L
Lipidi totali	15-20 g/L	35-40 g/L
Ferro	0.5-1.0 mg/L	0.3-0.7mg/L
Calcio	250 mg/L	200-250 mg/L
Fosforo	120-160 mg/L	120-140 mg/L
Magnesio	30-35 mg/L	30-35 mg/L
Sodio	300-400 mg/L	150-250 mg/L
Cloruro	600-800 mg/L	400-450 mg/L
Potassio	600-700 mg/L	400-550 mg/L
Manganese	5-12 µg/L	3-4 µg/L
Iodio	40-50 µg/L	140-150 µg/L
Selenio	25-32 µg/L	10-25 µg/L
Rame	0.5-0.8 µg/L	0.1-0.3 µg/L
Zinco	5-12 µg/L	1-3 µg/L

Tabella 1: confronto dei componenti nutritivi tra colostro e latte maturo (Baker et al. 2023).

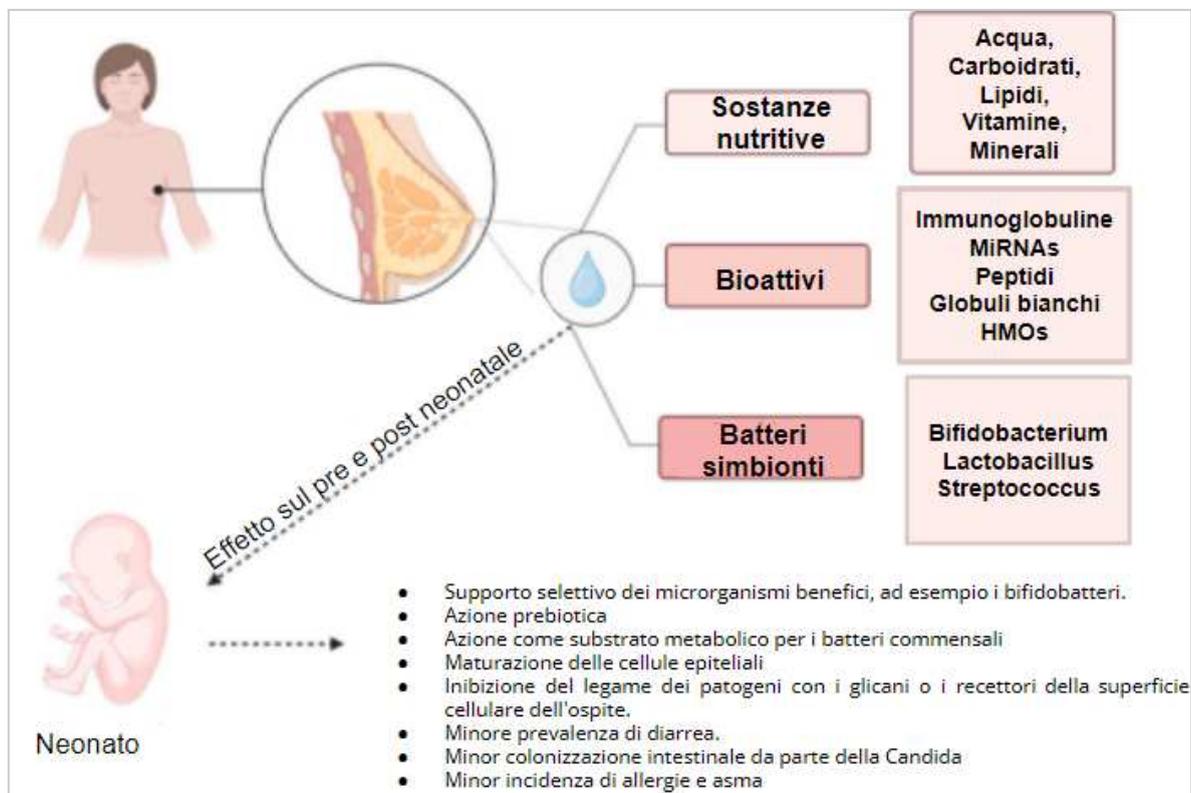


Figura 1: l'importanza del latte materno (Baker et al. 2023).

## 1.2 Il latte vaccino e il suo utilizzo nelle formule per lattanti

I latticini e il consumo di latte rappresentano tradizionalmente elementi cruciali in una dieta bilanciata e salutare. La composizione chimica del latte è influenzata da diversi fattori, tra cui la specie animale, la genetica, le condizioni ambientali, la fase di lattazione e lo stato nutrizionale dell'animale. Attualmente, il latte di mucca costituisce la fonte più diffusa.

In media, il latte vaccino è composto per l'87% da acqua, con una percentuale di lattosio che varia dal 4% al 5%, oltre al 3% di proteine, il 3-4% di grassi, lo 0,8% di minerali e lo 0,1% di vitamine. Questi dati sono riportati nella **tabella 2**, e messi a confronto con i dati del latte umano e di altre specie animali quali capra e pecora.

La ricchezza nutrizionale del latte vaccino è innegabile; esso costituisce una fonte eccellente di proteine ad alto valore biologico, le quali svolgono un ruolo importante nella funzione immunitaria, nel trasporto e nell'assorbimento dei nutrienti, nonché nella regolazione di molteplici processi fisiologici. Inoltre, il latte è una significativa fonte di vitamine e minerali essenziali per il mantenimento della salute e del benessere dell'organismo umano.

Nonostante alcune recenti ipotesi controversie riguardo gli effetti negativi del consumo di latte, che includono il malassorbimento del lattosio e i sintomi di intolleranza associati, al momento non esistono prove concrete che dimostrino

un impatto negativo significativo sulle condizioni di salute. Pertanto, non ci sono dati definitivi che giustifichino l'esclusione completa del latte dalla dieta, ma piuttosto suggeriscono che un consumo moderato possa essere parte integrante di un regime alimentare equilibrato in età adulta. (Pereira, 2013)

Il latte vaccino costituisce la base predominante degli alimenti destinati all'alimentazione infantile. Utilizzato come punto di partenza per la creazione di formule per lattanti, il latte vaccino viene arricchito con diversi ingredienti per avvicinarsi alla composizione del latte materno umano e offrire benefici specifici per la salute del neonato.

Sebbene il latte materno sia considerato la migliore fonte di nutrizione infantile, in alcune situazioni l'allattamento al seno può non essere possibile o insufficiente. Basti pensare che a livello globale, solo il 38% dei bambini viene esclusivamente allattato al seno (Martin et al., 2016)

In situazioni dove l'allattamento al seno è impraticabile, il latte artificiale rappresenta una valida alternativa, mirando a replicare la composizione nutrizionale del latte materno per sostenere la crescita e lo sviluppo del neonato.

Come illustrato nella **tabella 2**, il latte vaccino differisce significativamente dal latte umano in termini di composizione dei macronutrienti. In particolare presenta livelli più elevati di proteine, pertanto, affinché possa avvicinarsi maggiormente alla composizione del latte umano, è necessario diluirlo. Inoltre,

esistono differenze sostanziali nella composizione proteica: nel latte vaccino, circa l'80% delle proteine è costituito da caseine e il 20% da proteine del siero. Al contrario, nel latte umano, il rapporto tra proteine del siero e caseine varia dal 70/30 all'80/20 all'inizio della lattazione, stabilizzandosi intorno al 50/50 nelle fasi avanzate. La lattoferrina, una proteina legante il ferro e seconda proteina più abbondante del siero nel latte umano dopo la  $\alpha$ -lattoalbumina, è presente solo in piccole quantità nel latte vaccino, mentre la  $\beta$ -lattoglobulina, proteina dominante del siero nel latte vaccino, è assente nel latte umano (Hernell, 2011).

Per avvicinare ulteriormente il latte vaccino alle caratteristiche del latte umano, esso deve essere integrato con ingredienti supplementari come ferro, nucleotidi e miscele di grassi, tra cui gli acidi grassi acido arachidonico (AA) e acido docosaesaenoico (DHA). Un'altra differenza cruciale tra i due tipi di latte riguarda la concentrazione e la composizione dei GAG, che sarà trattata nei capitoli successivi.

Queste differenze tra latte umano e vaccino hanno importanti implicazioni per la produzione di formule per lattanti. Esse influenzano non solo la protezione contro le infezioni e lo sviluppo del sistema immunitario, ma determinano anche un profilo aminoacidico del latte umano più adatto alle esigenze del neonato e un carico di soluti renali inferiore, essenziale considerando che la funzione renale del neonato non è completamente sviluppata. Ciò evidenzia la necessità

di migliorare continuamente i metodi per modificare il latte vaccino, in modo da renderlo sempre più simile al latte umano (Hernell, 2011).

	<b>Capra</b>	<b>Pecora</b>	<b>Mucca</b>	<b>Umano</b>
<b>Lipidi (%)</b>	3.8	7.9	3.6	4.0
<b>Lattosio (%)</b>	4.1	4.9	4.7	6.9
<b>Proteine (%)</b>	3.4	6.2	3.2	1.2
<b>Energia (kcal/100 mL)</b>	70	105	69	68
<b>Calcio (mg/100 g)</b>	134	193	122	33
<b>Vitamina A (IU)</b>	121	158	119	43
<b>Vitamina D (IU)</b>	185	146	126	190
<b>Vitamina D (IU)</b>	2.3	0.18 (µg)	2.0	1.4

Tabella 2: composizione media del latte di capra, pecora, mucca e umano (Pereira, 2013)

### 1.3 I GAG del latte

I GAG sono molecole biologicamente attive presenti nel latte umano e svolgono un ruolo cruciale nella sostanza fondamentale amorfa, che costituisce la matrice extracellulare dei tessuti connettivi. Questi composti sono eteropolisaccaridi lineari, costituiti da unità disaccaridiche ripetute, formate da acido uronico e amminozuccheri. L'acido uronico può essere acido  $\beta$ -D-glucuronico o acido  $\alpha$ -L-iduronico, mentre gli amminozuccheri possono includere esosi come glucosio e galattosio.

In base alla loro struttura e composizione, si possono classificare in quattro categorie principali (**Fig. 2**): 1) acido ialuronico (HA); 2) condroitin solfato (CS) e dermatan solfato (DS); 3) eparan solfato (HS) ed eparina (He); 4) cheratan solfato (KS) (G. V. Coppa et al. 2013). Inoltre, si distinguono in GAG solfatati, come DS, CS, HS e KS, e GAG non solfatati, come l'HA. La solfatazione, ovvero l'aggiunta di gruppi solfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), è cruciale per la funzione biologica dei GAG, in quanto aumenta la loro carica negativa. Questa carica negativa potenziata è essenziale per le interazioni dei GAG con proteine e lipidi, influenzando così varie funzioni cellulari e molecolari.

I GAG presenti nel latte materno sono prodotti dalle cellule alveolari della ghiandola mammaria. Questo processo avviene grazie all'azione sequenziale di specifiche glicosiltransferasi, enzimi che aggiungono unità zuccherine alla catena

in formazione. Una volta sintetizzati, i GAG, eccetto l'acido ialuronico (HA), si legano a un "core" proteico e vengono secreti nel dotto ghiandolare sotto forma di complessi macromolecolari, chiamati proteoglicani (PG) (**Fig. 3**).

Uno studio ha constatato che i polisaccaridi complessi non solfati, come l'HA, e quelli variamente solfati, come il CS, il DS e l'HS presenti nel latte materno, sono recuperati in basse quantità nelle feci dei neonati allattati al seno, indicando un'elevata utilizzazione di queste macromolecole (Maccari et al, 2016).

Attualmente si ipotizza che, nell'intestino tenue, gli enzimi proteolitici del succo pancreatico digeriscano il core proteico dei proteoglicani, liberando così le catene di GAG. Queste catene possono poi attraversare indigeste l'apparato digerente dei neonati, agendo come recettori solubili che inibiscono il legame di agenti patogeni alla mucosa intestinale e proteggendo così il neonato dalle infezioni. Una volta raggiunto il colon, i GAG possono essere degradati e facilmente internalizzati. In particolare si è scoperto che molti batteri della flora intestinale umana, come i Bacteroides, producono enzimi capaci di degradare i GAG (Ahn et al, 1998). Questo processo di degradazione coinvolge la rottura dei legami glicosidici e la rimozione dei gruppi solfato, generando monosaccaridi, disaccaridi non solfati e piccoli oligosaccaridi che possono essere facilmente assorbiti dalle cellule intestinali o utilizzati dalla flora batterica.

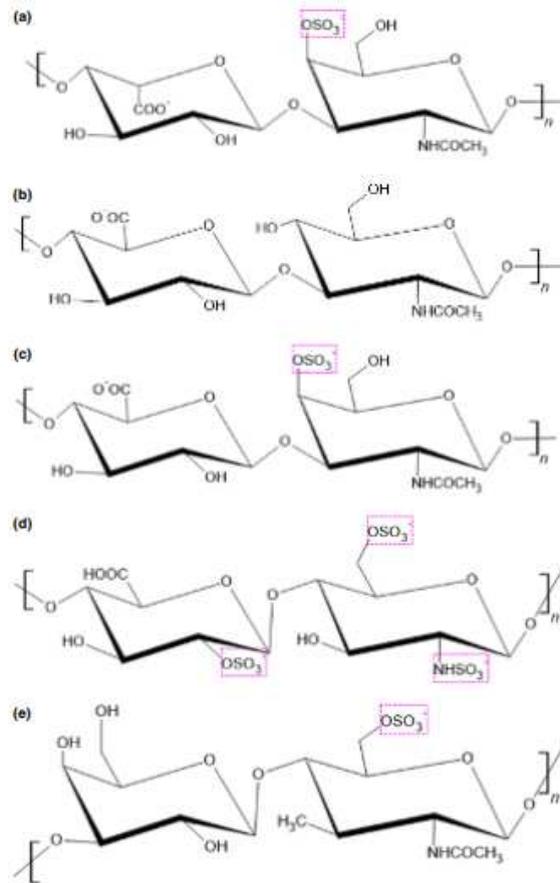


Figura 2: Struttura delle unità ripetitive dei glicosaminoglicani (a) Dermatan Solfato (DS), (b) Acido ialuronico (HA) (c) Condroitin solfato (CS), (d) Heparan solfato (HS) e (e) solfato di cheratano (KS) (Sharma et al, 2021).

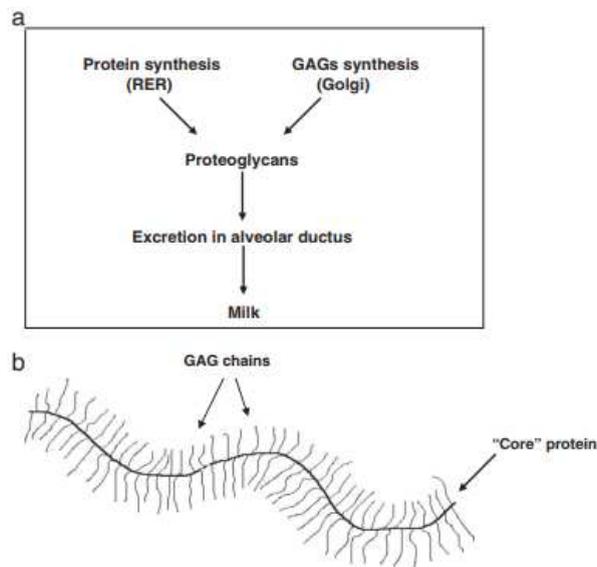


Figura 3: sintesi (a) e struttura (b) di un proteoglicano (Coppa et al. 2013).

### **1.3.1 I GAG: confronto tra latte umano e latte vaccino**

La composizione dei GAG nel latte materno è influenzata dalla nascita pretermine e dallo stadio della lattazione. È stato osservato che il latte materno di madri che hanno partorito prematuramente contiene una quantità di GAG circa tre volte superiore rispetto a quello delle madri che hanno partorito a termine, con le concentrazioni più elevate riscontrate nel colostro. Nello specifico, nel colostro, i livelli di GAG sono circa 9,3 g/l nel latte pretermine e 3,8 g/l nel latte a termine. Questi valori diminuiscono progressivamente fino a raggiungere 4,3 g/l e 0,4 g/l, rispettivamente, entro la fine del primo mese di lattazione. Inoltre, il grado di solfatazione dei GAG, in particolare dei eparan solfati (HS) e condroitin solfati (CS), varia durante la lattazione, con un aumento nei primi mesi seguito da una diminuzione successiva (Monzon et al, 2023).

La composizione dei GAG nel latte varia notevolmente a seconda della fonte. Uno studio (Coppa et al. 2010) ha mostrato che il latte umano contiene una quantità di GAG sette volte superiore rispetto al latte vaccino. In particolare, il condroitin solfato (CS) e dermatan solfato (DS), sono risultati notevolmente diversi da un tipo di latte all'altro: il CS nel latte umano è stato identificato come un polimero con una bassa densità di carica, generalmente molto inferiore a quella dei polimeri dei mammiferi. In contrasto, i GAG nel latte vaccino sono composti per il 66% da DS e per il 34% da CS, con una densità di carica totale di 0,94. Sono state quindi riscontrate grandi differenze tra il latte umano e quello

vaccino sia in termini di qualità che di quantità. Le analisi specifiche hanno permesso di definire con precisione la composizione della complessa miscela di GAG nel latte umano e vaccino. Nel latte umano, il CS rappresenta il 55% dei GAG, mentre nel latte vaccino solo il 21% (**Fig. 4**). Tuttavia, poiché la quantità totale di GAG è inferiore nel latte vaccino, la quantità di CS nel latte umano a termine è quasi 23 volte superiore rispetto a quella del latte vaccino. Il latte umano a termine contiene anche livelli significativamente più alti di He (173 mg/L rispetto a 21 mg/L) e HA (5 mg/L rispetto a 2 mg/L), e livelli più bassi di DS (7 mg/L rispetto a 24 mg/L) rispetto al latte vaccino come riportato nella **Figura 5** (Burge et al. 2020).

A causa della diversa composizione e della notevole eterogeneità strutturale, i GAG presenti nel latte umano e quelli nel latte vaccino possono avere destini metabolici differenti. Per comprendere meglio il metabolismo di queste complesse macromolecole nei neonati allattati al seno, un gruppo di ricercatori ha analizzato la struttura e la quantità residua di GAG nelle feci dei neonati dopo l'ingestione di una quantità nota di latte umano. Successivamente, i risultati ottenuti dai neonati allattati al seno sono stati confrontati con quelli dei neonati alimentati con latte artificiale, al fine di evidenziare le differenze nel metabolismo dei GAG tra le due diverse fonti di nutrimento. Lo studio ha rivelato che la quantità di GAG presenti nelle feci dei neonati allattati al seno è inferiore allo 0,4%, mentre nelle feci dei neonati alimentati con latte artificiale è circa il 4%,

dieci volte di più. Ciò indica che il 99% dei GAG presenti nel latte umano viene utilizzato dall'organismo, rispetto al 96% dei GAG nel latte artificiale, dimostrando una biodisponibilità significativamente più elevata per i GAG del latte umano (Maccari et al. 2016). È stata osservata anche una significativa differenza nei GAG solfati tra i neonati allattati al seno e quelli nutriti con latte artificiale. Il latte materno contiene principalmente una bassa quantità di DS, e CS non solfato con bassa densità di carica. Al contrario, il latte artificiale è ricco di CS e DS con alto contenuto di solfati. Le sequenze di CS con basso contenuto di solfati del latte umano sono più facilmente degradabili rispetto a quelle presenti nel latte artificiale. Questo comporta una degradazione e un utilizzo più rapido ed efficiente dei CS dal latte umano, come dimostrato dallo studio (Maccari et al, 2016).

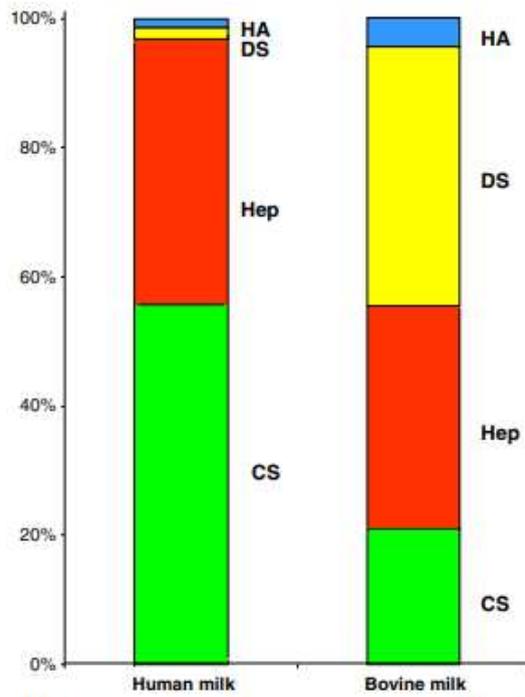


Figura 4: distribuzione percentuale dei GAG nel latte umano e vaccino (Coppa et al. 2013).

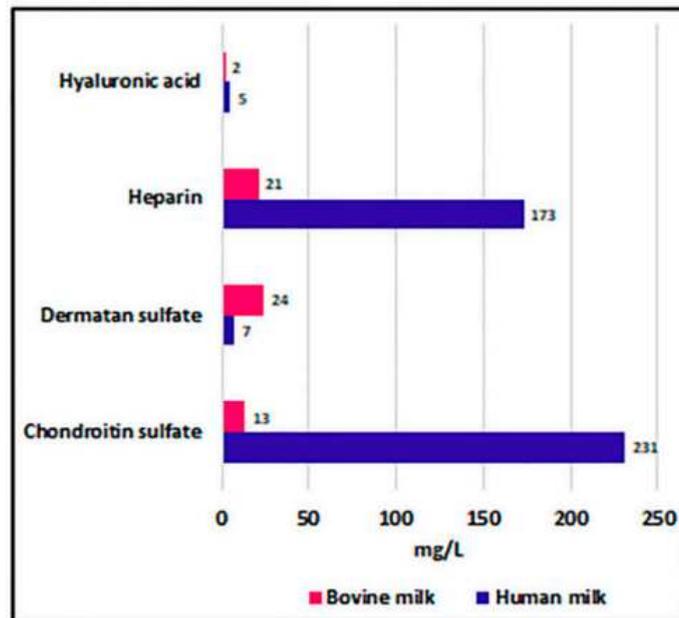


Figura 5: concentrazioni GAG in latte umano e vaccino (Burge et al. 2020)

### **1.3.2 I GAG del latte: ruoli fisiologici nel tratto gastrointestinale**

I GAG presenti nel latte svolgono diverse funzioni cruciali per lo sviluppo e la salute del neonato. Questi composti possono indurre risposte benefiche contro varie condizioni biologiche, tra cui infiammazione, infezioni batteriche e stress ossidativo, grazie ai loro effetti antiossidanti e antinfiammatori sia diretti che indiretti. (Sharma et al., 2021).

I GAG sono noti anche per il loro ruolo nella comunicazione cellulare; in particolare le catene di GAG legate al "core" proteico dei PG possono legarsi a vari fattori di crescita, citochine, chemochine, recettori di superficie cellulare e componenti della matrice extracellulare, oltre che ad altre cellule. Queste interazioni influenzano la crescita e la differenziazione cellulare, le interazioni tra cellule, e i processi anti-infettivi e anti-infiammatori (Maccari et al. 2016). Di conseguenza i PG svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione di numerosi eventi cellulari e processi fisiologici grazie alla loro capacità di interagire con molte molecole bioattive (**Fig.6**).

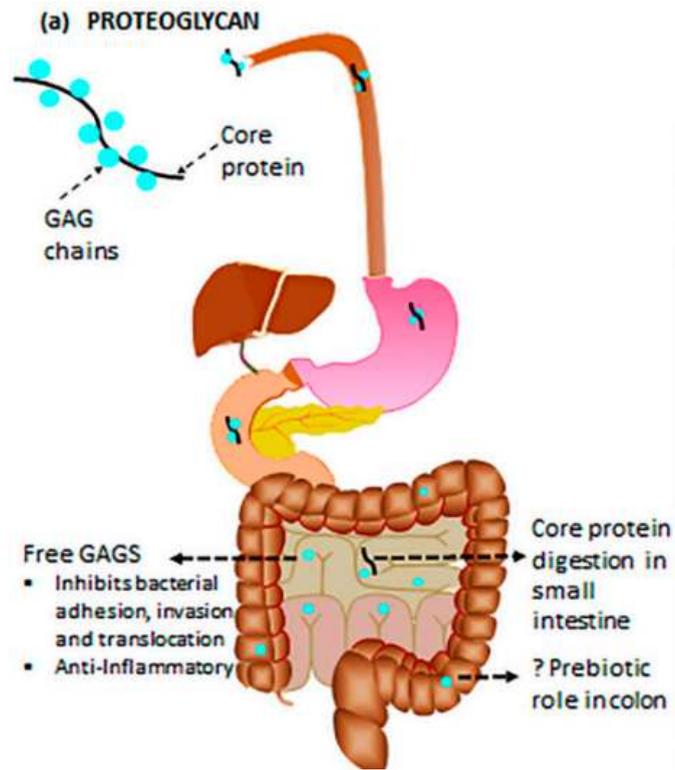


Figura 6: metabolismo proteoglicani (Burge et al. 2020)

## **Proprietà antibatteriche, antivirali e azione antinfiammatoria dei GAG -**

Diversi studi scientifici suggeriscono che l'elevata concentrazione di GAG nel latte materno sia benefica per il neonato, aiutandolo a difendersi da vari agenti patogeni, inclusi virus, batteri e le loro tossine.

Studi scientifici hanno messo in evidenza che i glicosaminoglicani agiscono come recettori solubili sulla membrana delle cellule intestinali, svolgendo un ruolo cruciale nella regolazione dei processi infettivi. Queste molecole sono in grado di ostacolare l'invasione e la colonizzazione da parte degli agenti patogeni, competendo con loro per l'adesione alla parete intestinale. Questo meccanismo è stato dimostrato efficace contro HIV, RSV e CMV (Monzon et al, 2023, Maccari et al. 2016).

Nello specifico tra i GAG più rilevanti nel latte materno, il CS ha dimostrato importanti proprietà antibatteriche, antivirali, antinfiammatorie e antiossidanti. In particolare, è stato determinato che il CS può inibire il legame della glicoproteina gp120 dell'HIV con il recettore CD4 delle cellule (Maccari et al. 2016).

Altri studi clinici hanno invece evidenziato che l'integrazione orale con CS aumenta la prevalenza di Bacteroides e riduce la presenza di Staphylococcus, Enterococcus e Clostridium nell'intestino, contribuendo così al mantenimento della salute intestinale. Inoltre, in modelli di infiammazione intestinale indotta

dall'obesità, la somministrazione orale di CS ha portato a un incremento di batteri benefici come *Lactobacillus* e batteri produttori di acidi grassi a catena corta (SCFA), tra cui *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e il gruppo *Lachnospiraceae* NK4A136. Infine, è stata evidenziata una riduzione di *Escherichia coli*, un produttore di lipopolisaccaridi (LPS) (Monzon et al, 2023).

Recentemente, è stato anche dimostrato che i GAG del latte umano possono inibire l'adesione di due microrganismi intestinali, *Escherichia coli* enteropatogeno sierotipo 0119 e *Salmonella fyris*, alle linee cellulari Caco-2 e Int-407 (Maccari et al. 2016). Inoltre, è stato dimostrato che i frammenti di HA svolgono un ruolo importante nel promuovere un effetto antimicrobico innato nelle cellule epiteliali intestinali (Coppa et al. 2013). Questi GAG costituiscono quindi importanti fattori di difesa contro le infezioni diarroiche acute nei neonati allattati al seno.

Numerosi studi hanno sottolineato l'importanza dei GAG anche nella prevenzione dell'enterocolite necrotizzante (NEC). I risultati di diversi modelli di studio suggeriscono che HA ha un ruolo cruciale nella protezione contro la NEC. Questo effetto si manifesta migliorando la funzione di barriera intestinale, aumentando l'espressione delle proteine delle giunzioni strette (TJ), il numero di cellule caliciformi produttrici di muco e le cellule di Paneth che secernono sostanze antimicrobiche.

Nello specifico è stato consolidato che l'allattamento con latte materno riduce significativamente il rischio di NEC nei neonati pretermine, ma non lo elimina completamente. Questa incompletezza è probabilmente dovuta alla natura multifattoriale della malattia e alla variabilità dei componenti bioattivi presenti nel latte materno (Burge et al, 2020).

**Azione prebiotica dei GAG** - Quando i GAG non digeriti raggiungono il colon, possono esercitare una funzione prebiotica. I prebiotici sono alimenti non digeribili che resistono all'idrolisi acida ed enzimatica nel tratto gastrointestinale superiore e promuovono la salute dell'ospite stimolando la crescita di ceppi batterici benefici nel colon, inibendo allo stesso tempo la proliferazione di microrganismi patogeni. I GAG diventano quindi substrati per specifici batteri intestinali, come i bifidobatteri, che possiedono enzimi specifici per il metabolismo dei carboidrati.

Uno studio (Sharma, et al 2021) ha di fatto dimostrato che alcuni ceppi probiotici, come *B. thetaiotaomicron*, utilizzano i GAG come principale fonte di nutrimento, favorendo lo sviluppo della flora bifidogena, essenziale per la salute intestinale. La proliferazione dei bifidobatteri è associata a numerosi benefici, tra cui la produzione di acidi grassi a catena corta, il mantenimento della barriera intestinale e la modulazione del sistema immunitario.

Infine, una certa quantità di GAG non digeriti può essere presente nelle feci dei neonati, comportandosi come fibre alimentari secondo la definizione internazionale (Campo et al, 2016).

**Ruolo antiossidante dei GAG** - A livello dell'intestino tenue, i GAG contribuiscono all'effetto antiossidante del latte umano, particolarmente importante durante il periodo neonatale. Lo stress ossidativo è un fattore critico per l'insorgenza di molte malattie legate allo stile di vita, e gli ingredienti con potenziale antiossidante svolgono un ruolo significativo nella prevenzione di complicazioni croniche. È stato dimostrato che il CS e altri GAG possono attivare vie che portano all'attivazione degli enzimi antiossidanti, un processo particolarmente rilevante nei neonati pretermine, che hanno un sistema di difesa antiossidante ancora immaturo (Coppa et al. 2013).

Questa attività antiossidante dei GAG è probabilmente dovuta alla loro capacità di chelare metalli di transizione come  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ , che sono responsabili dell'innesco delle reazioni di Haber-Weiss e Fenton, che generano specie reattive dell'ossigeno. Uno studio ha dimostrato che HA isolato dall'*Amussium pleuronectus* ha mostrato una significativa attività di scavenging nei confronti dei radicali DPPH (54,42%), ABTS (71,35%) e idrossilici (63,42%) (Sharma, et al 2021).

Un altro studio ha posto l'attenzione sul CS e HA, noti per il loro meccanismo antiossidante, che si basa principalmente sulla loro struttura chimica unica. La

capacità antiossidante del CS e dell'HA è attribuita alla presenza di gruppi carbossilici in posizioni specifiche e ai gruppi solfato nelle catene di CS, che facilitano il legame con cationi metallici come ferro e rame in soluzione. Questa capacità di chelazione dei metalli riduce la disponibilità di catalizzatori di ROS, contribuendo così a limitare il danno ossidativo cellulare e tissutale (Campo, 2006).

Inoltre, il CS è stato dimostrato, in vari studi in vitro e modelli animali sperimentali di malattie, ad esprimere proprietà antiossidanti dirette, agendo come scavenger di radicali liberi come l'ossidrile ( $\text{OH}\cdot$ ) e altri intermedi reattivi come l'anione superossido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Questa attività antiossidante non solo protegge le cellule da danni come la degradazione del DNA e delle proteine, ma permette anche di ripristinare gli enzimi antiossidanti endogeni come la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT) e glutazione perossidasi (GPx) (Campo, 2006).

## CAPITOLO SECONDO

### Ruolo fisiopatologico della glico-ossidazione a livello intestinale

#### 2.1 MGO e i composti di glicazione avanzata

MGO è un composto carbonilico a basso peso molecolare, altamente reattivo derivato principalmente dal metabolismo del glucosio e del fruttosio (**Fig.7**). Questo metabolita endogeno aumenta nei soggetti diabetici e funge da intermedio comune nella reazione di Maillard; in particolare è precursore di prodotti citotossici chiamati "Advanced Glycation End products" (AGE) (Tomoko et al, 1999).

MGO esiste in diverse forme, ma solo l'1% si trova in forma libera non idratata, monoidrata o diidrata; la maggior parte di esso è legata reversibilmente a proteine, peptidi e amminoacidi (Schalkwijk et al, 2020).

MGO si forma principalmente come sottoprodotto della glicolisi attraverso la degradazione non enzimatica della gliceraldeide-3-fosfato (G3P) e del diidrossiacetone fosfato (DHAP), come mostrato nella **Figura 8**. In condizioni normali, la formazione di MGO rappresenta solo lo 0,1% del flusso di glucotriosio, con un tasso di circa 125 mol/kg di massa cellulare al giorno. Tuttavia, è stato determinato che la sua produzione aumenta con l'incremento

del metabolismo del glucosio, come avviene nel diabete, ma anche in altre vie metaboliche che aumentano i livelli di triosi, come la gluconeogenesi e la gliceroneogenesi (Schalkwijk et al, 2020).

Fonti secondarie di formazione di MGO includono la degradazione delle proteine glicate, l'ossidazione dell'acetone durante il catabolismo dei corpi chetonici nella chetoacidosi diabetica, il catabolismo della treonina e la perossidazione lipidica.

MGO è considerato l'agente glicante più potente nell'uomo, nonostante la sua concentrazione plasmatica sia significativamente inferiore a quella del glucosio. La reattività del MGO è fino a 50.000 volte superiore rispetto a quella del glucosio, rendendolo altamente efficiente nella glicazione (Shojj et al, 2010). Di conseguenza, MGO può interagire con gruppi amminici presenti nelle proteine, nei lipidi e negli acidi nucleici attraverso una reazione non enzimatica. Questo processo porta alla formazione degli AGE (**Fig.9**).

Gli AGE sono composti covalenti stabili che si formano spontaneamente tra i gruppi carbonilici degli zuccheri riducenti e i gruppi amminici liberi di macromolecole come proteine, lipidi o acidi nucleici, senza l'intervento di enzimi. Tra i primi AGE identificati ci sono i derivati dell'imidazolo (FFI), la N-carbossimetil-lisina (CML), la N-carbossi-etil-lisina (CEL), il dimero gliossal-lisina (GOLD) e il dimero metilgliossal-lisina (MOLD). Questi composti derivano dalla reazione del gliossale e del MGO con i residui di lisina.

Gli AGE endogeni si formano sia a livello intracellulare che extracellulare in tutti i tessuti e nei fluidi corporei. Questo avviene quando il normale metabolismo degli zuccheri nelle cellule e il glucosio circolante formano legami covalenti con le proteine plasmatiche attraverso il processo di glicazione, che include varie fasi delle reazioni di Maillard. La produzione endogena di AGE è influenzata da fattori genetici, dall'età e dalla concentrazione di glucosio nel sangue (Phuong-Nguyen et al, 2023).

La glicazione non enzimatica delle proteine e la formazione degli AGE avvengono in vivo. Gli AGE in vivo si accumulano continuamente e in special modo in condizioni di iperglicemia, sia nell'ambiente extracellulare e anche all'interno della cellula. È stato osservato che un aumento temporaneo della glicemia può portare alla formazione di aldimmine, una reazione reversibile con la normalizzazione dei livelli di glucosio nel sangue. Tuttavia, la persistenza dell'iperglicemia rende questa reazione irreversibile. Infatti, un'aumentata formazione di AGE è stata osservata nel diabete e in altre patologie associate al danno ossidativo.

La maggior parte degli AGE è prodotta attraverso la reazione di Maillard non enzimatica, ma possono anche formarsi tramite vie alternative come l'autossidazione del glucosio e la perossidazione dei lipidi, o attraverso la via dei polioli. In questa via, il glucosio viene prima convertito in sorbitolo mediante l'enzima aldoso reductasi e poi in fruttosio dall'azione della sorbitolo

deidrogenasi. I metaboliti del fruttosio, come il fruttosio-3-fosfato, vengono poi convertiti in  $\alpha$ -ossaldeidi, che sono precursori reattivi degli AGE, tra cui il gliosale, MGO e il 3-deossiglucosone. Questi composti reattivi si legano alle proteine intracellulari ed extracellulari e al DNA, modificandoli e producendo gli AGE (Phuong-Nguyen et al, 2023).

Inoltre, è stato determinato che gli AGE possono formarsi anche in assenza di iperglicemia a causa di squilibri dell'omeostasi, come nelle malattie renali, malattie autoimmuni, squilibri redox o durante l'invecchiamento (Feng et al, 2023).

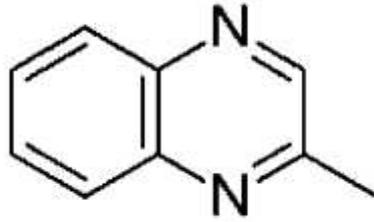


Figura 7: struttura chimica MGO (Degen et al, 2012)

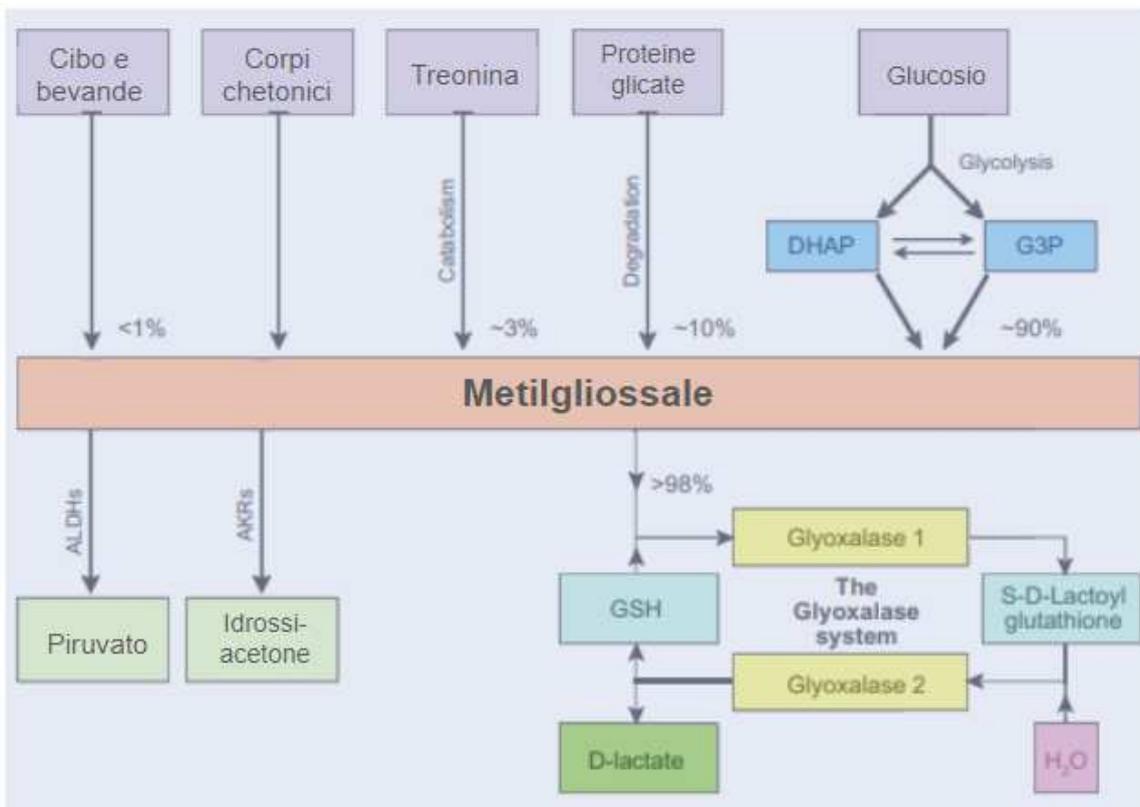


Figura 8: formazione e metabolismo MGO (Schalkwijk et al, 2020).

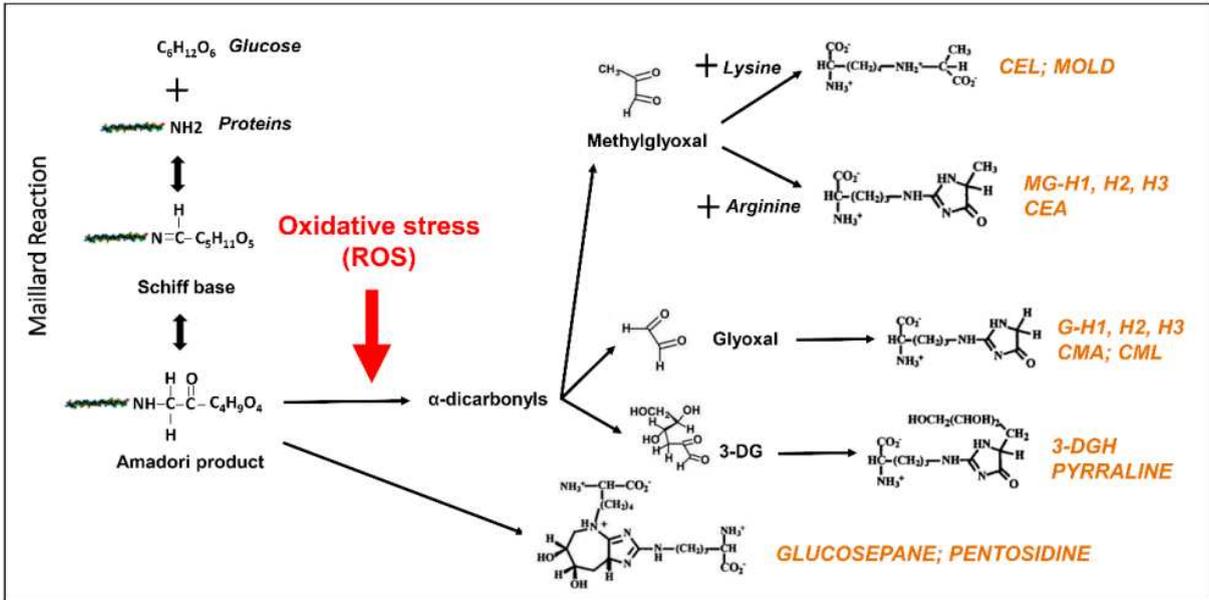


Figura 9: La produzione di prodotti finali di glicazione avanzata (AGE) (Aragonès et al, 2020)

## 2.2 La glicazione non enzimatica

La glicazione non enzimatica, o reazione di Maillard, è un processo chimico che coinvolge zuccheri riducenti e gruppi amminici di proteine o lipidi, senza l'intervento di enzimi. La velocità di questa reazione dipende quindi da vari fattori ambientali e biologici. Tra questi, i principali sono la concentrazione di glucosio nel sangue, la quantità di proteine disponibili, la permeabilità delle membrane cellulari al glucosio e la presenza di gruppi amminici liberi. Inoltre, la velocità della reazione è influenzata dalla basicità dei gruppi amminici, dalla loro accessibilità sterica e dal pH dell'ambiente. Questi fattori combinati determinano l'efficienza e la rapidità con cui la reazione procede.

Questo processo, noto anche come imbrunimento, è comunemente utilizzato nell'industria alimentare per migliorare colore, consistenza e aroma degli alimenti. Tuttavia, produce anche sostanze nocive, contribuendo alla patogenesi di vari disturbi della salute. Solo circa 50 anni fa, i ricercatori hanno scoperto che l'aumento delle emoglobine glicosilate nei pazienti diabetici era dovuto a un processo di glicazione simile nel corpo umano, portando alla formazione di AGE pericolosi (Feng et al, 2023).

Il processo di glicazione si divide in tre fasi: precoce, intermedia e tardiva (**Fig.10**). Nella fase precoce, zuccheri riducenti come glucosio, fruttosio, pentosi, galattosio, mannosio e xilulosio reagiscono con gruppi amminici liberi di ammine

biologiche formando basi di Schiff instabili. Queste basi di Schiff si riarrangiano in prodotti più stabili, noti come prodotti di Amadori. Nella fase intermedia, i prodotti di Amadori si degradano in vari composti dicarbonilici reattivi, tra cui gliosale, MGO e deossiglucosone, attraverso reazioni di disidratazione e ossidazione. Nella fase tardiva, i composti carbonilici reattivi interagiscono con i gruppi amminici liberi. Queste reazioni conducono a una serie di trasformazioni chimiche che includono ossidazione, disidratazione e ciclizzazione. Il risultato di queste reazioni è la formazione di composti complessi noti come AGE. Questi AGE sono caratterizzati da un colore giallo-bruno, spesso mostrano fluorescenza, e tendono a essere insolubili e irreversibili (Singh, 2013).

Durante il processo di glicazione non enzimatica possono formarsi prodotti di varia grandezza e struttura chimica, noti come prodotti della reazione di Maillard (MRP). Alcuni di questi prodotti includono sostanze potenzialmente cancerogene come gli AGE, le ammine eterocicliche (HA), l'acrilammide (AA) e il 5-idrossimetilfurfurale (HMF). In particolare, gli AGE rappresentano un gruppo eterogeneo di composti che emergono nelle fasi avanzate della MR (Feng et al, 2023).

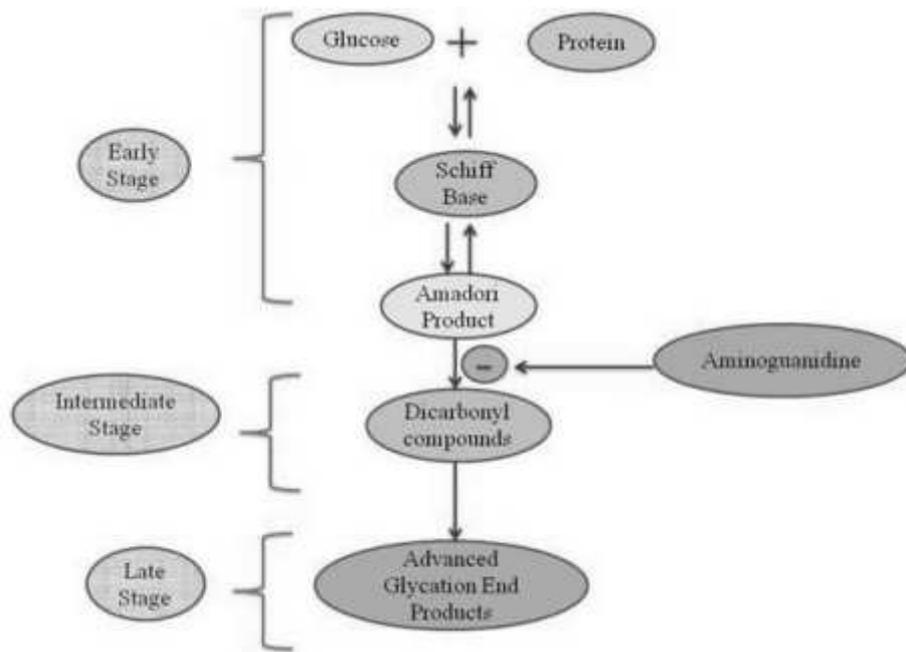


Figura 10: i tre stadi della glicazione non enzimatica (Singh, 2013).

### **2.3 MGO e composti di glicazione avanzata derivati dalla dieta (esogeni)**

Oltre che nel nostro organismo, la reazione di Maillard si verifica anche negli alimenti e nelle bevande, rendendo anche la dieta una fonte significativa di MGO (Degen et al. 2013). Durante la cottura, soprattutto a temperature elevate, si formano e si accumulano molti prodotti finali della glicazione. La formazione di questi composti dipende dalla temperatura di cottura, dal tipo di cottura, dalla composizione degli alimenti in termini di proteine e zuccheri, dagli oli usati e dai processi tecnologici e di conservazione. Gli alimenti di origine animale e quelli che sono stati esposti a calore elevato o a condizioni alcaline durante la preparazione sono particolarmente ricchi di AGE. Le alte temperature di lavorazione sono necessarie per garantire la sicurezza degli alimenti e per migliorare il sapore e l'aspetto. Di conseguenza, il consumo di AGE nella dieta occidentale moderna è particolarmente elevato. Al contrario, gli alimenti preparati con metodi di cottura che utilizzano temperature più basse, tempi di cottura più brevi e maggiore umidità, come la bollitura e la cottura a vapore, contengono concentrazioni di AGE molto più basse.

È stato riscontrato che le principali fonti esogene di MGO sono i prodotti alimentari trasformati, tra cui le bevande commerciali, il formaggio, il caffè e il latte (Matafome et al, 2012).

Come mostrato nella **tabella 3**, è stata dimostrata la presenza di composti  $\alpha$ -dicarbonilici (tra cui MGO) anche nelle formule per lattanti e negli alimenti per l'infanzia. Questi prodotti infatti possono contenere una notevole quantità di carboidrati, fino al 60-70%, di cui una parte significativa è costituita da zuccheri (30-47%). Inoltre vengono sottoposti a trattamenti termici come la sterilizzazione e l'essiccazione a spruzzo, che a causa delle elevate temperature utilizzate, inducono a una maggior produzione di questi composti tossici (Kocadağlı et al, 2014).

Numerose prove indicano che MGO derivato dalla dieta contribuisce significativamente all'accumulo di AGE nei tessuti e alla loro circolazione nell'organismo. Questi AGE esogeni rappresentano quindi una fonte importante del pool totale di AGE nel corpo (**Fig.11**).

Negli ultimi anni, molti studi si sono concentrati sull'inibizione degli AGE durante la trasformazione e produzione degli alimenti a livello industriale. Tuttavia, per mantenere una certa qualità organolettica dei cibi, gli AGE continuano a essere prodotti, e quindi introdotti nel corpo attraverso la dieta.

Oltre al consumo di AGE attraverso la dieta, uno studio ha determinato che anche l'esposizione ai prodotti del tabacco è una significativa fonte di AGE esogeni. Il tabacco stagionato e il fumo di tabacco contengono prodotti di

glicazione altamente reattivi, il che si riflette in concentrazioni circolanti di AGE più elevate nei fumatori rispetto ai non fumatori (Phuong-Nguyen et al, 2023).

In sintesi, la concentrazione di AGE nel sangue e nei tessuti dipende da diversi fattori, tra cui l'assunzione di cibo, la genetica, l'età e la concentrazione di glucosio nel sangue. È sempre più evidente che gli AGE derivati da fonti diverse possono agire sinergicamente, contribuendo a una serie di esiti negativi per la salute.

Un elevato contenuto totale di AGE nel corpo, indipendentemente dalla loro origine endogena o alimentare, è associato a numerosi problemi di salute e a un maggiore rischio di malattie croniche, inclusi problemi gastrointestinali, renali e cardiaci (Feng et al, 2023), che vedremo nel dettaglio nel capitolo seguente.

Composto $\alpha$ dicarbonilico	Purea di frutta		Purea di verdure		Latte in formula	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
3-deoxyglucosone	2.9	9.6	1.6	5.2	4.3	14.2
glucosone	2.8	9.4	4.2	14.0	10.2	34.1
glyoxal	27.1	90.3	21.8	72.7	23.5	78.4
methylglyoxal	7.5	25.0	7.3	24.4	6.0	20.1
dimethylglyoxal	2.6	8.8	2.7	9.0	2.7	9.2

Tabella 3: valori in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  calcolati per i composti  $\alpha$ -dicarbonilici in diverse matrici di alimenti per l'infanzia (Kocadağlı et al, 2014).

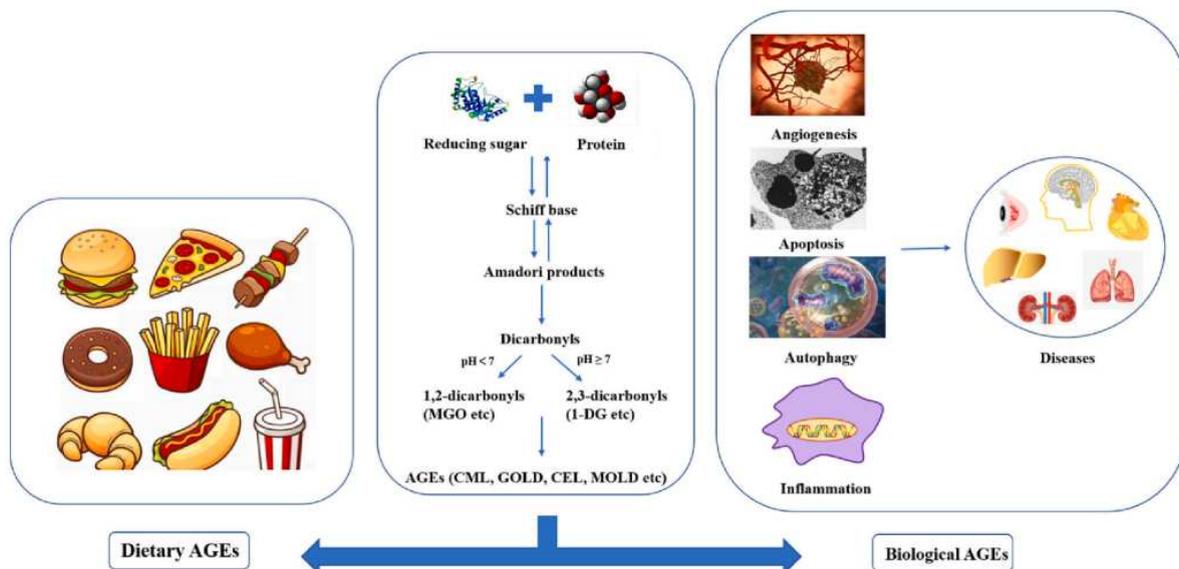


Figura 11: rappresentazione schematica della formazione degli AGE (Feng et al, 2023).

## 2.4 Effetti fisiopatologici del MGO nell'organismo umano

L'accumulo anomalo di MGO comporta una forma di stress per l'organismo che contribuisce alla disfunzione cellulare e tissutale e quindi alla patogenesi di particolari malattie. La detossificazione del MGO è quindi cruciale per mantenere la salute cellulare. In particolare, è stato evidenziato che per ridurre gli effetti nocivi del MGO, il sistema enzimatico della gliossalasi converte questo composto in D-lattato, con la gliossalasi 1 (Glo1) come enzima principale. Questo sistema è presente nel citosol di tutte le cellule dei mammiferi.

Uno studio ha dimostrato che l'infiammazione e l'ipossia possono causare una diminuzione dell'espressione della Glo1 con conseguente aumento dei livelli di MGO (Haik et al. 1994). Quindi, oltre all'iperglicemia, anche l'infiammazione e l'ipossia sono importanti fattori determinanti per la formazione di MGO a livello fisiologico. Questo spiega perché MGO è associato non solo al diabete e alle sue complicanze, ma anche a diverse malattie infiammatorie croniche legate all'età, come l'aterosclerosi, l'ipertensione, il cancro e i disturbi del sistema nervoso centrale. In sintesi, MGO è un potente agente glicante coinvolto non solo nel diabete, ma anche in molte altre condizioni patologiche (**Fig.12**). La gestione dei suoi livelli attraverso meccanismi di detossificazione come il sistema della gliossalasi è essenziale per prevenire danni cellulari e tissutali.

Di contro, è stato dimostrato che piccoli aumenti di MGO, entro l'intervallo fisiologico, possono avere effetti benefici attraverso il fenomeno dell'ormesi, che descrive una risposta biologica favorevole all'esposizione a basse dosi di fattori di stress (Schalkwijk et al, 2020).

MGO è noto anche per generare composti tossici, tra cui l'acrilammide, una neurotossina e potenziale cancerogeno per l'uomo. Questo composto si forma attraverso la reazione di Maillard tra asparagina e composti carbonilici ed è stato scoperto per la prima volta come sostanza tossica alimentare negli alimenti ricchi di amido da Tareke e collaboratori nel 2002 (Tareke et al, 2002) (Zheng et al, 2021).

Oltre all'acrilammide, come accennato in precedenza, MGO contribuisce alla formazione di altri composti tossici, gli AGE. Nello specifico è stato osservato che in condizioni come il diabete e l'uremia, le concentrazioni plasmatiche di MGO, glicossale (GO) e 3-desossiglucosone (3-DG) sono particolarmente elevate. Questo squilibrio tra la produzione di dicarbonili e la loro metabolizzazione o escrezione, definito "stress dicarbonilico", favorisce la formazione degli AGE, contribuendo alla patogenesi di diverse malattie (Hellwig et al, 2018).

Gli AGE sono considerati molecole altamente tossiche che possono danneggiare vari organi e promuovere la morte cellulare. Essi possono accelerare la progressione o lo sviluppo di complicanze diabetiche e di altre malattie, incluse

patologie neurodegenerative come il morbo di Parkinson, il danno cerebrale da alcol, il morbo di Alzheimer e malattie cardiovascolari (**Fig.13**) (Feng et al, 2023).

In particolare gli AGE influenzano negativamente le funzioni cellulari attraverso la reticolazione delle proteine sia extracellulari che intracellulari. È stato infatti evidenziato che proteine tissutali e plasmatiche, quali emoglobina, albumina, fibronectina, collagene e lipoproteine, subiscono modificazioni strutturali dovute alla glico-ossidazione, compromettendo le loro funzioni biologiche. Ad esempio, uno studio (Basta et al., 2004) ha dimostrato che la glicazione delle lipoproteine plasmatiche ha effetti pro-aterogenici. Inoltre, con l'avanzare dell'età, la capacità dell'organismo di eliminare le molecole danneggiate diminuisce, portando a un accumulo di proteine modificate da reazioni non enzimatiche.

Gli AGE sono coinvolti anche nella produzione di ROS durante le fasi iniziali della glicazione, contribuendo allo stress ossidativo. Questo processo è noto come glico-ossidazione. In particolare, durante la glicazione, zuccheri riducenti e prodotti di Amadori possono subire autossidazione, generando anione superossido, radicali idrossilici e perossido di idrogeno (Nishikawa et al., 2000). L'aumento degli AGE risulta quindi strettamente correlato all'instaurazione di processi infiammatori e pro-ossidanti.

Come mostrato nella **Figura 14**, gli AGE possono interagire con recettori specifici, come RAGE, presenti sui macrofagi e sulle cellule endoteliali. Questa interazione

altera il bilancio ossido-riduttivo e stimola la sintesi di radicali liberi e molecole pro-infiammatorie, tra cui il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- $\alpha$ ), l'interleuchina-1 (IL-1) e il fattore di crescita insulin-like 1 (IGF-1). Nelle cellule endoteliali, il legame AGE-RAGE induce l'espressione di molecole di adesione vascolare (VCAM) e di endotelina-1, aumentando lo stress ossidativo e riducendo la produzione di ossido nitrico (NO), con conseguente vasocostrizione (Feng et al, 2023).

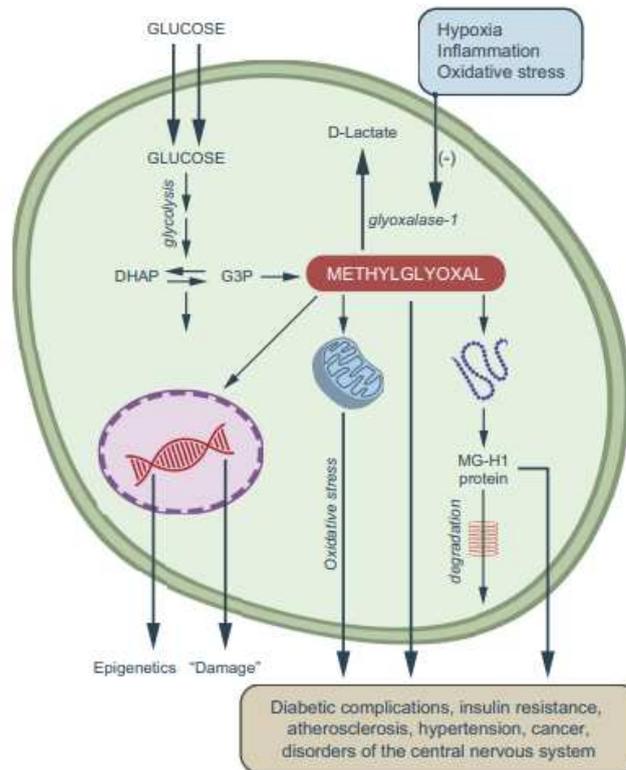


Figura 12: schema riassuntivo degli effetti del MGO nell'organismo (Schalkwijk et al, 2020)

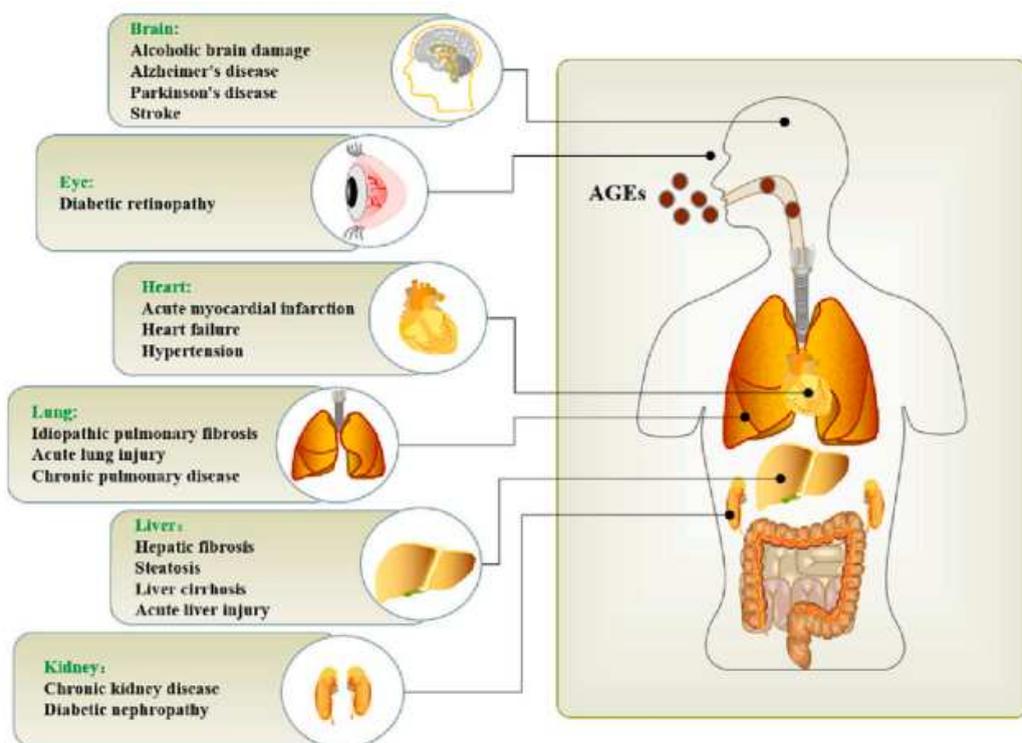


Figura 13: effetti fisiopatologici degli AGE (Feng et al, 2023).

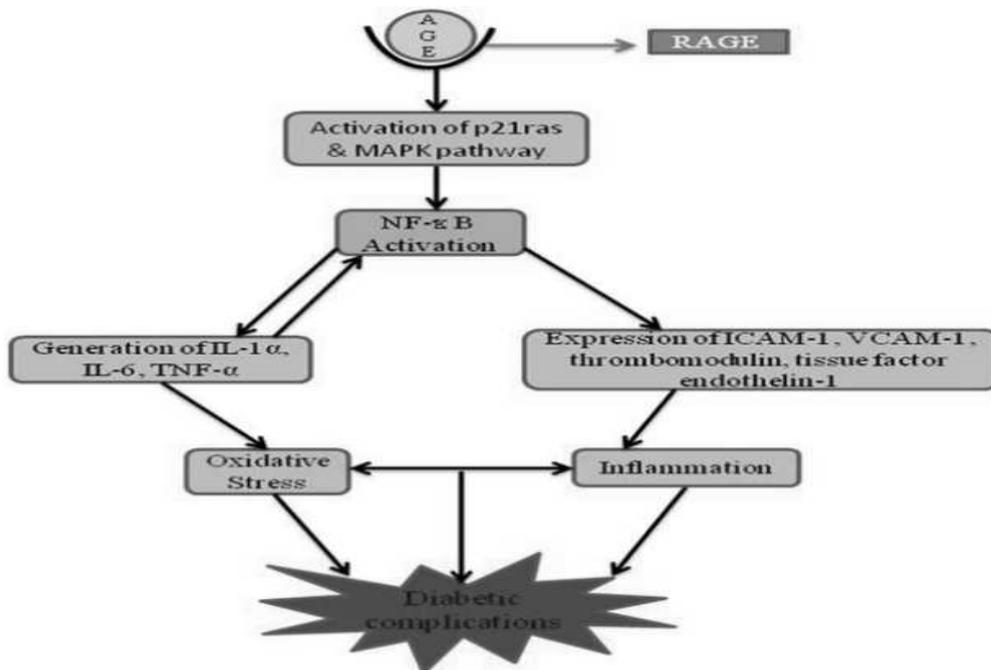


Figura 14: l'interazione degli AGE con RAGE porta allo stress ossidativo e all'avvio di una cascata infiammatoria (Singh, 2013).

## **2.5 Effetti fisiopatologici della glico-ossidazione a livello intestinale**

L'intestino è un organo altamente differenziato con un rapido turnover cellulare; gli enterociti, che costituiscono l'epitelio intestinale, vengono di fatto rinnovati ogni 48-72 ore (Miller et al., 1977). Questo rapido ricambio è essenziale per mantenere l'efficacia della barriera intestinale contro agenti tossici. Tuttavia, fattori come microrganismi della flora intestinale, produzione di acidi gastrici, uso di alcuni farmaci e abitudini alimentari scorrette possono promuovere la produzione di radicali liberi, direttamente coinvolti nell'infiammazione della mucosa intestinale e nello sviluppo di varie patologie gastrointestinali.

Gli enterociti sono quindi costantemente esposti non solo ai nutrienti della dieta, ma anche a numerosi agenti ossidanti, prodotti della perossidazione lipidica, mutageni e cancerogeni. Questi composti possono interagire con le cellule intestinali e a lungo andare a causare stress ossidativo, infiammazione e conseguenti danni funzionali (Uribarri et al. 2005). Tra questi troviamo gli AGE e MGO che possono raggiungere l'intestino attraverso il cibo o formarsi localmente a causa di iperglicemia o dell'attività dei batteri intestinali.

Diversi studi hanno dimostrato che l'accumulo di AGE nell'intestino favorisce l'afflusso di macrofagi, innescando una risposta infiammatoria locale caratterizzata da elevate concentrazioni di citochine pro-infiammatorie e ROS (Phuong-Nguyen et al, 2023).

Un altro studio ha invece indagato sugli effetti diretti degli AGE nelle malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI). La MICI, che comprende colite ulcerosa e morbo di Crohn, è una condizione debilitante con sintomi gastrointestinali come diarrea, dolore addominale e sanguinamento rettale. Sebbene le cause delle MICI siano multifattoriali, esistono prove che gli AGE peggiorano la patogenesi di queste malattie aumentando l'infiammazione intestinale (Phuong-Nguyen et al, 2023).

Infine, uno studio condotto da Zhang et al. (2014) ha esplorato la correlazione tra MGO e la sindrome dell'intestino irritabile (IBS). I risultati hanno mostrato che il metilgliosale può indurre una vasta gamma di sintomi sistemici associati all'IBS, tra cui diarrea, dolore addominale, cefalea, depressione, deterioramento cognitivo, aritmia e problemi cutanei.

### **2.5.1 Effetti dei composti di glicazione avanzata sulla barriera intestinale**

La barriera intestinale mantiene l'omeostasi dell'ambiente interno e svolge due ruoli opposti: mantenere una coesistenza pacifica con i simbionti intestinali senza provocare infiammazioni croniche e fornire risposte infiammatorie e difensive come parte del sistema immunitario. Questa barriera è composta da un singolo strato di enterociti con proteine della giunzione stretta, come claudine

occludina, che sigillano gli spazi tra le cellule per mantenere l'integrità della barriera.

Numerose evidenze scientifiche suggeriscono che un'elevata assunzione di AGE possa aumentare la permeabilità intestinale e i livelli di marcatori infiammatori. In particolare uno studio ha evidenziato che una dieta ad alto contenuto di AGE altera l'espressione delle proteine della giunzione stretta nel digiuno, ileo e colon, portando a una riduzione di occludina e claudina-1 e un aumento di claudina-5, con conseguente aumento della permeabilità intestinale (Phuong-Nguyen et al, 2023).

Un altro studio (Qu et al., 2021) ha invece esaminato i cambiamenti nella permeabilità del colon in ratti alimentati con una dieta ad alto contenuto di AGE. L'analisi istologica ha rivelato significative alterazioni strutturali, tra cui la perdita e la distorsione delle cripte, la riduzione delle cellule goblet, l'aumento della displasia e l'ispessimento della mucosa. Anche l'espressione delle proteine delle giunzioni strette era significativamente ridotta, suggerendo un aumento della permeabilità del colon.

Inoltre studi su ratti diabetici indotti da streptozotocina hanno mostrato un aumento significativo di AGE e RAGE nell'intestino tenue e crasso. In particolare è noto che un aumento dell'espressione di RAGE, a cui si legano gli AGE, accelera la produzione localizzata di ROS. Questo processo altera quindi l'integrità delle

giunzioni strette intercellulari, compromettendo la barriera intestinale e aumentando la permeabilità (**Fig. 15**) (Phuong-Nguyen et al, 2023).

Infine è stato dimostrato che il trattamento con MGO derivato idro-imidazolone-1 (MG-H1) riduce la resistenza elettrica transepiteliale (TEER) e aumenta il coefficiente di permeabilità nei monostrati di cellule Caco-2. In particolare, nelle cellule Caco-2 e nei tessuti del colon, si è osservata una diminuzione delle espressioni di mRNA e delle proteine delle TJ, inclusi ZO-1, occludina e claudina-1. Pertanto, MG-H1 può compromettere la funzione della barriera intestinale. Lo stesso studio ha anche mostrato che MG-H1 aumenta l'espressione dell'mRNA del TNF- $\alpha$ , una citochina nota per alterare l'integrità intestinale e coinvolta nello sviluppo della colite infiammatoria, secreta da macrofagi e monociti (Lim et al, 2022).

Nel complesso, questi risultati evidenziano gli effetti pro-infiammatori degli AGE nell'intestino e il loro ruolo patogeno nell'alterazione della barriera intestinale e della sua permeabilità.

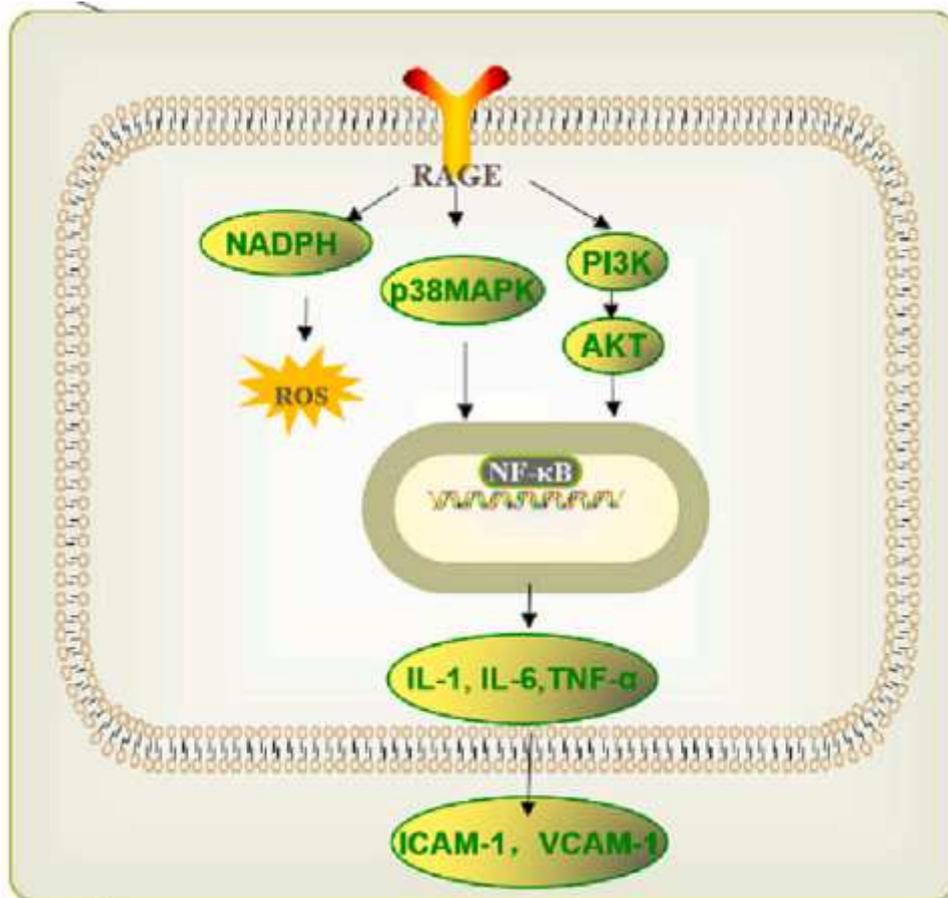


Figura 15: Trasduzione del segnale molecolare degli AGE. (Feng et al, 2023).

## CAPITOLO TERZO

### Materiali e metodi

#### 3.1 Estrazione dei GAG dal latte umano e dal latte vaccino

I GAG sono stati isolati seguendo il protocollo stabilito dal "Laboratorio per la Diagnosi e la Prevenzione delle Malattie Metaboliche" presso il Presidio Ospedaliero "G. Salesi" di Ancona. I campioni di latte utilizzati sono stati raccolti da un gruppo di 20 madri che avevano partorito a termine e consistevano in latte maturo prelevato durante il primo mese di lattazione. Dopo la raccolta, i campioni di latte sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'estrazione dei GAG.

La procedura di isolamento dei GAG comprende diversi passaggi per la delipidizzazione e la deproteinizzazione del latte umano, con l'obiettivo finale di ottenere un precipitato contenente i GAG. Il procedimento è composto da quattro fasi.

Nella prima fase, di digestione enzimatica e centrifugazione, 10 mL di latte umano sono stati miscelati con 100 mg di pancreatina suina e 40 mL di Tris-HCl 20 mM; quindi la miscela è stata incubata a 60°C per tutta la notte. Successivamente, è stata centrifugata a 5000 rpm per 10 minuti a 4°C.

La seconda fase consiste nella precipitazione dei GAG: in particolare dopo aver rimosso la frazione lipidica superficiale, sono stati aggiunti 3,75 g di CTAB

(Cetyltrimethylammonium bromide, Sigma). Il campione è stato così mantenuto a 4°C per tutta la notte per indurre la precipitazione dei GAG. Infine la miscela è stata nuovamente centrifugata a 5000 rpm per 30 minuti a 4°C e il pellet ottenuto è stato lavato con 10 mL di etanolo (EtOH).

Nella terza fase sono stati effettuati ulteriori trattamenti sul pellet ottenuto: il pellet è stato risospeso in 10 mL di NaCl 2M in EtOH; dopo aver aggiunto 40 mL di EtOH, il campione è stato lasciato a -20°C per tutta la notte. Nei successivi tre giorni, il pellet è stato risospeso tre volte in etanolo a diverse concentrazioni (70%, 70%, assoluto) e lasciato a -20°C per tutta la notte. Infine, il pellet è stato essiccato in una stufa termostata a 37.5°C.

La quarta ed ultima fase invece consiste nella dialisi e liofilizzazione del preparato ottenuto. Nello specifico la polvere essiccata è stata risospesa in 10 mL di acqua. Successivamente il campione è stato dializzato utilizzando tubi da dialisi con un cut-off molecolare (MWCO) di 100 (Spectra/Por®, Biotech). Dopo la dialisi, il campione è stato congelato a -80°C e successivamente liofilizzato.

Come standard di riferimento per l'analisi dei GAG estratti, sono stati utilizzati eparina (He, Heparin sodium salt, AppliChem) e condroitin-solfato A (CS, Chondroitin sulfate A sodium salt, Sigma).

Lo stesso metodo di estrazione è stato applicato sul latte vaccino.

### **3.2 Modello cell-free: studio dell'effetto protettivo dei GAG da latte materno e latte vaccino sulla glicazione non enzimatica dell'albumina.**

La glicazione non enzimatica è un processo chimico in cui gli zuccheri riducenti reagiscono con le proteine, i lipidi o altri composti contenenti gruppi amminici (come le ammine terminali dei residui di lisina e arginina nelle proteine) senza l'intervento di enzimi specifici. Questa reazione è anche nota come reazione di Maillard e porta alla formazione di AGE.

La determinazione degli AGE mediante fluorimetro ci ha permesso di verificare gli effetti protettivi dei GAG e degli altri composti oggetto di tesi, nei confronti della glicazione non enzimatica. Per simulare l'iperglicemia è stato utilizzato MGO, composto molto reattivo legato all'insorgere e al progredire del diabete. Mentre come proteina è stata usata l'albumina, una delle principali proteine presenti nel siero del sangue.

L'albumina (1 mg/mL) è stata incubata con MGO (3 mM) in assenza ed in presenza dei composti nelle concentrazioni rappresentate nella **tabella 4**.

Le provette così allestite, sono state incubate a 37° C per 24 ore. Al termine dell'incubazione sono state utilizzate per la valutazione della glicazione enzimatica (**Fig.16**). Le letture al fluorimetro si basano sulla caratteristica della maggior parte degli AGE di avere una fluorescenza intrinseca se eccitate utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione pari a 370 nm. Il massimo di

emissione si osserva a circa 500 nm. I dati sono espressi come intensità di fluorescenza.

Latte materno	mg/mL
Glicosaminoglicani (HG)	0,5
Eparina (He)	0,25
Condroitin solfato (CS)	0,25
Eparina (He) + Condroitin solfato (CS)	Rapporto 1:1
Latte vaccino	mg/mL
Latte vaccino alta concentrazione (CG H)	0,5
Latte vaccino bassa concentrazione (CG L)	0.07

Tabella 4 : concentrazioni dei GAG da latte materno e vaccino utilizzate nelle diverse condizioni sperimentali.

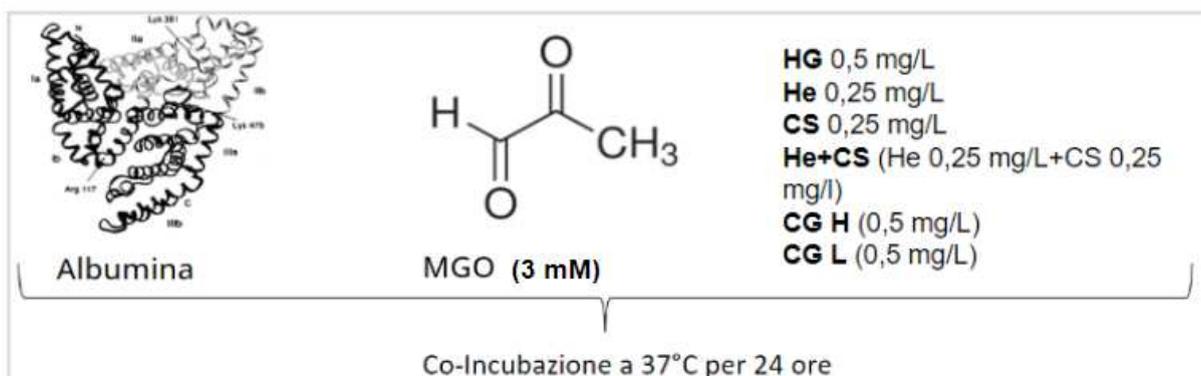


Figura 16: modello sperimentale cell-free, con albumina come substrato.

### **3.3 Studio dell'effetto protettivo dei GAG da latte materno e latte vaccino sul danno indotto da MGO in cellule intestinali Caco-2**

**Modello sperimentale: linea cellulare Caco-2** - Per la messa a punto del modello è stata utilizzata una linea cellulare di cellule intestinali umane, le Caco-2 (Carcinoma Colorectal cells) (**Fig.17**).

Una volta differenziate queste cellule esprimono giunzioni strette, microvilli, enzimi e trasportatori caratteristici degli enterociti. Il monostrato cellulare fornisce una barriera fisica e biochimica al passaggio di ioni e piccole molecole; inoltre separa il modello in due compartimenti ben distinti: uno apicale, corrispondente al lume intestinale *in vivo* e uno basolaterale che corrisponde al compartimento della circolazione sanguigna e linfatica dell'organismo. Con il modello delle Caco-2 si sono trovati valori di permeabilità che correlano bene con i dati umani di assorbimento *in vivo* per farmaci, sostanze chimiche e piccole molecole come il glucosio. Per tale motivo questa linea cellulare viene riconosciuta come un modello adatto per valutare l'effetto dei componenti nutrizionali.

Le cellule sono state fatte crescere all'interno di fiasche T75 in adesione e mantenute in terreno D-MEM (Dulbecco-Modified Eagle's Medium) complementato con 10% di FBS "Fetal Bovine Serum" (necessario perché fornisce alla cellula fattori di crescita), 5mM di glutammina e 100 U/ml di penicillina/streptomina.

Il mantenimento avviene in termostato a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> e 95% di aria atmosferica in ambiente umidificato. Il cambio del terreno è stato effettuato ogni 2 giorni. Una volta raggiunta la confluenza (in condizioni ottimali i tempi di crescita sono di circa una settimana) le cellule verranno staccate dalla fiasca T75 dopo un lavaggio in PBS e per azione della tripsina (5 minuti a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). A questo punto le cellule possono essere utilizzate per i vari trattamenti.

Un metodo ampiamente utilizzato e consolidato per valutare l'integrità del monostrato epiteliale è la misurazione della resistenza elettrica transepiteliale (TEER) attraverso lo strato cellulare. Per l'analisi della permeabilità le cellule sono state seminate su particolari supporti, le Transwell (**Fig.18**). Le cellule Caco-2, una volta seminate su questi supporti, mostrano giunzioni cellulari strette e microvilli in circa 21 giorni dalla semina. Le cellule vengono considerate pronte per gli esperimenti quando i valori di TEER sono  $>1500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ .

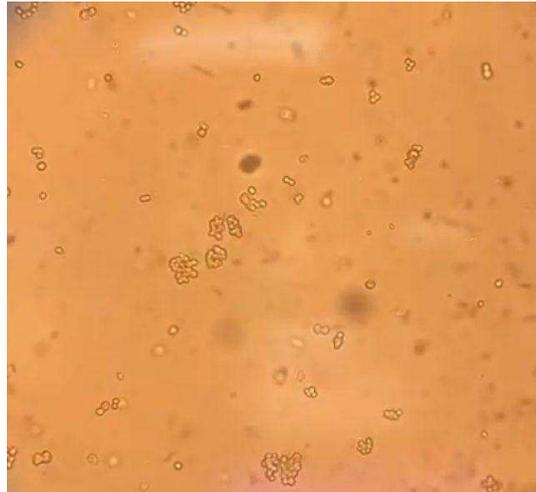


Figura 17: Cellule Caco-2

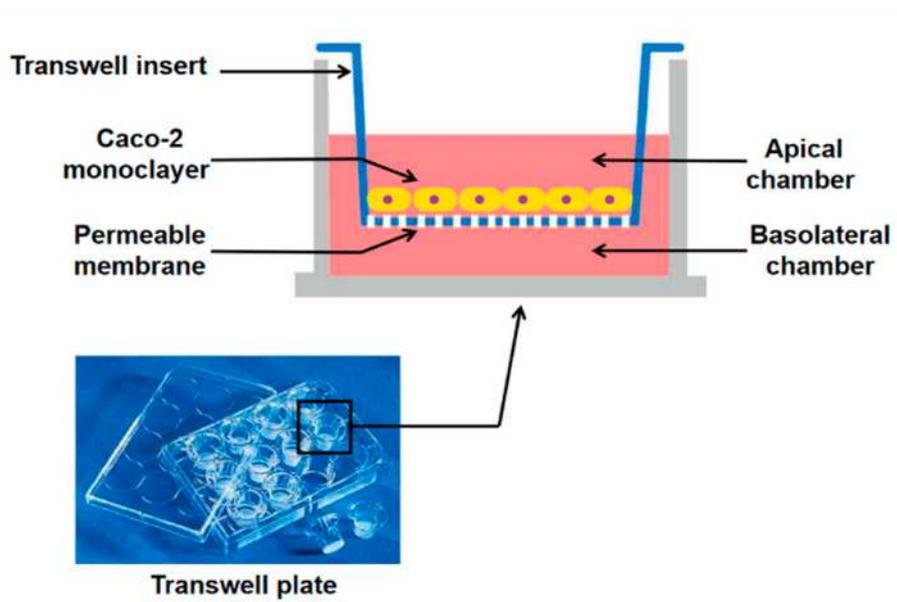


Figura 18: Piastra transwell convenzionale e diagramma schematico del modello cellulare Caco-2 (Ding et al, 2021)

**Il trattamento con i GAG da latte materno e latte vaccino in presenza ed in assenza di MGO: la scelta del modello sperimentale** - Sono stati esaminati gli effetti protettivi dei GAG, sulle cellule dell'epitelio intestinale umano. Sono stati investigati il latte materno, due composti puri l'eparina (He) e il condroitin solfato (CS), ed un mix con rapporto 1:1 di entrambi i composti (He+CS). Al fine di ottenere un confronto diretto tra le due tipologie di alimenti usate come fonte di nutrienti in età neonatale, sono stati utilizzati anche i GAG estratti dal latte vaccino in due differenti concentrazioni (CG H e CG L).

La scelta della concentrazione e del time point deriva da una serie di esperimenti preliminari che ci hanno permesso di trovare le condizioni più adatte per questo modello sperimentale.

Nel primo modello sperimentale testato, le cellule intestinali Caco-2 sono state pretrattate per 18 ore con 0,25 mg/mL di HG, He e CS. Dopo la pre incubazione le cellule sono state trattate con 3 mM di MGO per 24 ore. Il trattamento con MGO è risultato citotossico, riducendo la vitalità cellulare ed aumentando i livelli di ROS. Tuttavia, il pretrattamento non è stato in grado di proteggere le cellule in maniera significativa dal danno glico-ossidativo indotto da MGO. Le concentrazioni dei GAG non risultavano citotossiche.

Nel secondo modello, le cellule sono state co-incubate con 0,25 mg/mL di HG, He e CS e 3 mM di MGO per 2 ore. Le cellule co-incubate con GAG e MGO hanno mostrato una vitalità superiore del 25% e una riduzione del 30% dei livelli di ROS

rispetto alle cellule trattate solo con MGO, indicando che la co-incubazione protegge le cellule Caco-2 dal danno glico-ossidativo indotto da MGO. Pertanto, nel nostro studio abbiamo deciso di utilizzare il secondo modello sperimentale. Per mimare le condizioni fisiologiche, abbiamo utilizzato le concentrazioni reali presenti nel latte materno (0,5 mg/mL HG) e vaccino (0,07 mg/mL CG L)

La concentrazione CG H (0.5 mg/mL) è stata scelta per effettuare un confronto con i HG in termini quantitativi, la CG L è la concentrazione che si avvicina a quella fisiologica.

**Il trattamento con i GAG da latte materno e latte vaccino** - In dettaglio, le cellule Caco-2 sono state seminate in una 12 well ad una densità di 250.000 cellule per ogni pozzetto. Una volta raggiunta la confluenza si procede con il trattamento con 3mM MGO

Le condizioni di trattamento saranno:

- Cellule non trattate (controllo)
- Cellule trattate con MGO
- Cellule trattate con GAG, He e il CS, ed un mix (He + CS), CG H, CG L
- Cellule trattate con MGO + GAG, He e il CS, ed un mix (He+CS), CG H, CG L

Al termine dell'incubazione il danno causato dallo stress glico-ossidativo è stato valutato mediante l'analisi della vitalità, dei ROS intracellulari e Western blot.

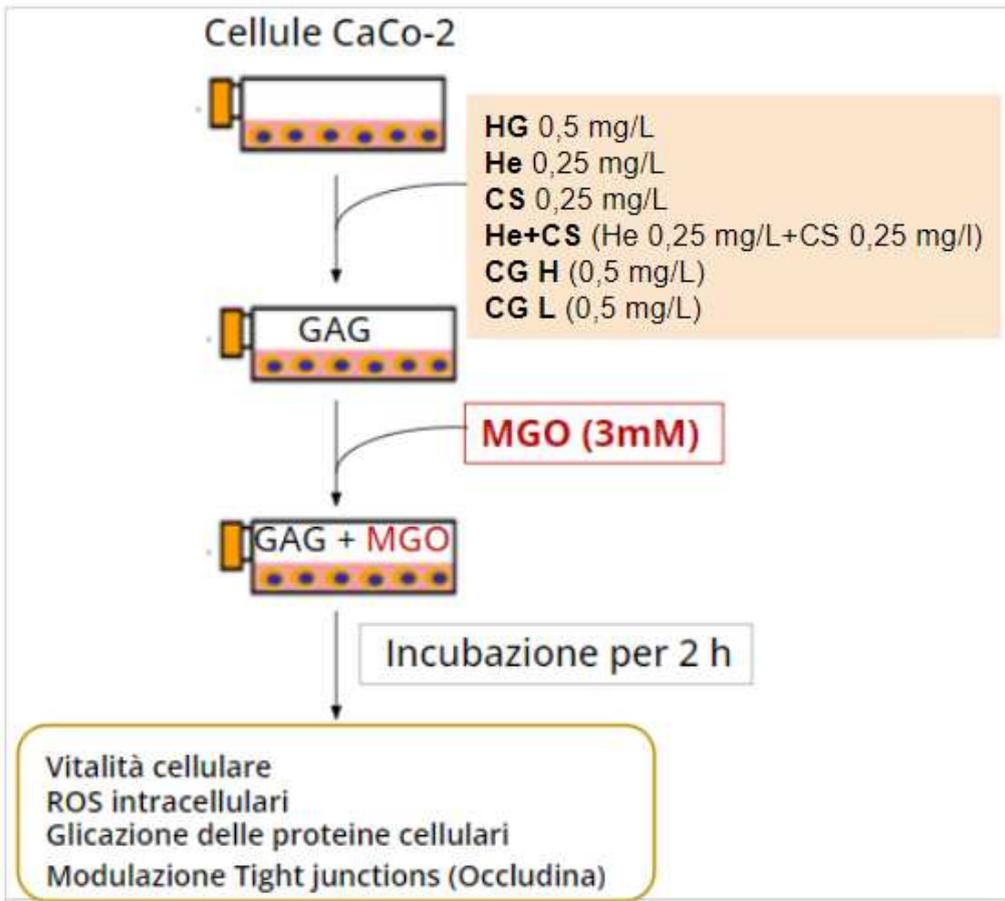


Figura 19: modello sperimentale cell-based

**Il trattamento con i GAG da latte materno e latte vaccino in presenza ed in assenza di MGO: effetto sulla vitalità cellulare** - Il saggio colorimetrico del 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) è ampiamente utilizzato in biologia cellulare per valutare la vitalità e la proliferazione cellulare. Questo test si basa sulla capacità delle cellule metabolicamente attive di ridurre il MTT, sale di tetrazolio giallo (bromuro di 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio) in cristalli di formazano, un prodotto colorato insolubile (**Fig.20**). La reazione avviene grazie alla presenza dell'enzima mitocondriale, il succinato deidrogenasi, attivo soltanto nelle cellule vive. La formazione di formazano è infatti direttamente proporzionale al numero di cellule metabolicamente attive presenti nel campione. Per misurare il risultato della reazione, il formazano viene solubilizzato attraverso l'aggiunta di solventi organici quali il dimetilsolfossido (DMSO) o altri agenti simili. Successivamente, la quantità di colore sviluppato può essere quantificata spettrofotometricamente a lunghezze d'onda specifiche, generalmente nell'intervallo di 500-600 nm.

Questa metodologia fornisce una valutazione precisa e sensibile della vitalità cellulare, rendendola una scelta fondamentale in diversi contesti, tra cui la valutazione dell'effetto di composti e l'analisi della crescita e della sopravvivenza cellulare in risposta a stimoli variabili.

Le cellule sono state seminate overnight nella micropiastra da 96 pozzetti ad una concentrazione di  $5 \times 10^4$  cellule/well. Il giorno seguente, il terreno è stato

rimosso e le cellule sono state trattate nelle diverse condizioni sperimentali . Al termine del trattamento (2 ore) il terreno è stato rimosso, i pozzetti sono stati lavati in PBS e successivamente sono stati aggiunti 100 µl di soluzione MTT (5 mg/ml di PBS) in ciascun pozzetto.

Le cellule sono state incubate 2 ore a 37°C, dopodiché il terreno contenente il reattivo è stato rimosso; al microscopio è stato possibile osservare la formazione dei cristalli blu all'interno delle cellule.

In ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di DMSO per avere la lisi cellulare e permettere la solubilizzazione dei cristalli di formazano. Il tutto è stato trasferito dopo 5 minuti in una micropiastra da 96 pozzetti bianca, rispettando lo schema del caricamento, ed è stata effettuata una lettura a 540 nm utilizzando un lettore automatico per micropiastre ELISA BioTek Synergy per determinare la quantità di formazano prodotto, correlata alla vitalità cellulare.

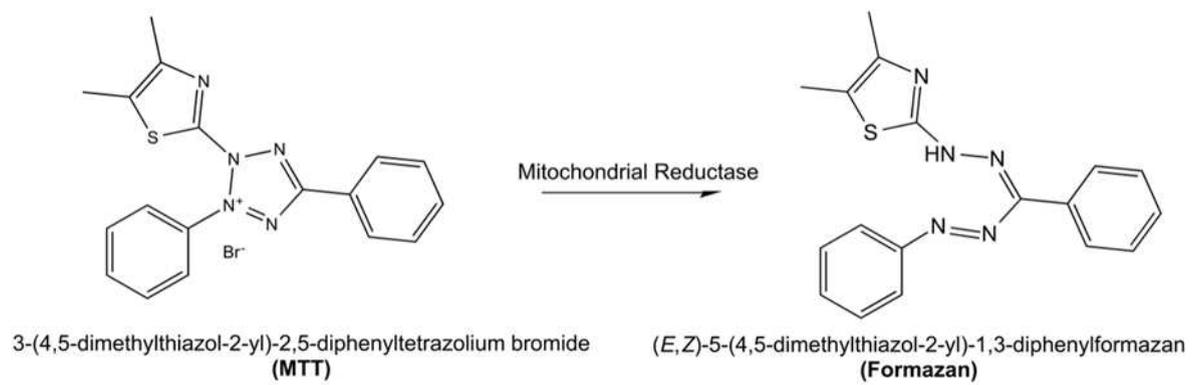


Figura 20: Reazione enzimatica condotta dalla deidrogenasi mitocondriale che riduce il sale di tetrazolio a formazano

**Il trattamento con i GAG da latte materno e latte vaccino in presenza ed in assenza di MGO: effetto sullo stress ossidativo** - L'analisi per la quantificazione delle specie reattive dell'ossigeno si basa sull'uso di un substrato fluorescente che viene attivato a livello intracellulare da parte di una reazione di ossidazione. Si tratta quindi di un saggio fluorimetrico mediante l'utilizzo della sonda, la 2',7'-diclorofluoresceina diacetato (H<sub>2</sub>DCF-DA, Invitrogen, USA). La sonda diffonde all'interno delle cellule in quanto non è polare, viene ossidata e i gruppi acetato vengono tagliati dalle esterasi intracellulari formando un composto polare che viene trattenuto all'interno delle cellule (H<sub>2</sub>DCF). I ROS intracellulari provocano l'ossidazione di tale composto convertendolo in 2,7-diclorofluoresceina (DCF) che è permeabile, esce dalla cellula e può essere quantificata in quanto è altamente fluorescente ed emette ad una lunghezza d'onda di 532 nm (**Fig.21**).

L'analisi dei ROS è stata fatta in contemporanea con l'analisi MTT per poter normalizzare i valori dei ROS con quelli di vitalità, seguendo il protocollo.

Le cellule nelle varie condizioni sperimentali sono state piastrate in concentrazione  $5 \times 10^4$  in piastre 96 well black, nere con fondo trasparente per lettura in fluorescenza. Dopo 24 ore di incubazione a 37°C e CO<sub>2</sub> al 5% il terreno è stato rimosso e sono stati effettuati due lavaggi in PBS. Successivamente sono stati aggiunti 100 µl di sonda H<sub>2</sub>DCF-DA 25 µM (25 µl di sonda in 10 ml di terreno DMEM è la concentrazione raccomandata per cellule con fenotipo di crescita

aderente). La piastra è stata incubata al buio per 45 min alle condizioni standard, dopodiché la sonda è stata rimossa dai pozzetti ed è stato effettuato un lavaggio con PBS per eliminare la sonda in eccesso. È stata eseguita infine una lettura in cinetica per 1 ora e 30 min alla lunghezza d'onda di eccitazione di 485 nm e lunghezza d'onda di emissione di 532 nm tramite un lettore automatico di micropiastre BioTek Synergy con sottrazione automatica del background. I dati sono espressi come unità di fluorescenza, normalizzati per quelli della vitalità cellulare.

In seguito, è stato acquisito l'imaging cellulare, attraverso il microscopio automatizzato Lion hearth FX Automated live cell Imaging (Biotek, USA).

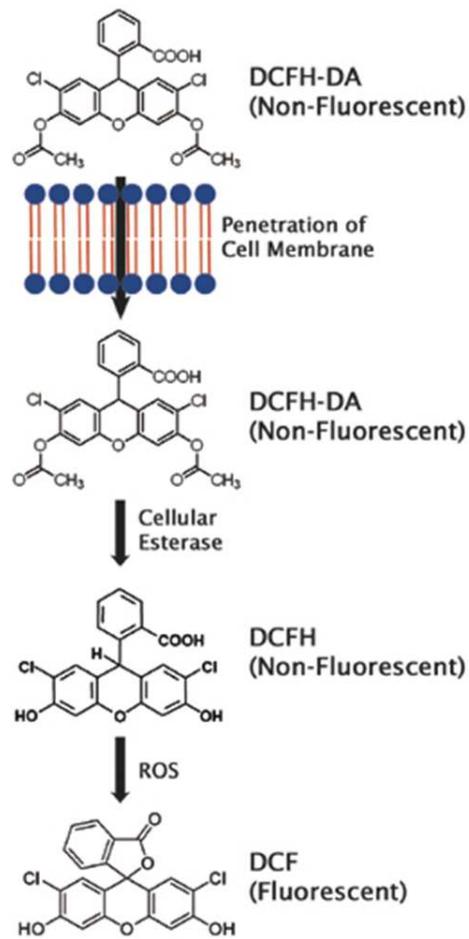


Figura 21: Meccanismo d'azione della Carbossi-H<sub>2</sub>DCFDA (5-(e  
6)-carbossi-2',7'-diclorodidrofluoresceina diacetato

**Il trattamento con i GAG da latte materno e latte vaccino in presenza ed in assenza di MGO: effetto sulla permeabilità cellulare** - Le cellule Caco-2

seminate nei supporti Transwell, dopo circa 21 giorni, sono pronte per essere trattate con i diversi composti, come sopra citato, per testare i loro effetti protettivi. Una volta verificata la resistenza del monolayer, si procede con il trattamento nelle diverse condizioni sperimentali e si monitorano le condizioni dell'epitelio intestinale mediante TEER prima del trattamento (T0), dopo 2 ore (T2h) e dopo 24 ore (T24h) dal trattamento (**Fig.22**).

Una diminuzione dei valori del TEER è indice di una perdita di compattezza del monolayer cellulare. I dati vengono espressi come percentuale (%) dal valore iniziale (T0).



Figura 22: analisi della permeabilità di membrana mediante TEER, nelle 24 ore post trattamento nelle varie condizioni sperimentali

## **Il trattamento con i GAG da latte materno e latte vaccino in presenza ed in assenza di MGO: effetto sull' espressione delle proteine**

### **Estratto proteico totale e quantificazione mediante metodo BCA - Per**

ottenere un lisato cellulare delle quattro diverse condizioni sperimentali, è stato utilizzato il RIPA buffer.

Dal momento in cui le cellule appena lisate iniziano ad andare incontro a proteolisi, defosforilazione e denaturazione delle proteine sono stati aggiunti degli inibitori al PBS e al tampone di lisi e per rallentare ulteriormente questi processi i campioni sono stati mantenuti in ghiaccio o a 4°C .

Sono stati quindi aggiunti al RIPA buffer un inibitore di fosfatasi composto da ortovanadato 1 mM e inibitori di proteasi quali PMSF 1 mM (inibitore di serina e cisteina proteasi), pepstatina A 1 µg/ml (inibitore di aspartico proteasi) e aprotinina 1 µg/ml (inibitore di tripsina, chimotripsina e plasmina).

Il pellet cellulare è stato raccolto in una eppendorf e sono stati aggiunti 50 µl di tampone di lisi Ripa (37,5 ml di H<sub>2</sub>O, 5 ml di Triton X100, 5 ml di DOC, 250 µl di SDS, 500 µl di TRIS 1M a pH 7,5, 1,5 ml di NaCl 5M, 250 µl di NaF 1M).

Le cellule sono state rotte con una siringa/puntale e lasciate 15 min in ghiaccio. Il tutto è stato poi centrifugato 10 min a 14000 rpm in modo da far precipitare le membrane e le varie componenti cellulari ed il surnatante, contenente le

proteine, è stato recuperato per il dosaggio di esse, quindi congelato a  $-80^{\circ}\text{C}$  per il successivo processamento.

Per il dosaggio delle proteine è stato seguito il protocollo BCA (Bicinchoninic Acid). La quantificazione delle proteine si basa sul dosaggio dell'acido bicinconinico (BCA), grazie alla formazione di un complesso proteina- $\text{Cu}^{2+}$  in condizioni alcaline, che comporta la riduzione del  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$ . Dato che la riduzione è proporzionale alla quantità di proteina presente, si andrà a quantificare il  $\text{Cu}^{1+}$  grazie al fatto che l'acido bicinconinico forma con esso un complesso viola-blu in ambienti alcalini.

I campioni sono stati scongelati in ghiaccio, vortexati e centrifugati a 13000 rpm per 15 minuti a  $4^{\circ}\text{C}$ , successivamente sono stati mantenuti in ghiaccio.

I campioni sono stati poi diluiti 1:10 .

È stata preparata una curva standard utilizzando albumina sierica bovina (BSA). 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 62,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e 31,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  .

Successivamente sono stati caricati 25  $\mu\text{l}$  per ogni campione e come bianco sono stati utilizzati 25  $\mu\text{l}$  di acqua deionizzata. Tutti i caricamenti sono stati fatti in duplicato.

Successivamente è stato aggiunto il reagente BCA, composto da due reattivi A e B in rapporto 50:1. Una volta caricato il reagente, la micropiastra è stata incubata al buio per 30 minuti a  $37^{\circ}\text{C}$  e poi è stata effettuata una lettura di

assorbanza a 572 nm attraverso un lettore automatico di micropiastre. Il contenuto proteico dei campioni è stato determinato attraverso un'analisi automatizzata di regressione lineare fatta mediante la curva di taratura standard creata con la BSA.

**Analisi Western Blotting** - Al fine di valutare i meccanismi molecolari alla base del trattamento con i GAG da latte materno e latte vaccino in presenza ed in assenza di MGO nelle cellule Caco-2, sono state indagate le alterazioni dell'espressione di geni coinvolti nelle giunzioni strette cellulari (tight junctions), l'occludina. L'analisi dell'espressione degli AGEs (Ga-modified protein) è stata invece effettuata per determinare il livello di glicazione non-enzimatica.

Il Western Blotting è una tecnica che viene utilizzata per l'identificazione di molecole proteiche specifiche presenti all'interno del campione in esame tramite l'utilizzo di anticorpi specifici. La miscela di proteine viene separata in condizioni denaturanti (SDS-page, **Fig.23**) in base alle loro dimensioni utilizzando un gel di poliacrilammide al 12%. Nei pozzetti del gel saranno caricati 3 µL di marker (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards BIORAD) e 25 µL di campione costituito da estratto proteico, sample buffer 2X e RIPA buffer. Si procede con la corsa elettroforetica a 75 V per 45 minuti e poi 110 V fino alla completa separazione delle bande che ci permetteranno di riconoscere le varie proteine in base al peso molecolare.

Terminata la corsa elettroforetica è stato effettuato il trasferimento delle proteine dal gel ad una membrana di PVDF attivata in metanolo al 100%.

Per il trasferimento viene preparato un " sandwich" (**Fig.24**) formato da spugnetta, carta da filtro Whatman, precedentemente imbevuti di tampone di trasferimento, gel, membrana di PVDF e di nuovo carta Whatman e spugnetta.

Il tutto è tenuto insieme da supporti in plastica posti tra due elettrodi paralleli all'interno di una vaschetta per elettroforesi contenente il tampone di trasferimento, rivolgendo il lato relativo alla membrana di PVDF verso l'anodo.

Il trasferimento delle proteine viene fatto a 30 V costanti overnight, a 4°C. La membrana sul quale è avvenuto il trasferimento è stata poi immersa in una soluzione di blocking e successivamente lavata con TBS tween (Tris HCl 20 mM a pH 7,6, NaCl 140 Mm, Tween 20 allo 0,1%).

A questo punto la membrana può essere incubata con l'anticorpo primario specifico per 1.30 h a temperatura ambiente al termine del quale verranno effettuati dei lavaggi in TBS-TWEEN 20 1%. La membrana viene successivamente incubata per altri 1.30 h con l'anticorpo anti-proteina specifico.

Al termine dell'incubazione sulla membrana è stata messa una soluzione Pierce™ ECL (thermo fisher) che permette la rilevazione delle bande al Chemidoc grazie all'acquisizione del segnale chemiluminescente.

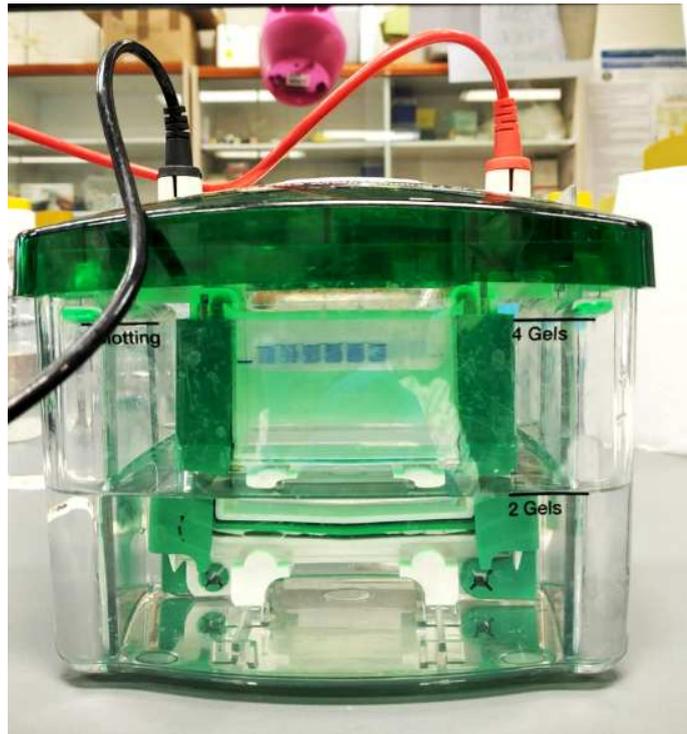


Figura 23: Separazione delle proteine tramite SDS- page



Figura 24: Preparazione del "sandwich" necessario al trasferimento delle proteine sulla membrana di PVDF

### **3.4 Statistica**

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti almeno tre volte in doppio e condotti in diverse sessioni sperimentali. I dati sono riportati come media  $\pm$  SD. L'analisi della varianza (ANOVA) a una via è stata effettuata utilizzando il software GraphPad PRISM 8.2 per valutare eventuali differenze statistiche tra più di due campioni diversi. Un valore di  $p < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo (test di confronto multiplo post-hoc di Tukey). L'analisi statistica dei livelli di trascrizione è stata eseguita con Graph Pad Prism V8.0.1. (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA).

## CAPITOLO QUARTO

### RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo progetto, abbiamo approfondito il ruolo fisiopatologico dei GAG, che sono tra i principali composti bioattivi del latte umano. Nello specifico, abbiamo studiato gli effetti protettivi dei GAG presenti nel latte materno contro il danno glico-ossidativo, confrontandoli con quelli del latte vaccino. A tal fine, i GAG sono stati isolati attraverso un processo di separazione sequenziale da campioni di latte materno maturo, raccolti da donne che avevano partorito a termine e che hanno donato il latte durante il primo mese di allattamento. Lo stesso metodo di estrazione è stato utilizzato per isolare i GAG dal latte vaccino.

Lo studio è stato condotto utilizzando sia colture cellulari sia un sistema cell-free, impiegando l'albumina come substrato. In entrambi i modelli sperimentali, il danno glico-ossidativo è stato indotto mediante trattamento con MGO. Per lo studio cell-based è stata utilizzata la linea cellulare Caco-2, derivata da un adenocarcinoma del colon umano. Quando coltivata in condizioni specifiche, questa linea cellulare può simulare un modello di epitelio intestinale normaloide, rendendola idonea per studi su compatibilità, tossicità, genotossicità ed epi-genotossicità di diverse sostanze (**Fig. 25**).

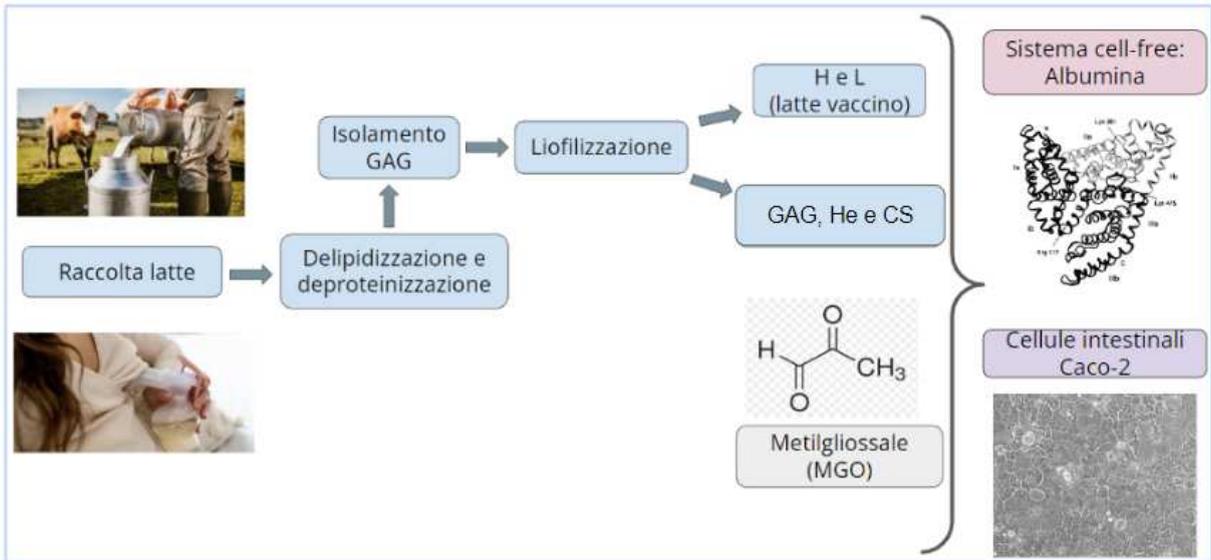


Figura 25: disegno sperimentale.

#### **4.1 Effetto protettivo dei GAG contro la glicazione non enzimatica indotta da MGO in modello cell-free: confronto tra latte materno e vaccino**

Per investigare il ruolo dei GAG nella glico-ossidazione, è stato impiegato un modello cell-free. Nello specifico, è stata co-incubata l'albumina bovina con MGO 3 mM insieme ai diversi composti oggetto di studio, per un periodo di 24 ore a 37 °C. I composti testati includono: HG a una concentrazione di 0,5 mg/mL; He a una concentrazione di 0,25 mg/mL; CS a una concentrazione di 0,25 mg/mL; una combinazione di He e CS (He 0,25 mg/mL + CS 0,25 mg/mL); e GAG estratti dal latte vaccino a due differenti concentrazioni (CG H a 0,5 mg/mL e CG L a 0,07 mg/mL).

È stata esaminata la glicazione non enzimatica dell'albumina indotta da MGO, con e senza GAG, valutando la fluorescenza intrinseca (lunghezza d'onda di emissione 430 nm, lunghezza d'onda di eccitazione 370 nm). Questa fluorescenza è associata alla formazione di AGE fluorescenti.

Nella **Figura 26** è mostrato un significativo aumento dell'intensità di fluorescenza nei campioni trattati con MGO rispetto al controllo, confermando che questo composto è in grado di indurre la glicazione non-enzimatica dell'albumina nelle condizioni sperimentali adottate.

In presenza di GAG, è stata osservata una evidente riduzione dell'intensità di fluorescenza intrinseca, correlata direttamente a una minore formazione di AGE,

suggerendo la capacità di questi composti di proteggere l'albumina dalla glicazione non-enzimatica indotta da MGO. Tuttavia, come mostrato nella **Figura 26B**, la concentrazione più alta di GAG del latte vaccino (CG H) ha un effetto protettivo inferiore rispetto alla concentrazione più bassa (CG L). Inoltre, come mostra la **Figura 26A**, è stato evidenziato che i composti CS e He, singolarmente risultano meno efficienti, rispetto alla loro combinazione.

Il trattamento con i soli composti non ha riscontrato una variazione significativa dell'intensità di fluorescenza rispetto al controllo.

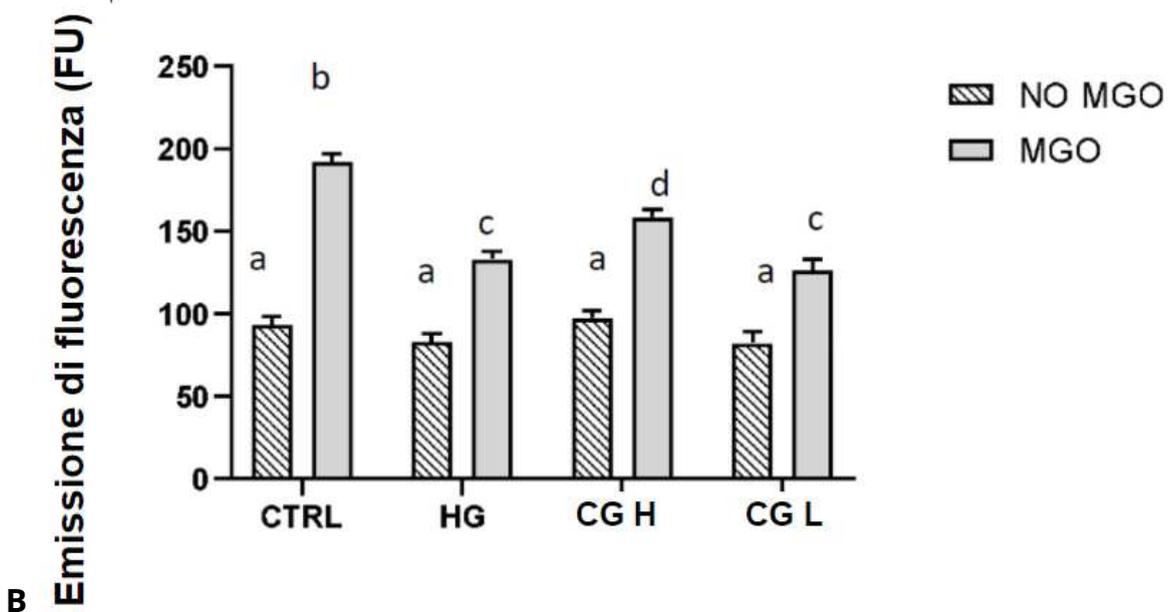
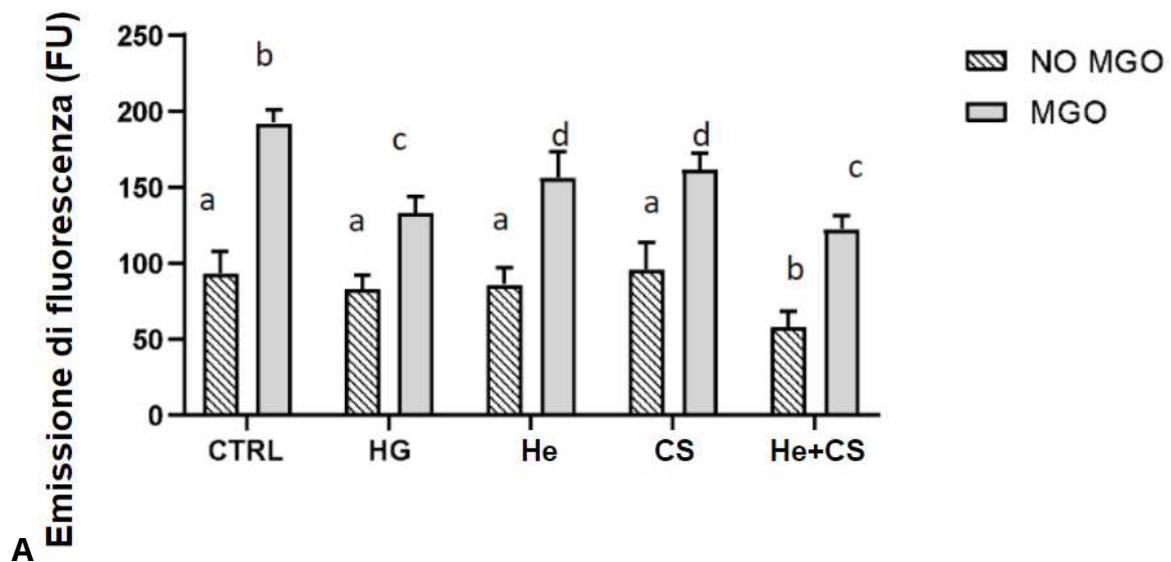


Figura 26: Effetto dei GAG sulla glicazione non enzimatica indotta da MGO sull'albumina

A) Emissione di fluorescenza intrinseca relativa alla formazione di AGE fluorescenti totali in campioni di albumina co-incubata con MGO 3 mM e GAG estratti da latte materno (HG 0,5 mg/L), eparina (H 0,25 mg/mL) e condroitin solfato (C 0,25 mg/mL).

B) Emissione di fluorescenza intrinseca relativa alla formazione di AGE fluorescenti totali in campioni di albumina co-incubata con MGO 3 mM e GAG estratti da latte vaccino (BG H 0,5 mg/mL, BG L 0,07 mg/mL) e latte materno (HG 0,5 mg/mL).

## **4.2 Valutazione dell'effetto protettivo dei GAG isolati da latte umano e vaccino contro il danno indotto da MGO in cellule Caco-2**

### **4.2.1 Analisi della vitalità cellulare**

Come illustrato nei grafici della **Figura 27**, il trattamento con MGO a una concentrazione di 3 mM ha ridotto la vitalità cellulare di circa il 50% rispetto al controllo. La co-incubazione con i GAG ha, come previsto, mostrato un effetto protettivo sulle cellule intestinali. Nello specifico, nella **Figura 27A**, si osserva un incremento della vitalità cellulare nelle cellule trattate con HG, He e CS. Analogamente, come evidenziato nella **Figura 27B**, anche i GAG isolati dal latte vaccino hanno indotto un significativo aumento della vitalità nelle cellule trattate con MGO. In particolare, l'effetto protettivo è risultato significativo alle concentrazioni più basse (0,07 mg/mL CG L), mentre alle concentrazioni più elevate (0,5 mg/mL CG H) non sono stati osservati effetti significativi.

Infine, il trattamento con i soli composti (senza MGO) non ha mostrato effetti citotossici, indicando che le concentrazioni dei GAG utilizzate non sono dannose per le cellule intestinali.

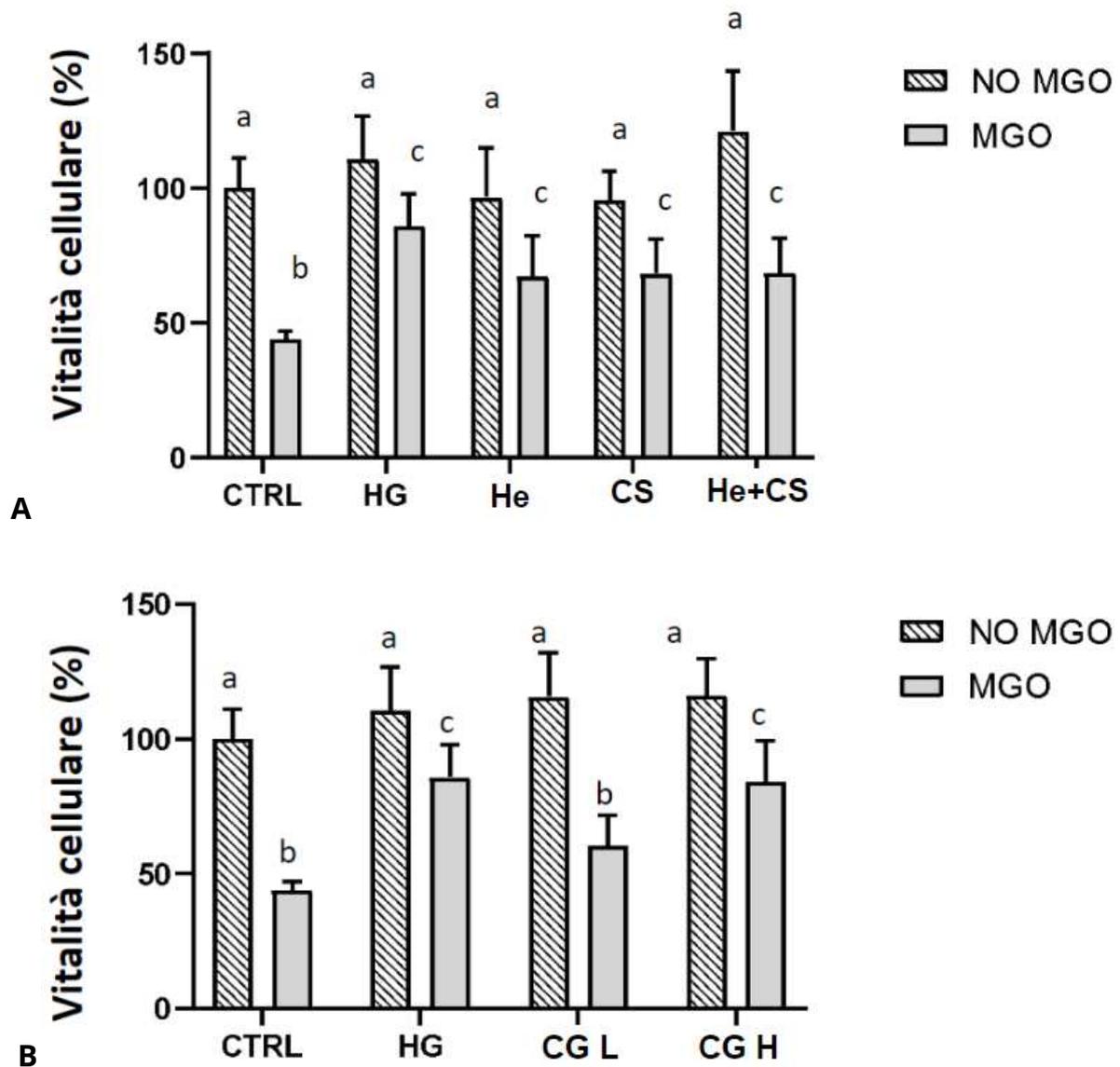


Figura 27: Effetto dei GAG sulla vitalità cellulare in cellule Caco-2 trattate con MGO

A) Vitalità cellulare, in campioni di cellule Caco-2 co-incubati con MGO 3 mM e GAG estratti da latte materno (HG 0,5 mg/mL), eparina (He 0,25 mg/mL) e condroitin solfato (CS 0,25 mg/mL).

B) Confronto della vitalità cellulare espresso in percentuale, relativa alla formazione di formazano, in campioni di cellule Caco-2 co-incubati con MGO 3 mM e GAG estratti da latte vaccino (CG H 0,5 mg/mL , CG L 0,07 mg/mL) e latte materno (HG 0,5 mg/mL).

#### 4.2.2 Analisi dello stress ossidativo

La produzione di ROS nelle cellule Caco-2 co-incubate con GAG e MGO a una concentrazione di 3 mM è stata valutata utilizzando la sonda fluorescente DCF.

I risultati presentati nella **Figura 28** confermano che il trattamento con MGO provoca stress ossidativo, correlato a un eccessivo accumulo di AGE, come riportato in letteratura (Young et al. 2009).

I GAG hanno dimostrato una funzione protettiva anche nella formazione di ROS. La **Figura 28A** evidenzia che HG alla concentrazione fisiologica di 0,5 mg/mL mostrano un'azione protettiva significativamente superiore rispetto He e CS, sia quando usati singolarmente che in combinazione. In particolare, la concentrazione di ROS misurata in presenza di HG non aumenta oltre il 50% rispetto al controllo. Al contrario, gli altri composti testati mostrano un aumento della concentrazione di ROS del 70-80% rispetto al controllo.

Inoltre, la **Figura 28B** evidenzia il confronto tra i GAG estratti dal latte vaccino e quelli estratti dal latte materno; anche in questo caso, i GAG estratti dal latte materno mostrano una maggiore capacità protettiva contro lo stress ossidativo a livello cellulare.

Questi dati suggeriscono che HG hanno una maggiore efficacia nel limitare la produzione di ROS, riducendo così lo stress ossidativo indotto da MGO nelle cellule intestinali Caco-2.

I risultati sono stati ulteriormente confermati mediante l'analisi di fluorescenza e imaging delle cellule con la sonda H<sub>2</sub>DCFDA, utilizzando lo strumento Lionheart.

La **Figura 29** mostra a livello grafico l'intensità del segnale fluorescente, che è proporzionale alla quantità di ROS presenti nelle cellule, evidenziando la riduzione dei ROS grazie al trattamento con i GAG.

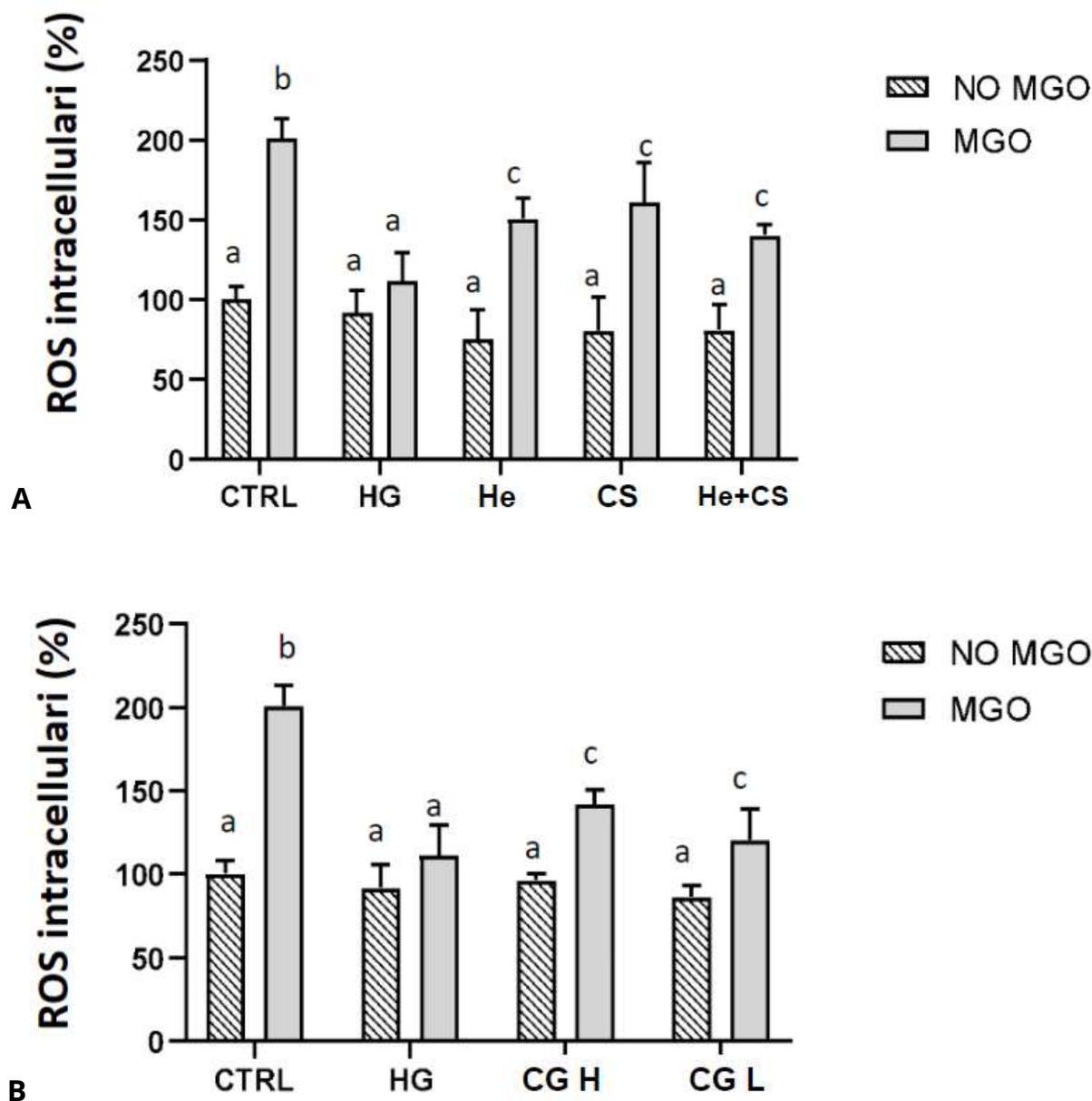


Figura 28: Effetto dei GAG sui livelli di ROS intracellulari in cellule Caco-2 trattate con MGO

A) Livelli di ROS intracellulari in campioni di cellule Caco-2 co-incubati con MGO 3 mM e GAG estratti da latte materno (HG 0,5 mg/mL), eparina (He 0,25 mg/mL) e condroitin solfato (CS 0,25 mg/mL).

B) Livelli di ROS intracellulari, espressi in percentuale, in campioni di cellule Caco-2 co-incubati con MGO 3 mM e GAG estratti da latte vaccino (CG H 0,5 mg/mL, CG L 0,07 mg/mL) e latte materno (HG 0,5 mg/mL).

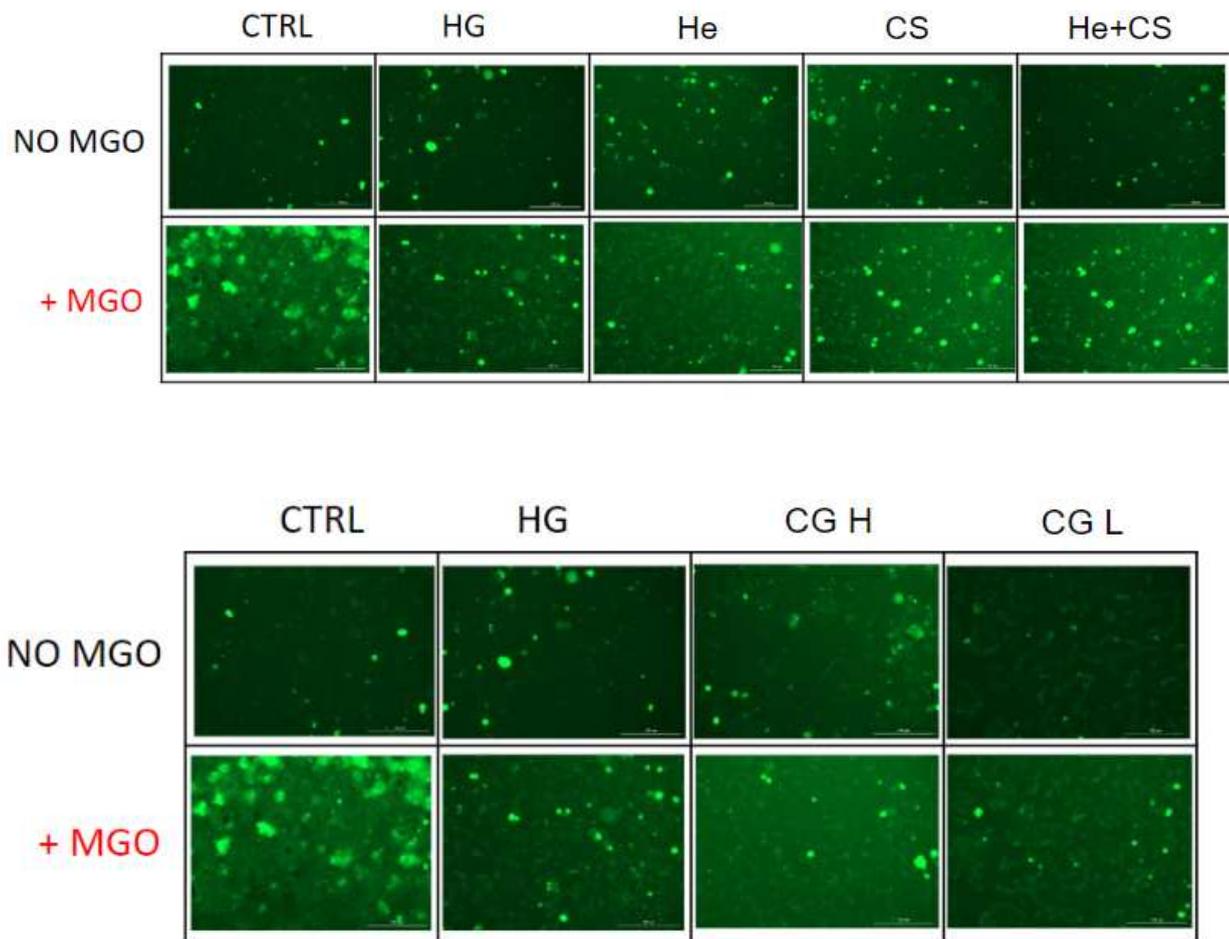


Figura 29: Imaging di cellule Caco-2 trattate con MGO in presenza di GAG. Il verde rappresenta la fluorescenza della diclorofluoresceina (Strumento Lionhearth).

### 4.2.3 Analisi della glicazione delle proteine

Al fine di studiare ulteriormente il ruolo dei GAG sulla glicazione non enzimatica, è stata effettuata la valutazione dei livelli di proteine glicate (AGE-modified proteins), mediante Western blot, sul lisato proteico ottenuto dalle cellule sottoposte alle diverse condizioni sperimentali (**Fig. 30**).

La **Figura 31** mostra che il trattamento con MGO a una concentrazione di 3 mM ha provocato un aumento dei livelli di proteine glicate fino a circa il 50% rispetto al controllo.

La co-incubazione con i GAG ha dimostrato un effetto protettivo contro la glicazione delle proteine. In particolare, i risultati riportati nella **Figura 31A** indicano che HG sono stati altamente efficaci, inibendo quasi completamente l'effetto dannoso di MGO sulle cellule e riportando i livelli di glicazione vicino ai valori di controllo. Anche He e CS hanno limitato i livelli di proteine glicate, ma non hanno mostrato un effetto significativo paragonabile a quello degli HG.

La **Figura 31B** evidenzia che anche i GAG estratti dal latte vaccino hanno un effetto protettivo contro la glicazione non enzimatica. Questo effetto è particolarmente significativo alle concentrazioni più basse (0,07 mg/mL CG L), mentre alle concentrazioni più elevate (0,5 mg/mL CG H) l'effetto è risultato più blando.

Questi risultati suggeriscono che i GAG, specialmente quelli estratti dal latte materno, possono fornire una protezione efficace contro la glicazione delle proteine indotta da MGO nelle cellule intestinali, riducendo il danno ossidativo.

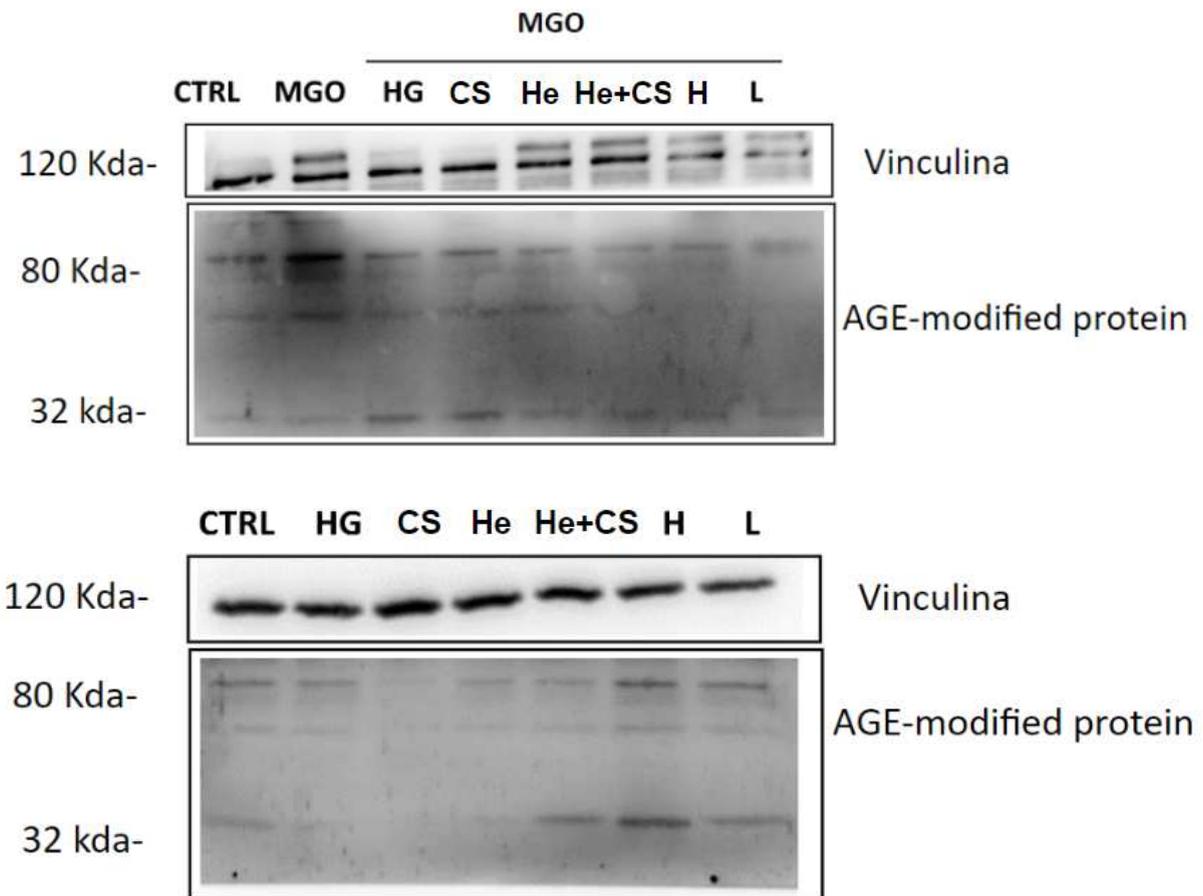
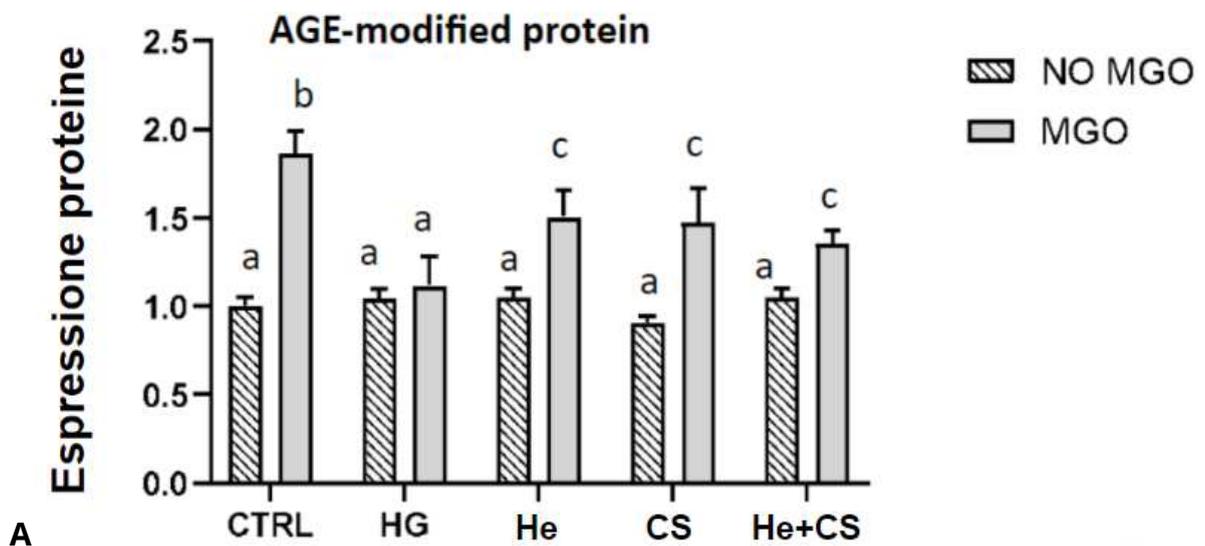


Figura 30: Effetto dei GAG sui livelli di proteine glicate (AGE-modified protein) in cellule Caco-2 trattate con MGO: immagini rappresentative dei gel.



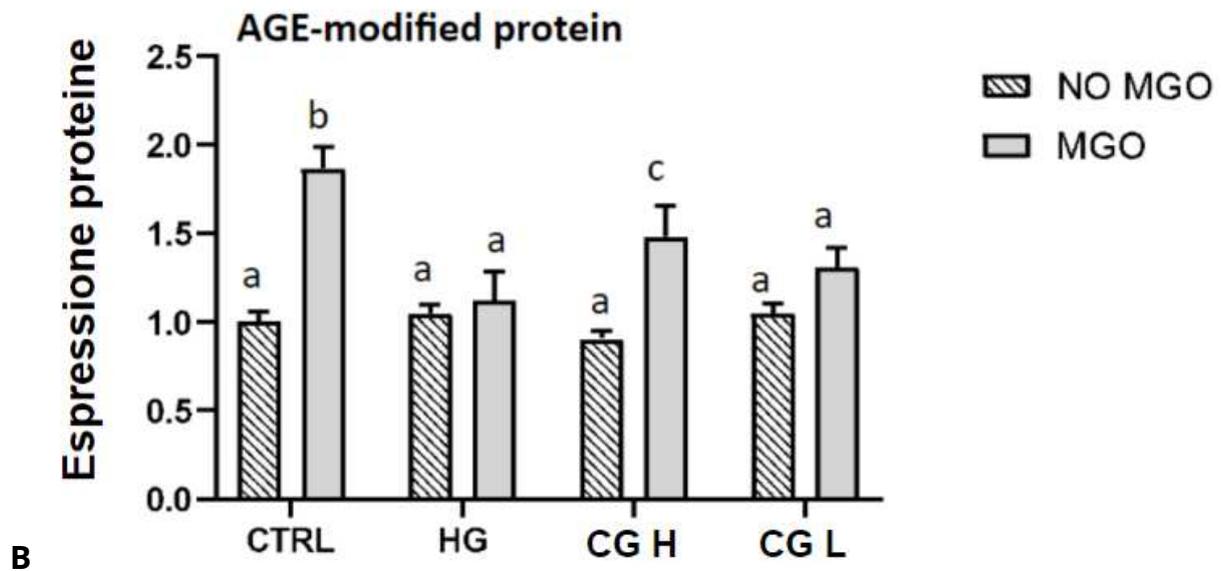


Figura 31: Effetto dei GAG sui livelli di proteine glicate (AGE-modified protein) in cellule Caco-2 trattate con MGO:

A) Livelli di proteine glicate (AGE-modified protein) in campioni di cellule Caco-2 co-incubati con MGO 3 mM e con glicosaminoglicani (GAG) estratti da latte materno (HG 0,5 mg/mL), eparina (He 0,25 mg/mL) e condroitin solfato (CS 0,25 mg/mL).

B) Livelli di proteine glicate (AGE-modified protein) in campioni di cellule Caco-2 co-incubati con MGO 3 mM e con glicosaminoglicani (GAG) estratti da latte vaccino (CG H 0,5 mg/mL, CG L 0,07 mg/mL) e latte materno (HG 0,5 mg/mL).

#### 4.2.4 Analisi sull'integrità del monolayer intestinale

Per valutare gli effetti protettivi dei GAG sulla barriera intestinale, è stato misurato il TEER, un indicatore dell'integrità e della permeabilità della barriera cellulare. Una diminuzione dei valori di TEER indica una perdita dell'integrità del monolayer cellulare.

Come mostrato nei grafici della **Figura 32**, il trattamento con MGO danneggia l'integrità del monolayer intestinale sia a 2 che a 24 ore.

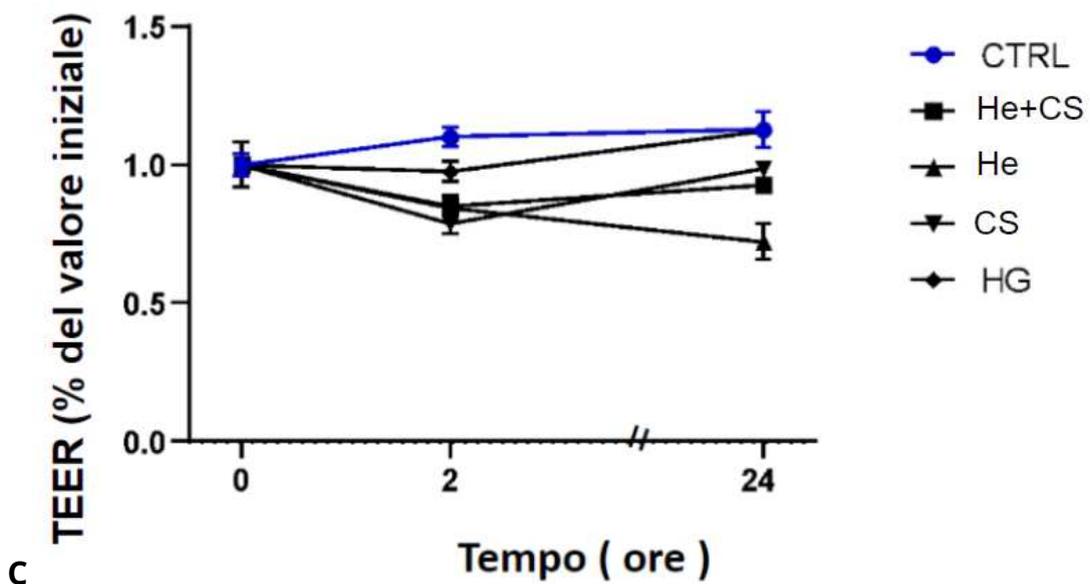
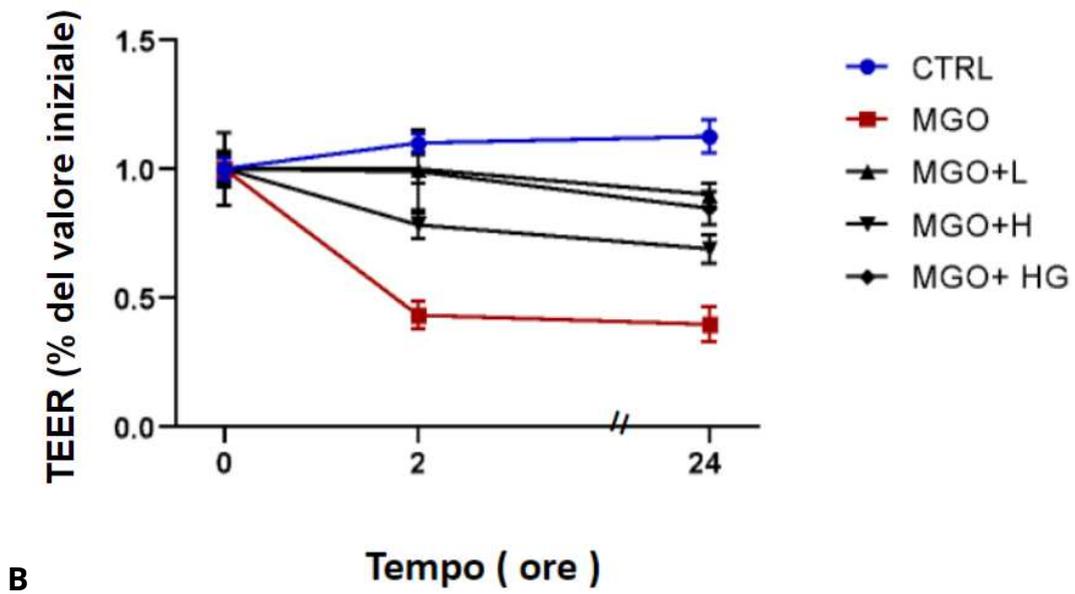
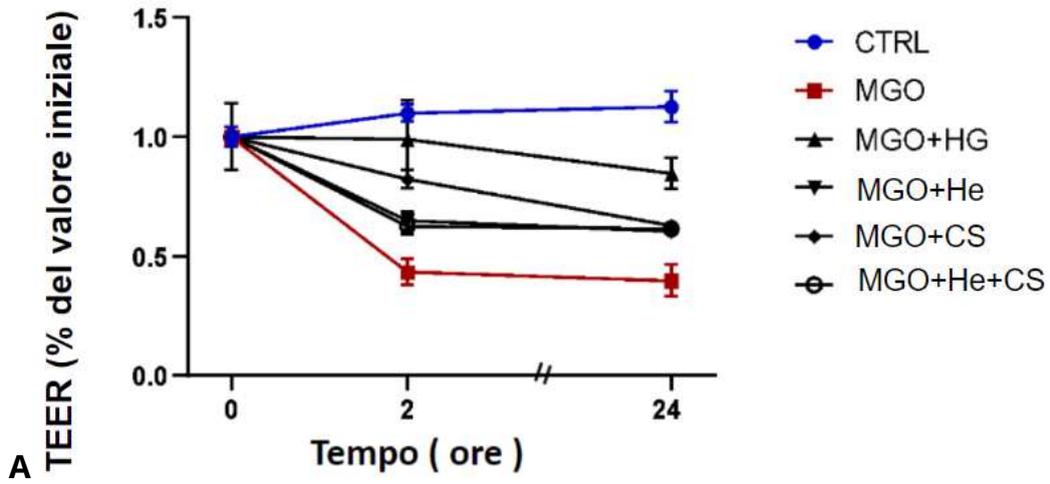
La co-incubazione con i GAG dimostra un effetto protettivo contro l'effetto dannoso del MGO. In particolare, come evidenziato nella **Figura 32A**, HG mostrano un maggiore effetto protettivo rispetto a He e a CS, sia quando usati singolarmente che in combinazione. Tuttavia, si nota una leggera diminuzione del loro effetto protettivo dopo 24 ore dal trattamento.

La **Figura 32B** mostra invece un confronto tra i GAG estratti dal latte vaccino e quelli estratti dal latte materno, evidenziando che i GAG estratti dal latte vaccino alla concentrazione fisiologica di 0,07 mg/mL hanno un effetto quasi comparabile a quello dei HG. Mentre, alle concentrazioni più elevate (0,5 mg/mL), i GAG estratti dal latte vaccino perdono la loro efficacia.

Inoltre, è stato evidenziato dai risultati ottenuti (**Fig. 32C**) che l'incubazione con i soli HG, dopo 24 ore dal trattamento, ha effetti benefici sul benessere della barriera intestinale, migliorando l'integrità del monolayer anche rispetto alle

condizioni riscontrate nel controllo. Come evidenziato nella **Figura 32D**, anche l'incubazione delle cellule con i soli GAG estratti dal latte vaccino a bassa concentrazione (0,07 mg/mL CG L) migliora le condizioni della barriera intestinale rispetto al controllo, sia a 2 che a 24 ore.

Questi risultati suggeriscono che i GAG, sia estratti dal latte materno che dal latte vaccino, alle concentrazioni fisiologiche, possono fornire una protezione efficace contro il danno indotto da MGO sulla barriera intestinale, mantenendo e migliorando l'integrità e la funzione del monostrato cellulare.



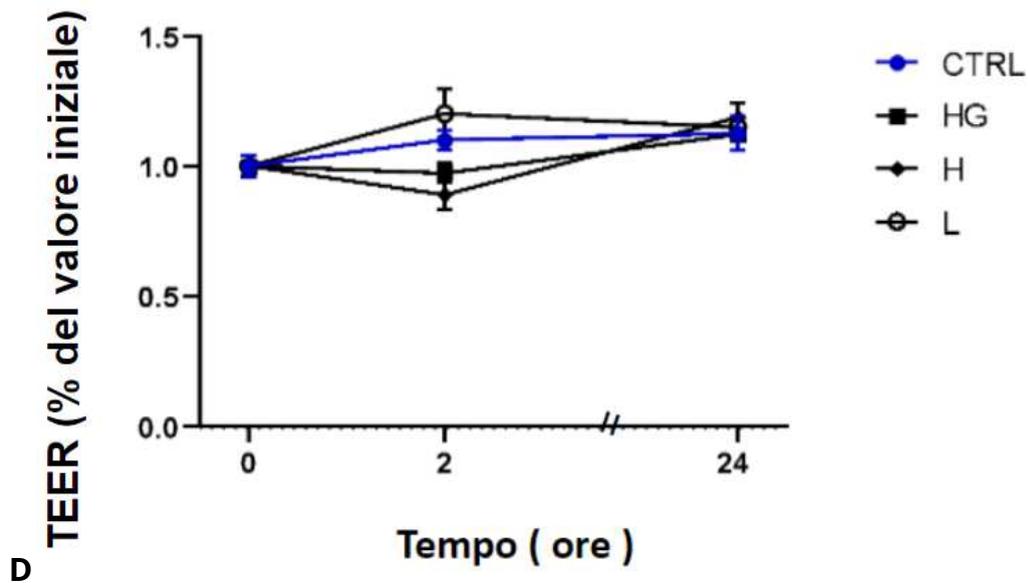


Figura 32: Effetto dei GAG sull'integrità della barriera cellulare in cellule Caco-2 trattate con MGO.

- A) Misurazione della resistenza elettrica transepiteliale, in campioni di cellule Caco-2 coltivate su Transwell e co-incubate con MGO 3 mM e con GAG estratti da latte materno (HG 0,5 mg/mL), eparina (He 0,25 mg/mL) e condroitin solfato (CS 0,25 mg/mL).
- B) Confronto della resistenza elettrica transepiteliale (ohm al minuto), misurata in campioni di cellule Caco-2 coltivate su Transwell e co-incubate con MGO 3 mM e con GAG estratti da latte vaccino (CG H 0,5 mg/mL, CG L 0,07 mg/mL) e latte materno (HG 0,5 mg/mL).
- C) Misurazione della resistenza elettrica transepiteliale (ohm al minuto), in campioni di cellule Caco-2 coltivate su Transwell e incubate con GAG estratti da latte materno (HG 0,5 mg/mL), eparina (He 0,25 mg/mL) e condroitin solfato (CS 0,25 mg/mL).
- D) Confronto della resistenza elettrica transepiteliale (ohm al minuto), misurata in campioni di cellule Caco-2 coltivate su Transwell e incubate con GAG estratti da latte vaccino (CG H 0,5 mg/mL, CG L 0,07 mg/mL) e latte materno (HG 0,5 mg/mL).

#### 4.2.5 Analisi espressione delle tight junctions intestinali

Per una valutazione più approfondita dell'effetto protettivo dei GAG sull'integrità della barriera intestinale, è stata esaminata l'espressione dell'occludina, una proteina di membrana situata nelle giunzioni strette (tight junctions) che sigillano gli spazi tra le cellule intestinali (**Fig. 33**). L'analisi è stata condotta utilizzando la tecnica Western blot sui lisati proteici ottenuti dalle cellule sottoposte alle diverse condizioni sperimentali (**Fig. 34**).

I risultati riportati nella **Figura 35A** confermano la capacità protettiva superiore dei HG rispetto agli altri composti testati, come He e il CS, che sia usati singolarmente che in combinazione non mostrano effetti significativi.

A conferma dei risultati del TEER, anche i GAG estratti dal latte vaccino hanno evidenziato un'influenza positiva sull'integrità della membrana intestinale (**Fig. 35B**). In particolare, alle concentrazioni più basse (0,07 mg/mL CG L) è stato riscontrato un effetto significativo, avvicinandosi ai valori del controllo. Mentre, alle concentrazioni più elevate (0,5 mg/mL CG H), l'effetto protettivo è risultato più blando. In aggiunta, secondo quanto rappresentato nella **Figura 35B**, l'incubazione esclusivamente con CG H porta a una soppressione dell'espressione dell'Occludina. Questo fenomeno può compromettere la corretta funzionalità della barriera intestinale.

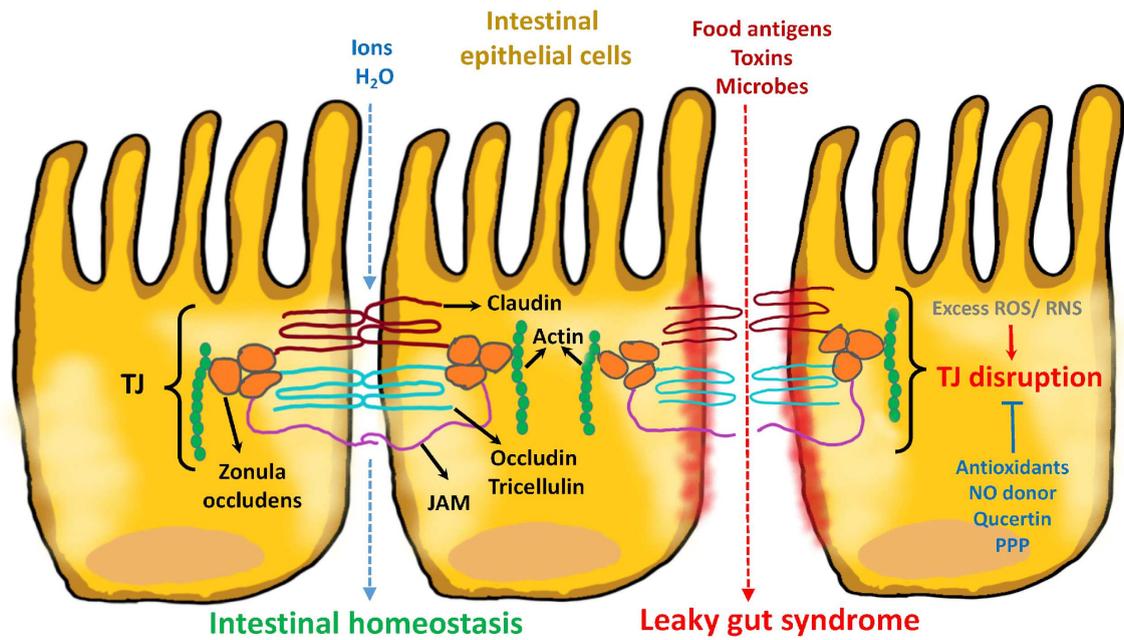


Figura 33: Rappresentazione grafica delle giunzioni strette (TJ)

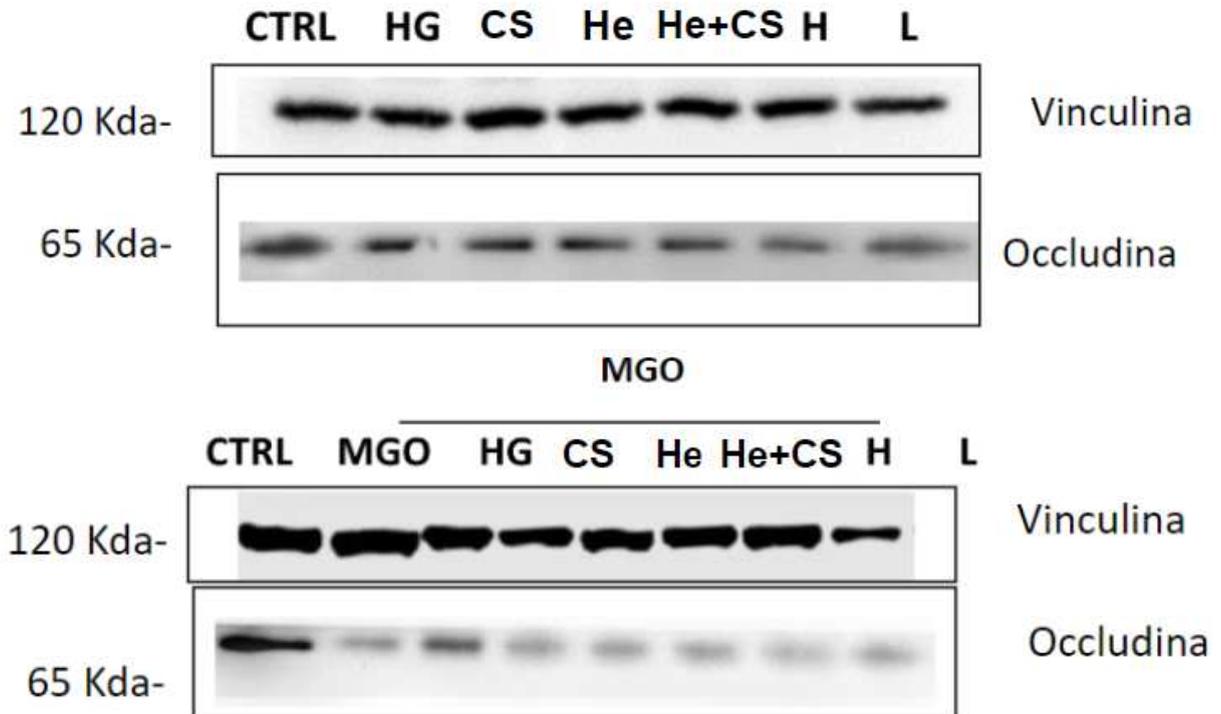


Figura 34: Effetto dei GAG sull'espressione dell'occludina in Caco-2 trattate con MGO : gel rappresentativo

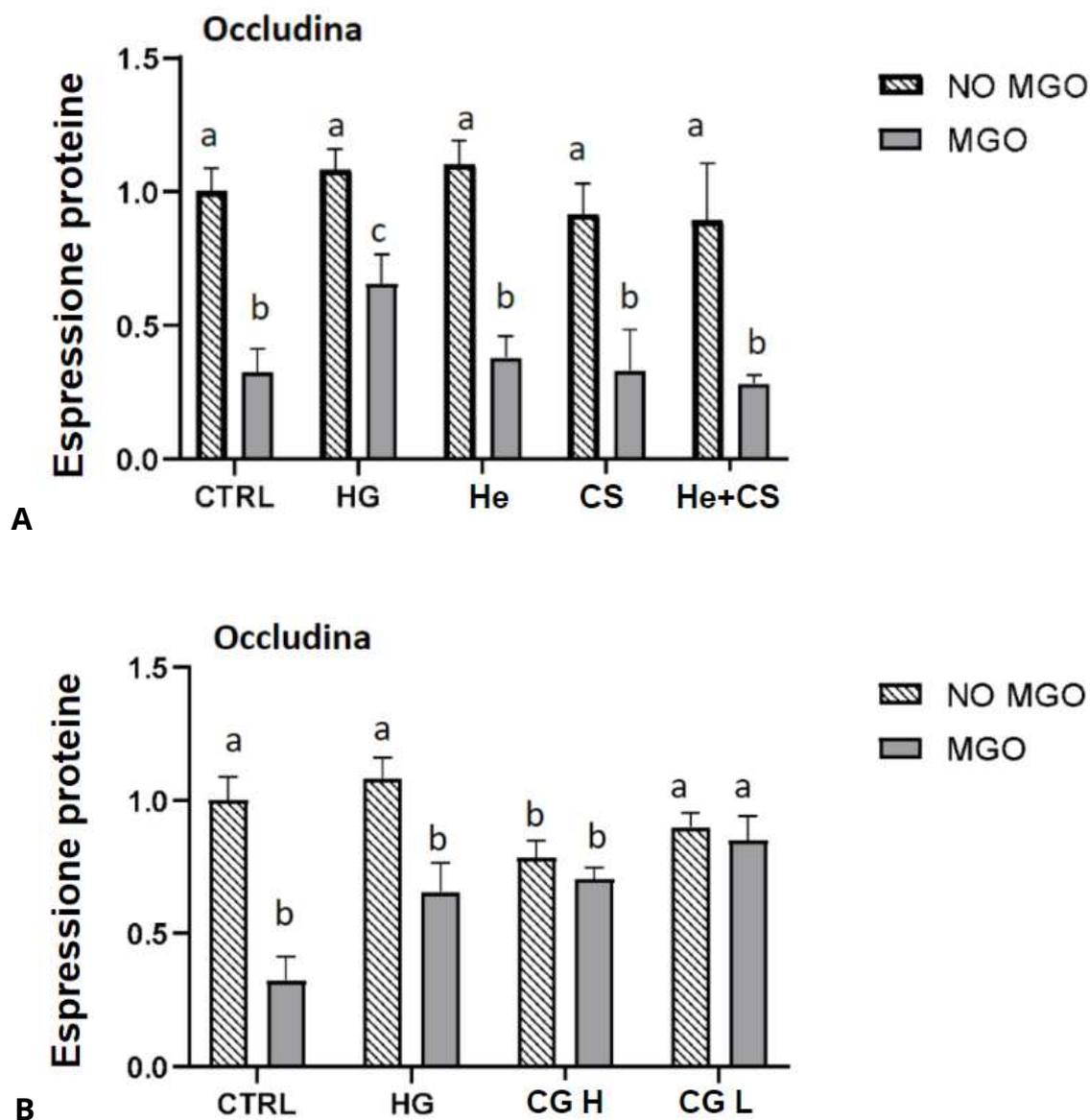


Figura 35: Effetto dei GAG sull'espressione dell'occludina in Caco-2 trattate con MGO

A) Espressione dell'Occludina, in campioni di cellule Caco-2 co-incubati con MGO 3 mM e con GAG estratti da latte materno (HG 0,5 mg/mL), eparina (He 0,25 mg/mL) e condroitin solfato (CS 0,25 mg/mL).

B) Espressione dell'Occludina, in campioni di cellule Caco-2 co-incubati con MGO 3 mM e con GAG estratti da latte vaccino (CG H 0,5 mg/mL, CG L 0,07 mg/mL) e latte materno (HG 0,5 mg/mL)

## CAPITOLO QUINTO

### CONCLUSIONE

Lo scopo di questo progetto è stato quello confrontare gli effetti protettivi dei GAG estratti dal latte materno e dal latte vaccino contro lo stress glico-ossidativo nelle cellule intestinali indotto da MGO. Per simulare le condizioni fisiologiche, sono state utilizzate le concentrazioni di GAG presenti nel latte materno (0,5 mg/mL) e nel latte vaccino (0,07 mg/mL). Inoltre, è stata usata una concentrazione più alta di GAG vaccino (0,5 mg/mL) per confrontarla quantitativamente con quella dei GAG del latte materno. I risultati hanno evidenziato che i GAG isolati da latte umano e vaccino hanno un effetto protettivo contro il danno indotto da MGO sia in sistema cell-free che in cellule in coltura (Caco-2).

In particolare, i dati ottenuti sulle cellule intestinali hanno evidenziato che il trattamento con MGO provoca un significativo effetto citotossico, accompagnato da un aumento dello stress ossidativo. Questi dati sono in accordo con la letteratura che riporta che, a livello del tratto gastro-intestinale, MGO a concentrazioni comprese tra  $\mu\text{M}$  and 4-6 mM induce un'azione citotossica associata a danno ossidativo, azione pro-infiammatoria e pro-apoptotica (Kuntz et al. 2009, 2010). Questi effetti sono in parte associati all'attivazione mediata da MGO di RAGE con conseguente innesco di pathways pro-infiammatori mediati da

NF- $\kappa$ B. A seguito dell'interazione con RAGE si ha l'attivazione di NADPH-ossidasi e un aumento della iNOS con conseguente aumento della sintesi intracellulare di ROS (Yang et al. 2017) (Feng et al., 2023).

L'incubazione con GAG isolati da latte umano e vaccino, nelle nostre condizioni sperimentali, non alterano la vitalità cellulare né la produzione di ROS intracellulari, indicando che non sono dannose per le cellule intestinali. L'incubazione con i GAG in presenza di MGO ha mostrato un effetto protettivo, con un significativo aumento della vitalità cellulare e una diminuzione dei livelli di ROS rispetto alle cellule trattate con MGO. Sia i GAG estratti dal latte materno che quelli dal latte vaccino alla concentrazione fisiologica (0,07 mg/mL) hanno mostrato capacità protettive simili, mentre la concentrazione più alta di GAG vaccino non ha avuto effetti significativi. Questi risultati suggeriscono che i GAG presenti nel latte materno e vaccino esercitano un ruolo protettivo contro il danno glico-ossidativo indotto da MGO in cellule intestinali.

Numerose evidenze scientifiche indicano che un alto contenuto di AGE nell'intestino può aumentare la permeabilità intestinale e i livelli di marcatori infiammatori (Phuong-Nguyen et al., 2023). Inoltre, uno studio di Lim et al. (2022) ha dimostrato che il trattamento con metilgliosale derivato idro-imidazoline-1 (MG-H1) riduce il TEER e aumenta il coefficiente di permeabilità nei monostrati di cellule Caco-2. Pertanto, è stato ritenuto interessante verificare l'effetto del trattamento con i GAG sull'integrità del monolayer intestinale. I risultati ottenuti

mediante il TEER hanno confermato che MGO danneggia l'integrità del monostrato intestinale. La co-incubazione con i GAG ha mostrato un significativo effetto positivo sull'integrità della membrana intestinale. Nelle cellule trattate con MGO, la presenza di HG e quelli estratti dal latte vaccino a bassa concentrazione (CG L) protegge nei confronti dei danni alla barriera intestinale; una capacità protettiva superiore rispetto agli altri composti testati (CS, He, He+CS, CG H). Ulteriore prova dell'effetto protettivo dei GAG sull'integrità della membrana intestinale è stata fornita dai risultati sull'espressione dell'occludina, una proteina di membrana situata nelle giunzioni strette (TJ) che sigillano gli spazi tra le cellule intestinali. Infatti, i dati hanno evidenziato una maggiore espressione di questa proteina nelle cellule trattate con MGO in presenza di GAG isolati da latte materno e vaccino.

I risultati ottenuti nella presente tesi suggeriscono che i GAG del latte materno esercitano un ruolo protettivo contro il danno glico-ossidativo indotto da MGO nelle cellule intestinali e che i GAG del latte vaccino sono più efficaci alla concentrazione fisiologica. Questi dati sono confermati dai risultati ottenuti in modelli cell-free. Infatti, nella presente tesi, abbiamo dimostrato che l'incubazione con i GAG è in grado di proteggere l'albumina dalla glicazione indotta da MGO. Una minore formazione di AGE è stata osservata nei campioni di albumina trattati con MGO in presenza di GAG materni e vaccini a concentrazione fisiologica. Inoltre, i composti del latte materno presi

singolarmente (He e CS) sono risultati meno efficienti rispetto alla loro combinazione (He + CS), suggerendo un miglior funzionamento in sinergia.

Diversi meccanismi possono spiegare l'effetto protettivo dei GAG contro la glicazione indotta da MGO. I dati suggeriscono che l'azione protettiva richiede un'interazione diretta tra GAG e MGO, probabilmente mediata dall'interazione dei GAG con le membrane cellulari, impedendo l'accesso del MGO alle cellule e/o ai recettori RAGE, inibendo così i percorsi pro-infiammatori e pro-ossidanti mediati dal MGO. Questa ipotesi è in accordo con Iannuzzi et al. 2018 che hanno recentemente riportato che la incubazione con CS ottenuto da diverse specie (maiale, squalo, vaccino) o di sintesi, è in grado di proteggere cellule in coltura (SH-SY5Y human neuroblastoma cells e NIH-3T3 mouse embryonic fibroblasts) dall'azione citotossica e pro-ossidante indotta da insulina-glicata. Gli autori utilizzando microscopia a fluorescenza (Fluorescence-lifetime imaging microscopy or FLIM) hanno dimostrato che CS interagisce con la membrana cellulare e prevenire le alterazioni della viscosità delle membrane associate al trattamento con insulina glicata (Iannuzzi et al. 2018). E' possibile ipotizzare che l'effetto protettivo dei GAG nei confronti del danno indotto da MGO possa esplicarsi sia mediante un'azione di scavenging diretta sui ROS generati da MGO o mediante l'attivazione di difese antiossidanti endogene. Infatti, studi precedenti hanno suggerito che l'acido ialuronico e C4S sono in grado di proteggere dall'ossidazione delle proteine, e perossidazione

lipidica sia mediante un'azione di radical scavenging di ROS (Cañas et al.2007) sia migliorando la difesa antiossidante come mostrato da un aumento della superossido dismutasi e attività catalasi (Campo et al. 2004, 2009) o induzione dell'enzima ossigenasi-1 (HO-1) (Cañas et al. 2007).

Tuttavia, successivi studi sono necessari per investigare i meccanismi molecolari alla base del ruolo protettivo dei GAG nei confronti del danno glico-ossidativo indotto da MGO su cellule intestinali. Tale modello ha una rilevanza fisiopatologica, infatti, la mucosa intestinale, è soggetta ad un elevato stress glico-ossidativo, per la sua continua esposizione a ROS, AGE e MGO sia di origine endogena, che esogena. Infatti, è stato dimostrato che MGO è presente negli alimenti soprattutto processati. Tra gli alimenti che presentano elevati livelli di AGE e MGO troviamo le "formule per lattanti" prodotti alimentari destinati all'alimentazione dei lattanti nei primi mesi di vita. Un eccessivo accumulo di MGO e AGE provoca stress ossidativo e innesca processi infiammatori nella mucosa intestinale (Young et al. 2009) con conseguente danno alle cellule intestinali. I danni indotti dalla glico-ossidazione a livello intestinale portano ad alterazioni della funzionalità della barriera intestinale, alla compromissione della sua struttura causando un'elevata erosione delle mucose. Questi eventi svolgono un ruolo fondamentale in numerose infezioni e nello sviluppo di malattie gastrointestinali come il morbo di Crohn e la colite ulcerosa (Kruidenier et al. 2003).

I dati ottenuti evidenziano, pertanto, l'importanza dell'assunzione di GAG durante il periodo postnatale; infatti, la loro assunzione, attraverso l'introduzione di latte materno o latte vaccino, può fornire vantaggi significativi nel neonato: infatti, oltre a svolgere un ruolo importante antibatterico e azione anti-infiammatoria, i GAG possono esercitare un'importante un'azione protettiva contro i danni indotti dalla glico-ossidazione e i processi patogenetici associati. I risultati possono contribuire a migliorare la formulazione delle formule per lattanti e a promuovere la salute intestinale neonatale.

## BIBLIOGRAFIA

- Ahn MY, Shin KH, Kim DH, Jung EA, Toida T, Linhardt RJ, Kim YS. Characterization of a Bacteroides species from human intestine that degrades glycosaminoglycans. *Can J Microbiol.* 1998 May;44(5):423-9. doi: 10.1139/cjm-44-5-423.
- Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev.* 2015 Nov;91(11):629-35. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013.
- Aragonès G, Rowan S, G Francisco S, Yang W, Weinberg J, Taylor A, Bejarano E. Glyoxalase System as a Therapeutic Target against Diabetic Retinopathy. *Antioxidants (Basel).* 2020 Oct 30;9(11):1062. doi: 10.3390/antiox9111062.
- Baker S, Niranjana R, Manju K, Ranjini HK, Shayista H. Efficacy of breast milk components against microbial pathogens to combat drug-resistance. *The Microbe, Volume 1, 2023,100010.* doi: 10.1016/j.microb.2023.100010.
- Basta, Schmidt, De Caterina. 2004. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc.* doi:10.1016/j.cardiores.2005.05.001.
- Burge K, Bergner E, Gunasekaran A, Eckert J, Chaaban H. The Role of Glycosaminoglycans in Protection from Neonatal Necrotizing Enterocolitis:

A Narrative Review. *Nutrients*. 2020 Feb 20;12(2):546. doi: 10.3390/nu12020546-

- Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Traina P, Samà D, Calatroni A. Glycosaminoglycans modulate inflammation and apoptosis in LPS-treated chondrocytes. *J Cell Biochem*. 2009 Jan 1;106(1):83-92. doi: 10.1002/jcb.21981.
- Campo GM, Avenoso A, Campo S, Ferlazzo AM, Calatroni A. Chondroitin sulphate: antioxidant properties and beneficial effects. *Mini Rev Med Chem*. 2006 Dec;6(12):1311-20. doi: 10.2174/138955706778993012.
- Campo GM, D'Ascola A, Avenoso A, Campo S, Ferlazzo AM, Micali C, Zanghì L, Calatroni A. Glycosaminoglycans reduce oxidative damage induced by copper (Cu<sup>2+</sup>), iron (Fe<sup>2+</sup>) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in human fibroblast cultures. *Glycoconj J*. 2004;20(2):133-41. doi: 10.1023/B:GLYC.0000018587.67742.4b.
- Cañas N, Valero T, Villarroya M, Montell E, Vergés J, García AG, López MG. Chondroitin sulfate protects SH-SY5Y cells from oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 Dec;323(3):946-53. doi: 10.1124/jpet.107.123505.
- Coppa GV, Gabrielli O, Bertino E, Zampini L, Galeazzi T, Padella L, Santoro L, Marchesiello RL, Galeotti F, Maccari F, Volpi N. Human milk

glycosaminoglycans: the state of the art and future perspectives. *Ital J Pediatr.* 2013 Jan 15;39:2. doi: 10.1186/1824-7288-39-2.

- Coppa GV, Gabrielli O, Buzzega D, Zampini L, Galeazzi T, Maccari F, Bertino E, Volpi N. Composition and structure elucidation of human milk glycosaminoglycans. *Glycobiology.* 2011 Mar;21(3):295-303. doi: 10.1093/glycob/cwq164.
- Degen J, Vogel M, Richter D, Hellwig M, Henle T. Metabolic transit of dietary methylglyoxal. *J Agric Food Chem.* 2013 Oct 30;61(43):10253-60. doi: 10.1021/jf304946p.
- Ding, Xiaomeng & Hu, Xiaoyi & Chen, Y. & Xie, Jian-Hua & Ying, Mengxi & Wang, Yudan & Yu, Qiang. (2020). Differentiated Caco-2 cell models in food-intestine interaction study: Current applications and future trends. *Trends in Food Science & Technology.* 107. doi: 10.1016/j.tifs.2020.11.015.
- Feng N, Feng Y, Tan J, Zhou C, Xu J, Chen Y, Xiao J, He Y, Wang C, Zhou M, Wu Q. Inhibition of advance glycation end products formation, gastrointestinal digestion, absorption and toxicity: A comprehensive review. *Int J Biol Macromol.* 2023 Sep 30;249:125814. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125814.
- Haik GM Jr, Lo TW, Thornalley PJ. Methylglyoxal concentration and glyoxalase activities in the human lens. *Exp Eye Res.* 1994 Oct;59(4):497-500. doi: 10.1006/exer.1994.1135.

- Hanson LA. Session 1: Feeding and infant development breast-feeding and immune function. Proc Nutr Soc. 2007 Aug;66(3):384-96. doi: 10.1017/S0029665107005654.
- Hernell O. Human milk vs. cow's milk and the evolution of infant formulas. Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program. 2011;67:17-28. doi: 10.1159/000325572.
- Iannuzzi C, Borriello M, D'Agostino A, Cimini D, Schiraldi C, Sirangelo I. Protective effect of extractive and biotechnological chondroitin in insulin amyloid and advanced glycation end product-induced toxicity. J Cell Physiol. 2019 Apr;234(4):3814-3828. doi: 10.1002/jcp.27153.
- Kocadağlı T, Gökmen V. Investigation of  $\alpha$ -dicarbonyl compounds in baby foods by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. J Agric Food Chem. 2014 Aug 6;62(31):7714-20. doi: 10.1021/jf502418n.
- Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CB, Verspaget HW. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. J Pathol. 2003 Sep;201(1):28-36. doi: 10.1002/path.1409.
- Kuntz S, Kunz C, Rudloff S. Carbonyl compounds methylglyoxal and glyoxal affect interleukin-8 secretion in intestinal cells by superoxide anion generation and activation of MAPK p38. Mol Nutr Food Res. 2010 Oct;54(10):1458-67. doi: 10.1002/mnfr.200900408.

- Kuntz S, Rudloff S, Ehl J, Bretzel RG, Kunz C. Food derived carbonyl compounds affect basal and stimulated secretion of interleukin-6 and -8 in Caco-2 cells. *Eur J Nutr.* 2009 Dec;48(8):499-503. doi: 10.1007/s00394-009-0035-9.
- Kvaavik E, Tell GS, Klepp KI. Surveys of Norwegian youth indicated that breast feeding reduced subsequent risk of obesity. *J Clin Epidemiol.* 2005 Aug;58(8):849-55. doi: 10.1016/j.jclinepi.2004.12.007.
- Lim JM, Yoo HJ, Lee KW. High Molecular Weight Fucoïdan Restores Intestinal Integrity by Regulating Inflammation and Tight Junction Loss Induced by Methylglyoxal-Derived Hydroimidazolone-1. *Mar Drugs.* 2022 Sep 17;20(9):580. doi: 10.3390/md20090580.
- Lyons KE, Ryan CA, Dempsey EM, Ross RP, Stanton C. Breast Milk, a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health. *Nutrients.* 2020 Apr 9;12(4):1039. doi: 10.3390/nu12041039.
- Maccari F, Mantovani V, Gabrielli O, Carlucci A, Zampini L, Galeazzi T, Galeotti F, Coppa GV, Volpi N. Metabolic fate of milk glycosaminoglycans in breastfed and formula fed newborns. *Glycoconj J.* 2016 Apr;33(2):181-8. doi: 10.1007/s10719-016-9655-5.
- Martin CR, Ling PR, Blackburn GL. Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula. *Nutrients.* 2016 May 11;8(5):279. doi: 10.3390/nu8050279.

- Matafome P, Sena C, Seiça R. Methylglyoxal, obesity, and diabetes. *Endocrine*. 2013 Jun;43(3):472-84. doi: 10.1007/s12020-012-9795-8.
- Miller DL, Hanson W, Schedl HP, Osborne JW. Proliferation rate and transit time of mucosal cells in small intestine of the diabetic rat. *Gastroenterology*. 1977 Dec;73(6):1326-32.
- Monzon N, Kasahara EM, Gunasekaran A, Burge KY, Chaaban H. Impact of neonatal nutrition on necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg*. 2023 Jun;32(3):151305. doi: 10.1016/j.sempedsurg.2023.151305.
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000 Apr 13;404(6779):787-90. doi: 10.1038/35008121.
- Pereira PC. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*. 2014 Jun;30(6):619-27. doi: 10.1016/j.nut.2013.10.011.
- Phuong-Nguyen K, McNeill BA, Aston-Mourney K, Rivera LR. Advanced Glycation End-Products and Their Effects on Gut Health. *Nutrients*. 2023 Jan 13;15(2):405. doi: 10.3390/nu15020405.
- Qu W, Yuan X, Zhao J, Zhang Y, Hu J, Wang J, Li J. Dietary advanced glycation end products modify gut microbial composition and partially

increase colon permeability in rats. *Mol Nutr Food Res*. 2017 Oct;61(10). doi: 10.1002/mnfr.201700118. Epub 2017 Jul 31.

- Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol*. 2005 Jan;21(1):1-26. doi: 10.1007/s10565-005-0085-6.
- Schalkwijk CG, Stehouwer CDA. Methylglyoxal, a Highly Reactive Dicarbonyl Compound, in Diabetes, Its Vascular Complications, and Other Age-Related Diseases. *Physiol Rev*. 2020 Jan 1;100(1):407-461. doi: 10.1152/physrev.00001.2019.
- Sharma, Rajan & Kataria, Ankita & Sharma, Savita & Singh, Baljit. (2021). Structural characterisation, biological activities and pharmacological potential of glycosaminoglycans and oligosaccharides: a review. *International Journal of Food Science & Technology*. doi: 10.1111/ijfs.15379.
- Shoji, Nakagawa, Asai, Fujital, Hashiura, Nakajima, Oikawa, Miyazawa. 2010. LC-MS/MS analysis of carboxymethylated and carboxyethylated phosphatidylethanolamines in human erythrocytes and blood plasma. *J Lipid Res* 51: 2445–2453. doi:10.1194/jlr.D004564.

- Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2014 Feb;18(1):1-14. doi: 10.4196/kjpp.2014.18.1.1.4.
- Singhal A, Cole TJ, Fewtrell M, Lucas A. Breastmilk feeding and lipoprotein profile in adolescents born preterm: follow-up of a prospective randomised study. *Lancet.* 2004 May 15;363(9421):1571-8. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16198-9.
- Singhal A, Lucas A. Early origins of cardiovascular disease: is there a unifying hypothesis? *Lancet.* 2004 May 15;363(9421):1642-5. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16210-7.
- Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agric Food Chem.* 2002 Aug 14;50(17):4998-5006. doi: 10.1021/jf020302f.
- Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J.* 1999 Nov 15;344 Pt 1(Pt 1):109-16.
- Tomoko Oya, Nobutaka Hattori, Yoshikuni Mizuno, Satoshi Miyata, Sakan Maeda, Toshihiko Osawa, Koji Uchida, Methylglyoxal Modification of Protein: CHEMICAL AND IMMUNOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF METHYLGLYOXAL-ARGININE ADDUCTS\*, *Journal of Biological Chemistry,*

Volume 274, Issue 26, 1999, Pages 18492-18502, ISSN 0021-9258, doi: 10.1074/jbc.274.26.18492.

- Uribarri J, Cai W, Sandu O, Peppas M, Goldberg T, Vlassara H. Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun;1043:461-6. doi: 10.1196/annals.1333.052.
- Yang CT, Meng FH, Chen L, Li X, Cen LJ, Wen YH, Li CC, Zhang H. Inhibition of Methylglyoxal-Induced AGEs/RAGE Expression Contributes to Dermal Protection by N-Acetyl-L-Cysteine. *Cell Physiol Biochem.* 2017;41(2):742-754. doi: 10.1159/000458734.
- Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 2001 Mar;54(3):176-86. doi: 10.1136/jcp.54.3.176.
- Zhang S, Jiao T, Chen Y, Gao N, Zhang L, Jiang M. Methylglyoxal induces systemic symptoms of irritable bowel syndrome. *PLoS One.* 2014 Aug 26;9(8):e105307. doi: 10.1371/journal.pone.0105307.
- Zheng J, Guo H, Ou J, Liu P, Huang C, Wang M, Simal-Gandara J, Battino M, Jafari SM, Zou L, Ou S, Xiao J. Benefits, deleterious effects and mitigation of methylglyoxal in foods: A critical review, *Trends in Food Science & Technology.* Volume 107, 2021, Pages 201-212. doi: 10.1016/j.tifs.2020.10.031.